

TRABALHO DE FORMATURA

Curso de Graduação em Engenharia Ambiental

**AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE E BIODEGRADAÇÃO DA AMETRINA EM
MEIO LÍQUIDO**

Giulia Malaguti Braghini Marcolini Mártires

Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli (orientador)

Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia (coorientador)

Rio Claro (SP)

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Instituto de Geociências e Ciências Exatas

Campus de Rio Claro

GIULIA MALAGUTI BRAGHINI MARCOLINI MÁRTIRES

**AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE E BIODEGRADAÇÃO
DA AMETRINA EM MEIO LÍQUIDO**

Trabalho de Formatura apresentado ao Instituto de Geociências e Ciências Exatas - Campus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, para obtenção do grau de Engenheiro Ambiental.

Rio Claro - SP

2019

M386a

Mártires, Giulia Malaguti Braghini Marcolini

Avaliação da ecotoxicidade e biodegradação da ametrina em meio líquido / Giulia Malaguti Braghini Marcolini Mártires. -- Rio Claro, 2019
46 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia Ambiental) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Rio Claro

Orientador: Renato Nallin Montagnolli

Coorientador: Ederio Dino Bidoia

1. Biodegradação. 2. Ecotoxicidade. 3. Ametrina. 4. Biorremediação.

I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

GIULIA MALAGUTI BRAGHINI MARCOLINI MÁRTIRES

AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE E BIODEGRADAÇÃO DA AMETRINA EM MEIO LÍQUIDO

Trabalho de Formatura apresentado ao
Instituto de Geociências e Ciências
Exatas - Câmpus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho, para obtenção do grau de
Engenheiro Ambiental.

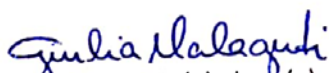
Comissão Examinadora

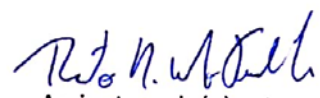
Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli (orientador)

Prof. Dr. Jaqueline Matos Cruz

Me. Pedro Henrique Mainardi

Rio Claro, 12 de novembro de 2019.


Assinatura do(a) aluno(a)


Assinatura do(a) orientador(a)

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Stefania toda a gratidão, por ser o meu maior exemplo de bondade e superação. À minha querida avó Dimeia, por sempre cuidar de mim, de onde estiver. Aos meus irmãos Guilherme, Augusto e Rafaela, por me ensinarem tanto. Ao meu padrasto Celso, por todo o incentivo. Ao meu pai Guilherme, pelas oportunidades e pelo carinho. Aos meus demais familiares, pelos bons momentos. Amo todos vocês, obrigada por tudo.

Aos meus amigos de infância: Giulia Scarpellini, Carla Akune, Marina Inagaki, Wine Menegassi, Victoria Achê, Beatriz Felippini, Naraline Gonçalves, Laís Constâncio e Matheus Javorski, pela tranquilidade de nossa amizade. Vocês são muito importantes para mim.

Às amigadas que Rio Claro me deu e levarei para onde eu for: Beathriz Cocco, Maria Laís Crispim, Sabrina Costa, Giulia Silveira, Caroline Ferraz e Larissa Silva, por sempre me lembrarem de ter fé. Sem vocês nada disso seria possível.

Aos meus orientador Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli e coorientador Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia, por todo o aprendizado e suporte nos últimos meses.

Ao Laboratório Multidisciplinar do Departamento de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Aos meus colegas de laboratório Maurício Pane e Pedro Henrique Mainardi, por me auxiliarem nesse trabalho e pela amizade.

RESUMO

A expansão da cultura da cana-de-açúcar no Brasil e, principalmente, no estado de São Paulo, tem causado o uso de agroquímicos como pesticidas, fungicidas e herbicidas. Estes, eventualmente, podem ser carregados até atingirem corpos hídricos superficiais ou subterrâneos. A persistência de defensivos agrícolas no meio ambiente pode provocar a desestabilização ecossistêmica, promovendo efeitos prejudiciais à saúde humana e de outras espécies. A ametrina é o ingrediente ativo do Gesapax® CIBA GEIGY, um dos herbicidas mais amplamente utilizados em monoculturas no Brasil. O tratamento de ambientes contaminados por herbicidas, tem sido feito pelo uso de técnicas de biorremediação por microrganismos. Através desse método é possível selecionar consórcios microbianos nativos do solo que são adaptados à degradação de contaminantes específicos, para utilizá-los na descontaminação. A atividade de biodegradação pode ser medida através da técnica de respirometria, que quantifica a liberação de CO₂ e o consumo de O₂, possibilitando analisar a eficiência da biorremediação no tratamento de um ambiente contaminado. Este trabalho teve como objetivo estudar a biodegradação da ametrina em meio líquido, pressupondo a contaminação de rios e lençóis freáticos. Para isso, foi utilizado o método de respirometria baseado nos estudos de Bartha & Pramer (1965), com auxílio de modelagem matemática para ajuste dos resultados. Também, para verificar os efeitos da ametrina no crescimento vegetal, foram realizados testes de ecotoxicidade a partir da germinação de sementes de alface e rúcula na presença do herbicida. Adicionalmente, foram medidos condutividade e pH para possibilitar a comparação dos parâmetros físicos nas situações anterior e posterior ao processo de biodegradação. Com os resultados, foi possível determinar a eficiência da biodegradação, uma vez que foi observado o consumo completo do contaminante entre 70 e 80 dias. A ametrina apresentou-se não tóxica ou com indícios de toxicidade em relação às sementes de alface, e foi considerada tóxica em relação às sementes de rúcula. Os testes de condutividade e pH forneceram outras evidências do sucesso da biodegradação da ametrina.

Palavras-chave: Ametrina. Biodegradação. Ecotoxicidade. Gesapax® CIBA GEIGY. Respirometria.

ABSTRACT

With the expansion of sugarcane culture in Brazil and especially in the state of São Paulo, the use of agrochemicals such as pesticides, fungicides and herbicides has increased. These can eventually be carried to rivers or aquifers. The persistence of pesticides in the environment can lead to ecosystem destabilization, promoting detrimental effects on human health and other species. Ametryn is the active ingredient in Gesapax® CIBA GEIGY, one of the most widely used herbicides in monocultures in Brazil. For the treatment of herbicide contaminated environments, the use of microorganism bioremediation techniques has been increasing. It is possible to select native soil microbial consortia that are adapted to the degradation of specific contaminants, to use for decontamination. Biodegradation activity can be measured by the respirometry technique, which quantifies the release of CO₂ and consume of O₂, making it possible to analyze the efficiency of bioremediation in treating a contaminated environment. The objective of this work was to study the biodegradation of ametryn in liquid medium, assuming the contamination of rivers and groundwater. For this, the method of respirometry based on the studies of Bartha & Pramer (1965) was used, with the aid of mathematical modeling to adjust the results. Also, to verify the effects of ametryn on plant growth, ecotoxicity tests were performed from the germination of lettuce and arugula seeds in the presence of herbicide. Additionally, conductivity and pH were measured to enable comparison of physical parameters in situations before and after the biodegradation process. As a result, it was possible to conclude the biodegradation efficiency, since the full consumption of the contaminant was observed in the period of 70 to 80 days. Ametryn showed itself non-toxic or with signs of toxicity in relation to lettuce seeds and was considered toxic in relation to arugula seeds. Conductivity and pH tests provided further evidence of the success of ametryn biodegradation.

Keywords: Ametryn. Biodegradation Ecotoxicity. Gesapax® CIBA GEIGY. Respirometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural da ametrina.....	13
Figura 2 - Curva de crescimento bacteriano.....	17
Figura 3 - Saco plástico antes e após enterramento.....	20
Figura 4 - Canteiro do Jardim Experimental.....	20
Figura 5 - Respirômetro de Bartha & Pramer.....	21
Figura 6 - Ensaio respirométrico na incubadora.....	24
Figura 7 - Coloração do ponto de virada adotado pela autora.....	25
Figura 8 - Padrão de distribuição das sementes.....	29
Figura 9 - Hipocótilo e raiz de uma plântula.....	30
Figura 10 - Comparativo da produção semanal de CO ₂	32
Figura 11 – Produção de CO ₂ semanal.....	32
Figura 12 – Comparativo da produção acumulada de CO ₂	34
Figura 13 – Produção acumulada de CO ₂	34
Figura 14 - Placa de papel plastificado com plântulas de alface.....	36
Figura 15 - Resultados qualitativos do crescimento das sementes de alface.....	37
Figura 16 - Comparação dos Índices de Germinação – IG (%) (alface).....	38
Figura 17 - Placa de papel plastificado com plântulas de rúcula.....	39
Figura 18 - Resultados qualitativos do crescimento das sementes de rúcula.....	40
Figura 19 - Comparação dos Índices de Germinação – IG (%) (rúcula).....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características físico-químicas da ametrina.....	13
Tabela 2 - Condições de aplicação do Gesapax® 500 CIBA GEIGY.....	14
Tabela 3 - Conteúdo de cada respirômetro.....	23
Tabela 4 - Conteúdo dos ensaios de ecotoxicidade.....	27
Tabela 5 - Dados respirométricos (Bmax, TBmax e R ²)	35
Tabela 6 - Resultados do teste de ecotoxicidade (alface).....	36
Tabela 7 - Resultados do teste de ecotoxicidade (rúcula).....	39
Tabela 8 - Comparativo da condutividade antes e após a biodegradação.....	42
Tabela 9 - Comparativo do pH antes e após a biodegradação.....	42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 Gerais	12
2.2 Específicos.....	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1 Ametrina.....	12
3.2 Contaminação de solos e água por herbicidas	14
3.3 Biorremediação e seleção de microrganismos.....	15
3.4 Crescimento Bacteriano	16
3.5 Método da Respirometria.....	17
3.6 Biodegradação e Modelagem Matemática.....	18
3.7 Ecotoxicidade e testes com sementes	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 Área de estudo e coleta do solo.....	19
4.2 Líquido-base	21
4.3 Ensaio de Respirometria	21
4.3.1 Cálculos da concentração e volume de ametrina	22
4.3.2 Montagem dos respirômetros	22
4.3.3 Titulação do KOH residual	24
4.4 Modelagem matemática e softwares utilizados.....	26
4.5 Teste de ecotoxicidade com sementes de alface e rúcula.....	27
4.5.1 Germinação das sementes	30
4.6 Condutividade e pH.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Ensaio de Respirometria	31
5.2 Ecotoxicidades dos contaminantes	36

5.2.1 Alface (<i>Lactuca sativa</i>).....	36
5.2.2 Rúcula (<i>Eruca sativa</i>).....	38
5.3 Condutividade e pH.....	41
6. CONCLUSÕES.....	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1. INTRODUÇÃO

O Estado de São Paulo é o principal responsável pela expansão da cultura da cana-de-açúcar no Brasil. Devido à alta capacidade produtiva por hectare, dada pelas condições climáticas adequadas e pela qualidade do solo, o setor sucroalcooleiro, desde a década de 1970, com a instituição do Proálcool, tem sido objeto de pesquisa de instituições públicas e privadas. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), São Paulo foi responsável por 5.190,4 mil hectares em áreas de mudas, plantio e colheita, que se traduziram na produção de 332.880,6 mil toneladas de cana-de-açúcar na Safra 2018/2019. Esse crescimento, inerentemente, é acompanhado pelo aumento da aplicação de fertilizantes, herbicidas e pesticidas. Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (SINDIVEG), atualmente, 81% dos defensivos agrícolas utilizados no Brasil são destinados às culturas de soja, milho, algodão e cana-de-açúcar (SINDIVEG, 2019, p.18).

O potencial de contaminação de recursos hídricos, portanto, é uma crescente preocupação frente ao intensivo uso pré e pós-emergencial de herbicidas na cana-de-açúcar. O problema é agravado quando se trata de áreas de recarga de aquíferos, com solo de composição predominantemente arenosa, sendo ocupadas por atividades agrícolas onde ocorre expressiva aplicação de agroquímicos. (BRITTO *et al.*, 2012, p.391).

O uso de destes produtos, em aditivo à retirada da vegetação ciliar para o preparo do solo para cultivo, também confere forte potencial de lixiviação e contaminação dos corpos hídricos superficiais em áreas adjacentes às lavouras. Os herbicidas apresentam potencial de bioacumulação em diferentes níveis tróficos, como por exemplo na gordura de peixes e crustáceos, no leite de mamíferos e, principalmente, em organismos do topo da cadeia trófica. (CORBI *et al.*, 2006, p.61). Quando aplicados diretamente ao solo, eles podem ser degradados por vias químicas ou metabolizados por microrganismos. Contudo, moléculas de alta persistência podem permanecer inalteradas no ambiente, serem adsorvidas a partículas de solo e eventualmente carregadas pelas águas superficiais. (BRITTO *et al.*, 2012, p.391).

A ametrina (2-etilamina-4-isopropilamina-6-metiltio-s-2,4,6-triazina) é o ingrediente ativo do Gesapax® 500 CIBA GEIGY, um herbicida comercializado no Brasil para o controle de plantas infestantes nas culturas da cana-de-açúcar e de milho. É um composto altamente solúvel e persistente no solo. Pode, assim, ser facilmente lixiviado pela chuva, inundações ou irrigação de culturas. Uma vez que atinge um corpo d'água, a ametrina pode interferir na microbiota local e prejudicar o crescimento de algas, resultando em um ecossistema em desequilíbrio.

Os microrganismos nativos do solo são capazes de influenciar o comportamento dos herbicidas no ambiente. Eles possuem a capacidade de metabolizar compostos por meio da produção enzimática, convertê-los em energia e utilizá-los como nutrientes para sua sobrevivência. A degradação dos herbicidas por ação microbiana, normalmente, leva à formação de compostos menos tóxicos, CO₂ e água (RÉGO, 2017, p.16). Neste sentido, foram desenvolvidas metodologias que utilizam os microrganismos como ferramenta de defesa ambiental.

A biorremediação consiste no uso de organismos, sejam eles fungos, bactérias, algas ou mesmo vegetais, como ferramentas para a recuperação de ambientes contaminados. No caso dos microrganismos, pode ser realizada por meio de um ou mais consórcios microbianos, indígenas ou não, para a degradação de contaminantes orgânicos (PEREIRA; FREITAS, 2012).

O presente trabalho procura verificar a eficiência de microrganismos autóctones na biodegradação da ametrina em meio líquido, pressupondo a contaminação de corpos hídricos próximos a áreas de cultivo de cana-de-açúcar. Para tal, foi realizada a seleção de espécies microbianas nativas do solo aptas a consumir o contaminante, testes de respirometria em frascos de Bartha & Pramer, medições de pH e condutividade e testes de ecotoxicidade com sementes de alface e rúcula.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

Avaliar a biodegradação da ametrina em meio líquido e verificar sua ecotoxicidade.

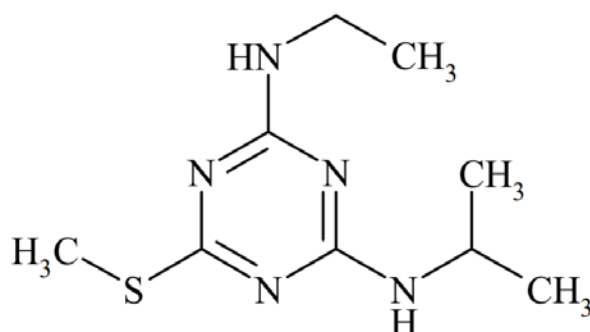
2.2 Específicos

- Selecionar microrganismos nativos capazes de degradar a ametrina através de microbiota bioaumentada;
- Avaliar a biodegradação da ametrina através da técnica de respirometria em frascos de Bartha & Pramer;
- Medir pH e condutividade para auxiliar na conclusão sobre a eficiência da biodegradação da ametrina em meio aquoso;
- Verificar a ecotoxicidade da ametrina no solo através de testes de germinação de sementes de alface e rúcula e concluir a segurança da sua liberação ambiental.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Ametrina

A ametrina ($C_9H_{17}N_5S$) (Figura 1), de nome comercial Gesapax® 500 CIBA GEIGY, pertence à família das s-triazinas e encontra-se entre os cinco herbicidas mais utilizados no cultivo de cana-de-açúcar no Brasil. O grupo das triazinas é o maior dentro da classe de herbicidas, representando 30% da produção mundial de agroquímicos para o controle de daninhas. Sua utilização teve início na década de 1950, nos Estados Unidos, e ainda hoje é comum no controle pré e pós-emergencial de plantas infestantes. Sendo um composto razoavelmente estável, a ametrina apresenta meia-vida de 20 a 100 dias, é muito móvel no ambiente, devido a suas propriedades físico-químicas, e persistente tanto na água quanto no solo. Seus resíduos e metabólitos podem ser encontrados em águas subterrâneas mesmo depois de longos períodos após sua aplicação (CABRAL et al., 2003, p.41). A Tabela 1 apresenta as características físico-químicas da ametrina.

Figura 1: Fórmula estrutural da ametrina.

Fonte: United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2005.

Tabela 1: Características físico-químicas da ametrina.

Nome comum	Meia Vida (Dias)	Solubilidade (H₂O) à 20-25°C (mol/L)	Pressão de vapor Pa	pKa 21°C
Ametrina	20-100	200	1,12x10 ⁻⁴	4,1

Fonte: Adaptado de RÉGO, 2017, p.20.

Quando em contato com a vegetação, a ametrina apresenta capacidade inibidora da fotossíntese e outros processos enzimáticos, é absorvida pela raiz e transportada até as folhas, onde acumula-se, principalmente, nos meristemas apicais e nos cloroplastos, provocando clorose, necrose e morte da planta. Assim, apresenta um nível de ecotoxicidade que pode prejudicar o desenvolvimento vegetal, principalmente de dicotiledôneas (USEPA, 2005; SYNGENTA, 2019).

De acordo com a bula, recomenda-se a aplicação do Gesapax® 500 CIBA GEIGY em períodos de chuva, ou a irrigação da área de cultivo após a administração do tratamento, uma vez que a água promove a incorporação uniforme do produto na camada superficial. Sabendo-se que em 1 L do produto comercial contém 500 g de ametrina, a Tabela 2 apresenta as condições para aplicação na pré-emergência das plantas infestantes na cultura de cana-de-açúcar:

Tabela 2: Condições de aplicação do Gesapax® 500 CIBA GEIGY.

PLANTAS INFESTANTES CONTROLADAS	DOSES (L p.c./ha) Solo Leve Médio Pesado			OBSERVAÇÃO	VOLUME DE CALDA	NÚMERO DE APLICAÇÕES
Monocotiledôneas	5-6	6-7	6-8	Doses maiores nas altas infestações e solos com teor de matéria orgânica elevada.	200 – 400 L/ha (aplicação terrestre)	Desde que aplicado nas condições adequadas e com a observância dos parâmetros recomendados, normalmente, uma aplicação é suficiente para atender as necessidades da cultura.
Capim-marmelada (<i>Brachiaria plantaginea</i>)						
Trapoeraba (<i>Commelina benghalensis</i>)						
Capim-colchão (<i>Digitaria horizontalis</i>)						
Capim-pé-de-galinha (<i>Eleusine indica</i>)						
Dicotiledôneas	5-6	6-7	6-8	Doses maiores nas altas infestações e solos com teor de matéria orgânica elevada.	300 – 400 L/ha (aplicação dirigida)	
Carrapicho-de-carneiro (<i>Acanthospermum hispidum</i>)						
Caruru-roxo (<i>Amaranthus hybridus</i>)						
Caruru-de-mancha (<i>Amaranthus viridis</i>)						
Picão-preto (<i>Bidens pilosa</i>)						
Falsa-serralha (<i>Emilia sonchifolia</i>)					40 a 50 L/ha (aplicação aérea)	
Corda-de-violão (<i>Ipomoea purpurea</i>)						
Beldroega (<i>Portulaca oleracea</i>)						
Poaia-branca (<i>Richardia brasiliensis</i>)						
Guanxuma (<i>Sida cordifolia</i>)						

Fonte: Gesapax® 500 CIBA-GEIGY, 2019.

3.2 Contaminação de solos e água por herbicidas

O processo de contaminação ambiental por herbicidas está diretamente relacionado à capacidade do contaminante em se movimentar tanto vertical como lateralmente no solo. Com a influência da ação gravitacional, substâncias móveis são mais suscetíveis a atingirem o nível freático, provocando a contaminação de aquíferos. Muitos são os fatores que influenciam essa movimentação, entre eles a volatilização do contaminante, a porosidade e granulometria do solo, e o escoamento superficial (*run-off*). Lixiviação é o fenômeno que consiste no carregamento das moléculas do herbicida em solução em direção a corpos hídricos subterrâneos. Ela é influenciada pelas propriedades de sorção e persistência do contaminante, assim como o teor de matéria orgânica presente e a quantidade de água que percola pelo perfil de solo. As características físicas do mesmo, como porosidade, densidade e permeabilidade também são fatores determinantes do potencial de lixiviação. Em áreas de plantio direto, a ocorrência de agroquímicos em

corpos d'água é elevada, devido à alta quantidade de macroporos e canais no perfil do solo, formados pela macrofauna e pelas raízes (RÉGO, 2017, p.25).

Tendo isso em vista, em 2005, foi publicada a Resolução CONAMA 357/05, que incluiu testes ecotoxicológicos à legislação federal que regula a qualidade de águas para abastecimento humano e para a vida aquática. Nela, os corpos hídricos são classificados em classes de qualidade ambiental e são estabelecidos as condições e o padrão de lançamentos de efluentes permitidos a cada classe (BRASIL, 2019).

Em estudo conduzido por Armas *et al.* (2007, p.1-11), foi realizado um diagnóstico da ocorrência de moléculas de herbicidas nas águas do Rio Corumbataí, que integra a bacia hidrográfica Piracicaba/Capivari/Jundiaí (UGRHI 05). Dentre contaminantes de diversos grupos, foram identificados quali-quantitativamente resíduos de herbicidas do grupo das triazinas (ametrina, atrazina e simazina) nas amostras de água. Contudo, apenas a ametrina foi identificada em nível quantificável em um único local. Também, foi possível concluir que os níveis mais elevados da ocorrência de moléculas de herbicidas no Rio Corumbataí se deram no mês de novembro, coincidindo com o início do período de chuvas, o qual aumenta o potencial de lixiviação dos contaminantes (ARMAS *et al.*, 2007, p.1-11).

3.3 Biorremediação e seleção de microrganismos

Biorremediação é uma técnica de tratamento de áreas contaminadas que utiliza a biotecnologia para acelerar a transformação de compostos químicos em produtos menos tóxicos (TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010, p.1014). A biodegradação depende, principalmente, da presença de microrganismos capazes de metabolizar a molécula original e seus produtos de degradação (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005, p.37).

Para iniciar a biorremediação microbiana é necessário selecionar os microrganismos adequados, sejam eles autóctones ou alóctones. Para a obtenção de microrganismos indígenas, portanto, é necessário estudar as colônias que habitam locais com histórico de contaminação. De maneira lógica, se um grupo de organismos é capaz de sobreviver e se multiplicar em um sítio com altas concentrações de uma substância contaminante, existe grande probabilidade de que

eles possuam metabolismo adaptado à degradação da mesma (BRITO *et al.*, 2010, p.296). Assim, o uso de microrganismos selecionados a partir do meio natural contaminado representa uma estratégia importante e de baixo custo, com vista na obtenção de agentes para a biorremediação destas áreas.

Para concluir a eficiência de uma tecnologia de biorremediação é importante verificar o processo de biodegradação sob condições controladas. Ensaio laboratoriais são capazes de medir qualitativa e quantitativamente o potencial de determinado tratamento na remoção de substâncias específicas (MARIANO, 2006, p.38).

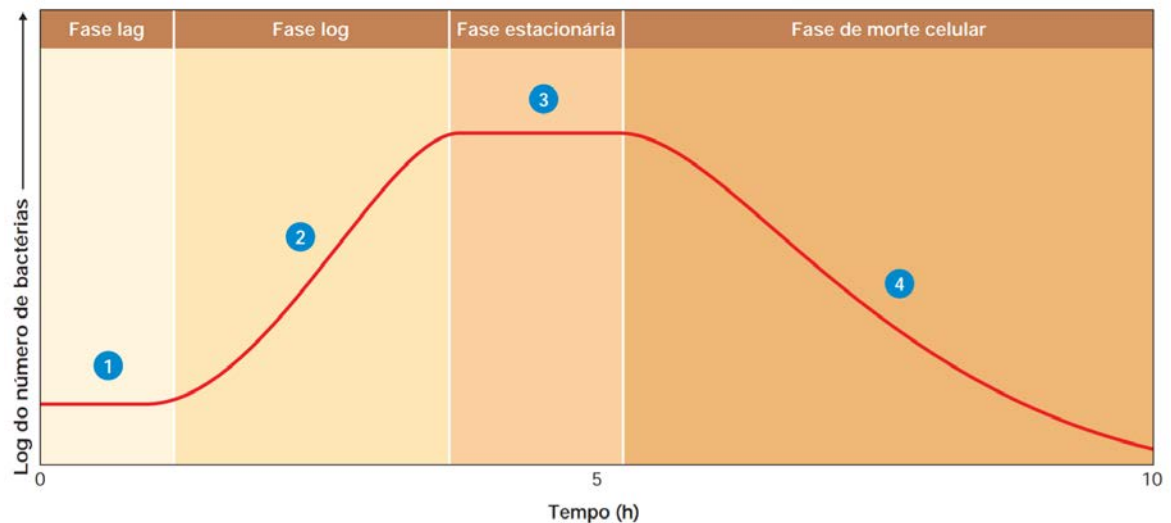
3.4 Crescimento Bacteriano

Em microbiologia, o termo crescimento refere-se ao aumento, em número, de indivíduos, e não em tamanho. Quando em condições favoráveis à sua multiplicação, os microrganismos tendem a acumular-se em populações, ou colônias. Os fatores necessários para o crescimento microbiano dividem-se em duas categorias: físicos e químicos. Os fatores físicos compreendem as condições de temperatura, pH, e pressão osmótica; enquanto os químicos envolvem a disposição de nutrientes, fontes de carbono, nitrogênio, enxofre, oxigênio e matéria orgânica. A maioria dos microrganismos se desenvolve bem em temperatura ideal aos seres humanos (25 a 40 °C) e pH próximo à neutralidade (entre 6,5 e 7,5). Uma vez que as células microbianas são compostas por aproximadamente 80% de água, condições elevadas de pressão osmótica podem resultar na perda de água para o ambiente, o que inibe o seu crescimento. O carbono é o esqueleto estrutural de qualquer matéria viva, e, portanto, é essencial para a manutenção da atividade celular. A principal fonte de carbono é a matéria orgânica, como as proteínas, lipídeos e carboidratos. (TORTORA, 2012, p. 157).

O crescimento bacteriano pode ser representado graficamente através de uma curva (Figura 2) que indica o crescimento das células em função do tempo. Esse padrão pode ser observado quando as bactérias são inoculadas em meio líquido de crescimento e a população é contada em intervalos regulares (TORTORA, 2012, p. 172).

A curva de crescimento pode ser dividida em quatro fases básicas:

Figura 2: Curva de crescimento bacteriano.



Fonte: TORTORA, 2012, p. 173.

1- Fase lag ou de retardo: período de pouca ou nenhuma divisão celular, no qual os microrganismos passam pelo processo de adaptação enzimática para se tornarem capazes de degradar o substrato;

2- Fase log ou de crescimento exponencial: momento de maior atividade metabólica, com taxa constante de crescimento, dada pela disponibilidade em excesso de nutrientes no meio;

3- Fase estacionária: o esgotamento de nutrientes causa a estabilização temporária da população, quando o número de mortes se iguala ao número de células novas;

4- Fase de morte celular: quando o número de mortes devido à escassez de substrato ultrapassa o número de células novas e a população entra em declínio logarítmico.

3.5 Método da Respirometria

A eficiência da biorremediação pode ser medida através da avaliação da atividade microbiana na presença da substância contaminante. No cenário aeróbio, a respiração é um importante parâmetro para avaliar a biodegradação. A taxa de respiração é representada pela quantidade de oxigênio consumido ou de CO₂ produzido, por unidade de volume e tempo, por microrganismos aeróbios; e pode ser

relacionada a outros dois fatores relevantes para o processo de descontaminação: o crescimento bacteriano e o consumo de substrato (ANDREO,1999, p.8).

É possível, portanto, realizar a medição desses parâmetros sob condições controladas através do uso de respirômetros, que consistem em equipamentos capazes de medir o consumo de O_2 ou produção de CO_2 , ao colocarem em contato o substrato a ser consumido, a biomassa e o oxigênio. No Brasil, a técnica respirométrica de maior destaque é baseada no uso de respirômetros de Bartha & Pramer (1965). Estes, são capazes de medir a liberação de CO_2 através da sua captura por uma solução alcalina, comumente o hidróxido de potássio (KOH) ou o hidróxido de sódio (NaOH). Com a adição de cloreto de bário ($BaCl_2$), a solução alcalina precipita-se na forma de carbonato de bário ($BaCO_3$) e, quando titulada com ácido clorídrico (HCl), permite o cálculo da produção de gás carbônico (COSTA, 2009, p. 23). Ao fim da análise, é gerado um gráfico que permite identificar o tempo de maior atividade metabólica, assim como o valor de produção máxima de CO_2 .

No Estado de São Paulo e no Brasil, respectivamente, as normas que regulam as atividades envolvidas na técnica de respirometria são: a norma técnica L6.350 da CETESB: ““Solos - determinação da biodegradação de resíduos - método respirométrico de Bartha - Método de ensaio”; e a ABNT NBR 14.283/99: “Resíduos em solos - Determinação da biodegradação pelo método respirométrico”. Ambas foram canceladas devido à popularização de outras técnicas de respirometria, contudo, ainda norteiam os trabalhos, principalmente acadêmicos, que fazem uso dos respirômetros de Bartha & Pramer.

3.6 Biodegradação e Modelagem Matemática

Em estudos de biorremediação, a utilização de modelagem matemática e estatística auxilia na compreensão da dinâmica populacional dos microrganismos. A atividade microbiana, durante o processo de biodegradação, é regulada pela quantidade de substrato disponível para consumo. Em situações de contaminação, quando a disponibilidade de nutrientes é restrita, é possível representar graficamente a queda na taxa de utilização de oxigênio e, conseqüentemente, na produção de gás carbônico, por parte dos microrganismos. Com base no fenômeno de crescimento bacteriano, descrito no Item 3.4, portanto, é possível fazer o uso de

modelos de produção de CO₂ para o ajuste dos dados respirométricos e concluir sobre a eficiência dos métodos de biorremediação adotados (CARMONA, 2016, p. 26).

3.7 Ecotoxicidade e testes com sementes

A ecotoxicologia é um campo emergente da ciência, que descreve a forma com que os ecossistemas são capazes de metabolizar, degradar, acumular, transformar ou serem afetados pela toxicidade de contaminantes neles introduzidos (RÉGO, 2017, p.69). Bioindicadores são seres vivos que, ao serem expostos a uma substância química específica, desempenham o papel de indicar a sua ecotoxicidade. No caso da fitotoxicidade, a influência de um agente pode ser conclusiva através da germinação e crescimento, ou não, das sementes de uma espécie vegetal arbitrária.

A germinação pode ser compreendida como um fenômeno biológico que ocorre quando o embrião deixa o repouso fisiológico e passa a exercer atividade metabólica, em condições ambientais favoráveis. Portanto, com eventuais alterações no meio, o desenvolvimento do tecido vegetal pode ser afetado (CARMONA, 2016, p.25). É por meio da absorção de água que a respiração e demais atividades metabólicas são intensificadas. Assim, caso a água esteja contaminada, o crescimento vegetal pode ser prejudicado (ASAHIDE et al., 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo e coleta do solo

O solo utilizado para a seleção dos microrganismos autóctones adaptados à degradação do contaminante foi retirado de um canteiro do Jardim Experimental da UNESP Campus de Rio Claro (Figura 4), localizado nas coordenadas geográficas 22°23'47.21"S e 47°32'39.59"W, no dia 19 de março de 2019.

Coletou-se 3 kg de solo, que foram colocados em um saco plástico e levados ao laboratório, onde foram peneirados e acrescidos de 50 ml de solução de ametrina (6,25 µg/mL). Em seguida, o saco foi vedado, perfurado com furos distantes, aproximadamente, em 1 cm entre si, e levado de volta ao Jardim Experimental, onde foi enterrado no mesmo local da retirada do solo. Essa prática

tem o objetivo de promover, através da microbiota aumentada, a seleção dos microrganismos mais adaptados ao consumo da ametrina.

A coleta foi feita de acordo com a norma técnica L6.350 da CETESB, que determina que o tempo adequado para a seleção dos microrganismos é de 15 dias. No dia 02 de abril de 2019, desenterrou-se o saco plástico para o preparo do líquido-base.

Figura 3: Saco plástico antes e após enterramento.



Fonte: Autora, 2019.

Figura 4: Canteiro do Jardim Experimental.



Fonte: Autora, 2019.

4.2 Líquido-base

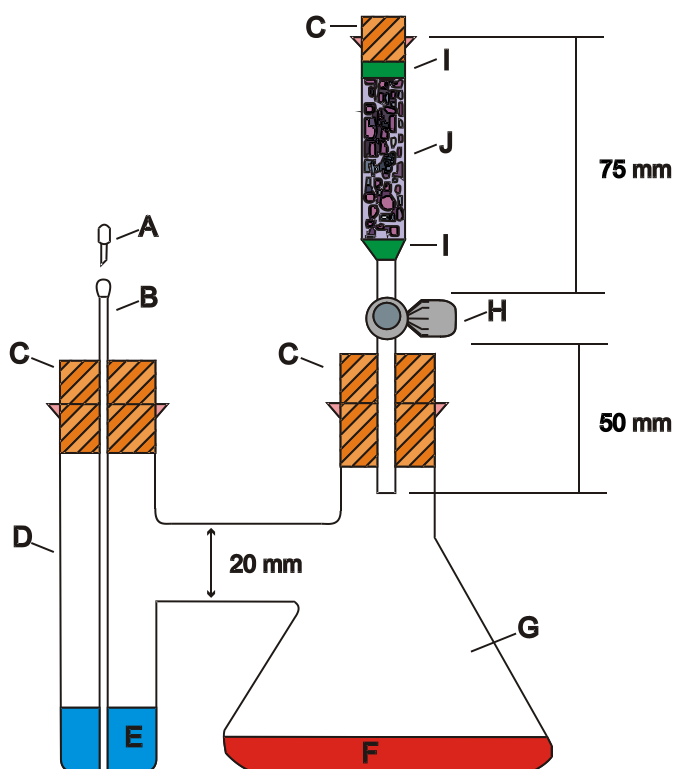
Após desenterrado o saco plástico, o solo foi novamente peneirado, para a retirada de material grosseiro e insetos, e foram pesadas em balança digital duas porções de 1 kg (cada uma), para o preparo do líquido-base. Cada porção foi diluída em 1,5 L de água destilada, reservada em frasco de vidro âmbar, e mantida em refrigeração.

4.3 Ensaio de Respirometria

A proposta dos ensaios de respirometria é analisar a ação de microrganismos selecionados na biodegradação da ametrina, em concentração recomendada para uso em campo.

Os respirômetros de Bartha & Pramer baseiam-se na captação do CO_2 produzido durante a respiração microbiana por uma solução alcalina (KOH 0,2 mol/L) e na titulação da mesma com ácido (HCl 0,1 mol/L). Esse procedimento foi repetido semanalmente para a quantificação periódica da respiração. A Figura 5 ilustra o respirômetro e cada um de seus componentes.

Figura 5: Respirômetro de Bartha & Pramer.



Fonte: Montagnolli *et al.*, 2009.

Onde:

- A: Tampa da cânula;
- B: Cânula ($\varnothing$ entre 1 e 2 mm);
- C: Rolha utilizada para vedar D e G;
- D: Braço lateral ($\varnothing$ ~40mm; H~100mm);
- E: Solução alcalina (KOH 0,2 mol/L);
- F: Líquido-base ou solo (contém a substância a ser degradada);
- G: Frasco de Erlenmeyer 250 ml;
- H: Válvula;
- I: Suporte (lã de vidro ou algodão);
- J: Filtro de ascarita ($\varnothing$ ~15mm; H~40mm).

4.3.1 Cálculos da concentração e volume de ametrina

A concentração a ser usada nos ensaios de respirometria foi calculada a partir dos valores indicados para a aplicação terrestre do Gesapax® CIBA GEIGY. Foi adotada a concentração de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ (3 L/ha), recomendada para o uso em campo, em cultura de cana-de-açúcar, tendo em vista que 1 L do herbicida contém 500 g de ametrina.

Foi decidido variar os ensaios respirométricos em volume de ametrina. A partir dos valores recomendados pela bula (Tabela 2) para o volume de calda, escolheu-se, hipoteticamente, a área de aplicação de 1 m². Para a montagem dos respirômetros, adotou-se a parcela de ametrina contida na solução a ser aplicada na área escolhida (120 μL) e variou-se o volume supondo o uso excessivo do herbicida (240 μL), conforme a Tabela 3, no item a seguir.

4.3.2 Montagem dos respirômetros

Para possibilitar a análise da biodegradação da ametrina em meio aquoso, optou-se por utilizar nos testes respirométricos, o líquido-base preparado com solo rico em microrganismos nativos. Para tal, foi necessário filtrá-lo, para que o excesso de matéria orgânica e demais nutrientes não influenciasse na respiração dos microrganismos. Anteriormente à montagem dos respirômetros foi necessário, também, preparar os reagentes que seriam utilizados ao longo das semanas de análise. São eles:

- Hidróxido de Potássio (KOH 0,2 M);
- Ácido clorídrico (HCl 0,1 M);
- H₂O isenta de CO₂;
- Fenolftaleína 1% alcoólica;
- Cloreto de bário (BaCl₂ 0,1 M).

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, totalizando 9 respirômetros de Bartha & Pramer. Para o ensaio controle (respirômetros C1, C2 e C3), foram adicionados 100 ml do líquido-base em cada respirômetro. Aos ensaios de número 1 (respirômetros 1.1, 1.2 e 1.3) e 2 (respirômetros 2.1, 2.2 e 2.3), inicialmente, foram adicionados 120 e 240 µL da solução de ametrina (6,25 µg/mL), respectivamente, e em seguida completou-se com o líquido-base até a marcação de 100 mL do frasco. A Tabela 3 explicita o conteúdo dos ensaios realizados.

Tabela 3: Conteúdo de cada respirômetro.

ENSAIOS	CONTEÚDO
Controle (C)	100 ml de líquido-base
1	99,88 mL de líquido-base + 120 µL de ametrina
2	99,76 mL de líquido-base + 240 µL de ametrina

Fonte: Autora, 2019.

No braço lateral de cada respirômetro foram adicionados 10 mL de solução de hidróxido de potássio (KOH 0,2 M), cuja finalidade é de capturar o gás carbônico produzido e possibilitar a quantificação da respiração microbiana. Por fim, os frascos foram hermeticamente fechados e mantidos em incubadora a $28 \pm 0,1$ °C (Figura 6).

Figura 6: Ensaios respirométricos na incubadora.



Fonte: Autora, 2019.

4.3.3 Titulação do KOH residual

Após 7 dias de incubação, os respirômetros foram retirados para a realização da primeira análise semanal. A quantificação do CO_2 produzido foi possível através da titulação do hidróxido de potássio (KOH 0,2 M) residual com uma solução padrão de ácido clorídrico (HCl 0,1 M).

Primeiramente, foram retiradas a rolha do filtro de ascarita e a tampa da cânula, que vedavam o sistema, e abriu-se a válvula para a remoção do CO_2 excedente no frasco. O KOH foi retirado do braço do respirômetro, com o auxílio de uma seringa de plástico de 20 mL, e depositado em um frasco Erlenmeyer de 125 mL, onde foram adicionados 1 mL de BaCl_2 0,1 M e duas gotas do indicador ácido-base fenolftaleína. Foi realizada a lavagem do braço do respirômetro, injetando-se com a seringa 10 mL de água isenta de CO_2 e, em seguida, transferindo-a para o Erlenmeyer. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes, totalizando 30 mL de água. Para os ensaios controle (C), foi realizada apenas uma lavagem do braço e outros 20 mL de água isenta foram injetados diretamente no Erlenmeyer. O conteúdo deste foi titulado imediatamente, utilizando-se de uma bureta graduada de 25 mL preenchida com HCl . Com a cânula do braço lateral aberta, o respirômetro foi conectado a uma bomba de ar comprimido, para garantir a reoxigenação do sistema. Durante a titulação, o líquido foi submetido a agitação magnética, até que se

atingisse o ponto de virada, no qual a amostra passa de cor-de-rosa a incolor (Figura 7). Buscou-se adotar o mesmo padrão visual para o ponto de virada de todas as amostras. Anotou-se, então, o volume de HCl necessário para a titulação do KOH residual e novos 10 mL de KOH foram inseridos no braço. Finalmente, o respirômetro foi vedado e levado a incubadora até a próxima medição.

Figura 7: Coloração do ponto de virada adotado pela autora.



Fonte: Autora, 2019.

Como base para a próxima determinação de CO₂, o mesmo procedimento de titulação foi realizado em um ensaio em branco, contendo 10 mL da solução de KOH 0,2 M, 30 mL de água isenta de CO₂, 2 gotas de fenolftaleína e 1 mL de solução de BaCl₂ 0,1 M.

A quantificação do gás carbônico produzido no processo de biodegradação foi possível através da conversão baseada na relação entre o volume de HCl consumido na titulação de cada ensaio e na titulação do branco, conforme a equação 1:

$$GCO_2 = (A - B) * 50 * \theta_{HCl} * 0,044 \quad (1)$$

Onde:

- GCO₂: geração de gás carbônico;
- A: volume de HCl 0,1 M gasto (em mL) na titulação do branco;
- B: volume de HCl 0,1 M gasto (em mL) na titulação da amostra;

- 50: fator para transformar equivalente em μmol de CO_2 ;
- θ (HCl): fator do HCl 0,1 M;
- 0,044: fator para transformar μmol em mg de CO_2 .

4.4 Modelagem matemática e softwares utilizados

Segundo Montagnolli (2011, p.84) para a obtenção dos gráficos de CO_2 produzido em relação ao tempo, é necessário ajustar os dados respirométricos a modelos matemáticos já existentes. A Equação 2 é uma adaptação da equação logística de Schmidt et al. (1985), que foi utilizada por fornecer a previsão da produção máxima de CO_2 no processo de biodegradação.

$$B = (B_{\text{max}})/((1 + [(B_{\text{max}} - B_0)/B_0] e^{-rt})) \quad (2)$$

Onde:

- B: CO_2 produzido;
- B_{max} : valor de produção máxima de CO_2 ;
- B_0 : valor da produção inicial de CO_2 ;
- r: taxa máxima de produção específica; e
- t: tempo.

A Equação 3 representa o modelo proposto por Membré et al. (1996) para crescimento e morte de comunidades microbianas:

$$B = [((\frac{1}{K_1}) e^{-m_1 r}) + ((\frac{1}{K_2}) e^{m_2 t})]^{-1} \quad (3)$$

Onde:

- B: CO_2 produzido;
- K_1 : constante de aumento de produção;
- K_2 : constante de diminuição de produção;
- m_1 : taxa de aumento na produção de CO_2 ;
- m_2 : taxa de diminuição na produção de CO_2 ; e
- t: tempo.

As equações auxiliaram na geração dos gráficos de produção acumulada e semanal de CO_2 . Para isso foi utilizada a plataforma SYSTAT SIGMAPLOT 14.0. O Microsoft Office Excel também foi utilizado para o processamento dos dados

laboratoriais, confecção de gráficos e tabelas.

4.5 Teste de ecotoxicidade com sementes de alface e rúcula

A análise da fitotoxicidade da ametrina foi baseada nos testes de respirometria. Como estes foram realizados em triplicata, o conteúdo de cada respirômetro de Bartha & Pramer foi tido como um ensaio isolado para os testes de toxicidade. O principal objetivo desta análise é comparar o crescimento vegetal nas situações anterior e posterior ao processo de biodegradação, para que se possa concluir a eficiência da biorremediação. Para cada uma dessas situações foram feitos: ensaios de controle, utilizando o líquido-base sem a adição de contaminante; e ensaios com o conteúdo de cada respirômetro.

As sementes escolhidas como bioindicadores foram as de alface manteiga (*Lactuca sativa*), da marca Isla Sementes (Lote: 111453-021-S2 Valido até: nov/2019), e de rúcula (*Eruca sativa*), também da marca Isla Sementes (Lote: 116177-003-S2 Válido até: jun/2020), ambas livres de tratamento químico anterior.

Cada um dos ensaios apresentados abaixo (Tabela 4) foi realizado separadamente com sementes de alface e rúcula, totalizando 36 placas de Petri.

Tabela 4: Conteúdo dos ensaios de ecotoxicidade.

	ENSAIOS		CONTEÚDO
ANTES DA BIODEGRADAÇÃO	CONTROLE (C)	AC1	4 mL do líquido-base + 20 sementes
		AC2	
		AC3	
	1	A1.1	4 mL do conteúdo do respirômetro 1.1 + 20 sementes
		A1.2	4 mL do conteúdo do respirômetro 1.2 + 20 sementes
		A1.3	4 mL do conteúdo do respirômetro 1.3 + 20 sementes
	2	A2.1	4 mL do conteúdo do respirômetro 2.1 + 20 sementes
		A2.2	4 mL do conteúdo do respirômetro 2.2 + 20 sementes
		A2.3	4 mL do conteúdo do respirômetro 2.3 + 20 sementes

DEPOIS DA BIODEGRADAÇÃO	CONTROLE (C)	DC1	4 mL do sobrenadante do respirômetro C1 + 20 sementes
		DC2	4 mL do sobrenadante do respirômetro C2 + 20 sementes
		DC3	4 mL do sobrenadante do respirômetro C3 + 20 sementes
	1	D1.1	4 mL do sobrenadante do respirômetro 1.1 + 20 sementes
		D1.2	4 mL do sobrenadante do respirômetro 1.2 + 20 sementes
		D1.3	4 mL do sobrenadante do respirômetro 1.3 + 20 sementes
	2	D2.1	4 mL do sobrenadante do respirômetro 2.1 + 20 sementes
		D2.2	4 mL do sobrenadante do respirômetro 2.2 + 20 sementes
		D2.3	4 mL do sobrenadante do respirômetro 2.3 + 20 sementes

Fonte: Autora, 2019.

Para cada ensaio foram adicionados 4 mL da solução em placas de Petri forradas com discos de papel de filtro. Para os testes anteriores ao processo de biodegradação, o líquido-base foi filtrado em bomba à vácuo, com o auxílio de funil de Büchner, filtro de papel e um kitassato. Já para os testes realizados após a biodegradação, foi coletada a solução sobrenadante de cada respirômetro, após as 12 semanas de análise. Em seguida, 20 sementes foram dispostas em fileiras de 6, 4 e 3 sementes, como ilustra a Figura 8, de forma a fornecer espaço suficiente para o desenvolvimento das plântulas.

Figura 8: Padrão de distribuição das sementes.



Fonte: Autora, 2019.

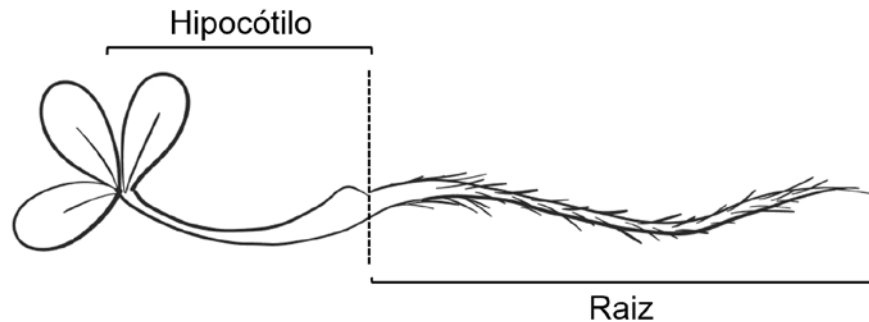
Depois de montadas, as placas foram vedadas com plástico-filme de PVC, para evitar a perda de umidade, e cobertas com papel alumínio, para impedir qualquer influência da luminosidade na germinação. Os ensaios foram incubados a 22 ± 1 °C durante 120 horas e então congelados, para impedir o desenvolvimento das sementes até a ocasião da contagem.

A influência da ametrina no crescimento vegetal foi verificada através de medições das principais estruturas de cada plântula: o hipocótilo e a raiz, como ilustrado na Figura 9. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentassem crescimento radicular maior ou igual a 2 mm. A partir disso, foi possível concluir sobre a toxicidade da ametrina, considerando-a: i) tóxica: caso obtivesse valor maior ou igual a 40% na mortalidade de sementes; ii) não tóxica: caso houvesse mortalidade entre 0 e 10% das sementes; e iii) com indícios de toxicidade: caso a mortalidade compreendesse entre 10 e 40% dos organismos (BARBOSA, 2000, p.110).

Após o descongelamento dos ensaios, cada plântula foi manuseada cautelosamente com o auxílio de uma pinça, para evitar o rompimento das suas estruturas, e estendida sobre uma placa feita de papel plastificado, especialmente

para facilitar o procedimento de contagem. As medições, realizadas com uma régua comum de 15 cm, consideraram separadamente os comprimentos do hipocótilo e da raiz de cada plântula.

Figura 9: Hipocótilo e raiz de uma plântula.



Fonte: Autora, 2019.

4.5.1 Germinação das sementes

Com os dados obtidos, foram calculados o índice de crescimento radicular (ICR) e o índice de germinação (IG), utilizando as seguintes fórmulas:

Equação de índice de crescimento radicular:

$$\text{ICR} = \text{CRA} / \text{CRC} \quad (4)$$

Onde:

- ICR: índice de crescimento;
- CRA: comprimento da radícula na amostra;
- CRC: comprimento da radícula no controle negativo.

Equação do índice de germinação:

$$\text{IG} = \text{ICR} \times (\text{SGA} / \text{SGC}) \times 100 \quad (5)$$

Onde:

- IG: índice de germinação;
- ICR: índice de crescimento;
- SGA: número de sementes germinadas na amostra;
- SGC: número de sementes germinadas no controle negativo.

4.6 Condutividade e pH

Foram realizadas medições de pH e condutividade a fim de proporcionar embasamento através da correlação entre os resultados obtidos nos testes de respirometria e toxicidade e as características físicas das amostras estudadas.

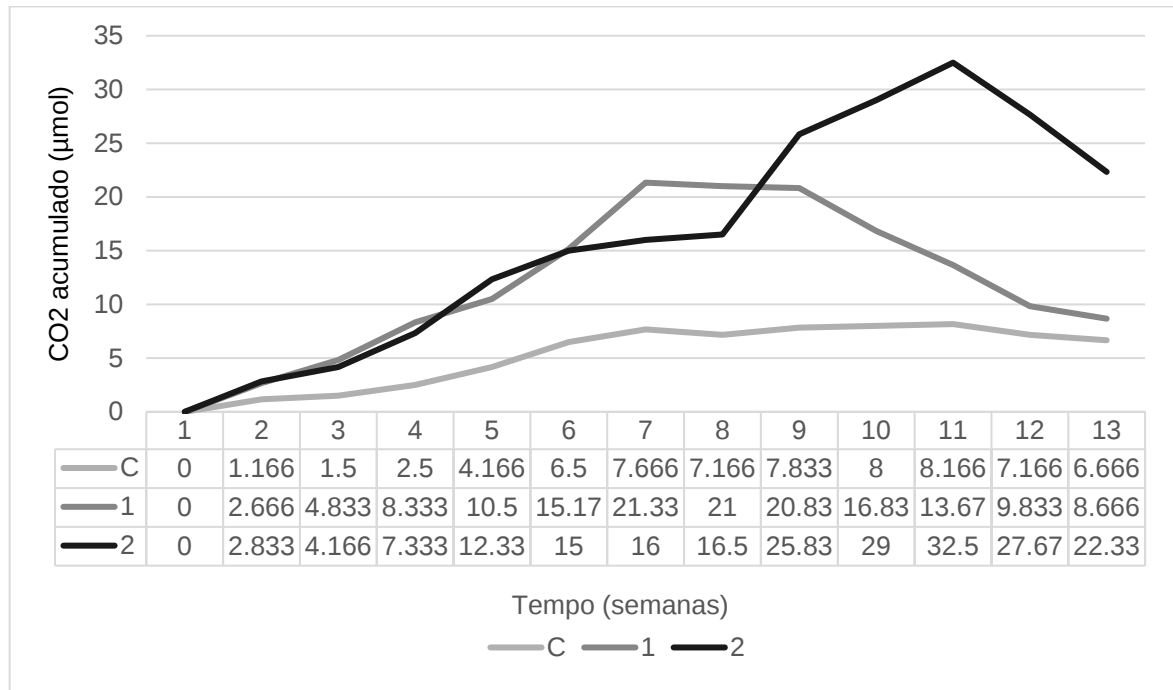
Primeiramente, foi necessário realizar a calibragem dos equipamentos. Para o condutímetro Tecnocon CA 150 utilizou-se soluções padrão de 10 e 100 mS/cm. Para o medidor de pH Digimed DMPH-2, as soluções padrão utilizadas foram de pH 4,0 e 7,0. A análise dividiu-se em duas etapas: anterior e posterior à biodegradação. Para o estudo anterior à biorremediação foram feitas medições de condutividade e pH do líquido-base sem adição de ametrina e com adição do contaminante nas proporções utilizadas nos testes respirométricos. Para a análise posterior ao processo de biodegradação foram coletadas alíquotas de 20 mL do líquido sobrenadante nos respirômetros ao fim das 12 semanas de medições de CO₂.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio de Respirometria

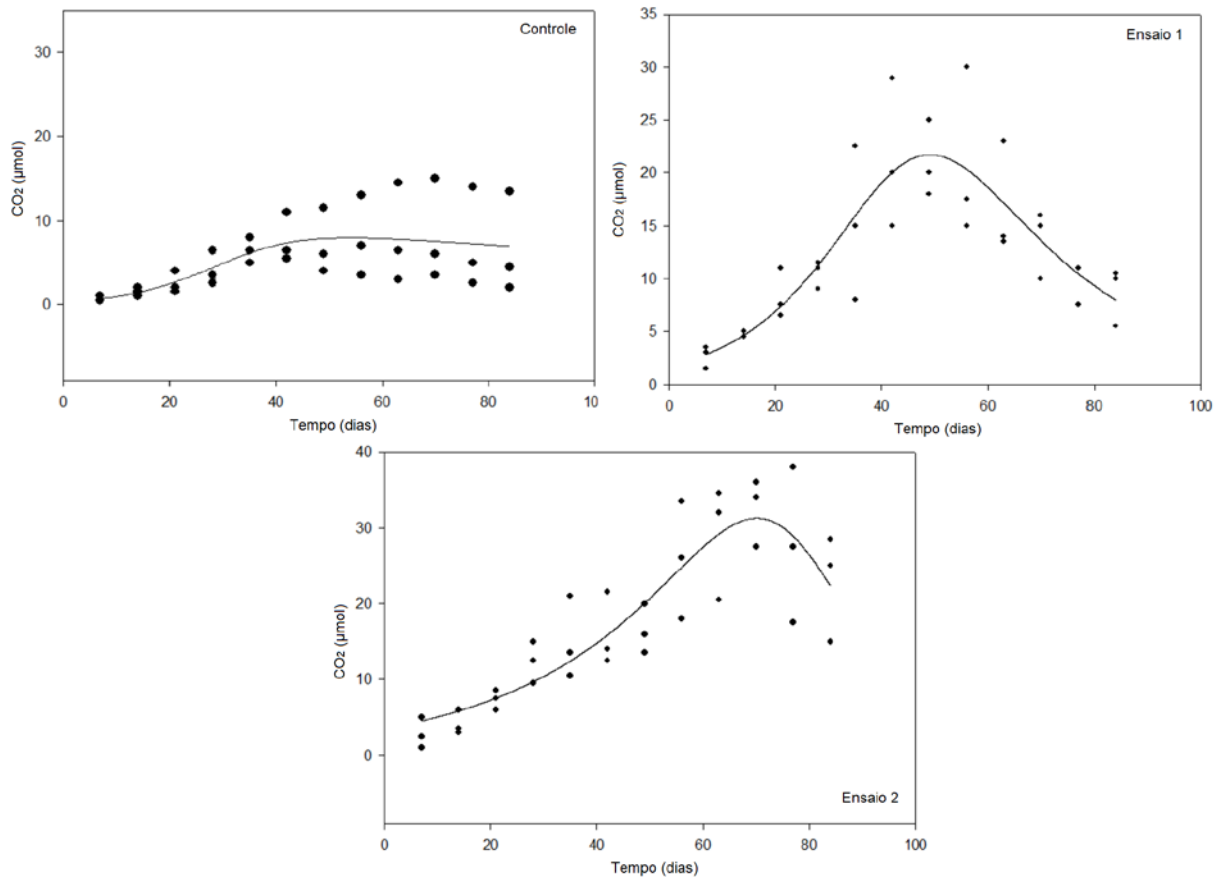
O acompanhamento semanal do processo de biodegradação possibilitou a obtenção dos dados respirométricos apresentados no Gráfico 1. Foi comparada a produção semanal de CO₂ medida em cada um dos ensaios.

Figura 10: Comparativo da produção semanal de CO₂.



Fonte: Autora, 2019.

Figura 11: Produção de CO₂ semanal.

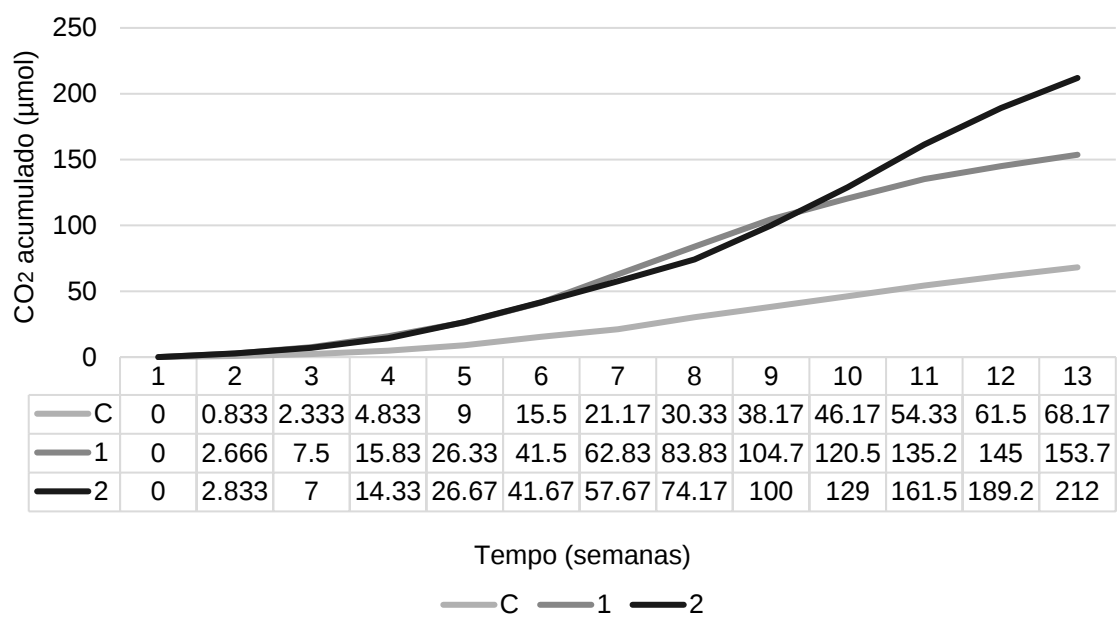


Fonte: Autora, 2019.

Como esperado, os respirômetros correspondentes ao ensaio controle apresentaram as menores taxas de respiração, não sendo possível identificar um pico na produção de CO₂. Isso pode ser justificado devido à menor quantidade de nutrientes a serem consumidos pelos microrganismos, em comparação às demais amostras. Os respirômetros do ensaio 1, por apresentarem menor quantidade de ametrina (120 µL), obtiveram como maior produção de CO₂ os valores de 29, 20 e 30 µmol de CO₂, respectivamente. Já os respirômetros do ensaio 2 registraram como maiores valores, respectivamente, 34,5, 34 e 38 µmol de CO₂. Analogamente ao ocorrido no ensaio controle, o ensaio de número 2 apresentou as maiores taxas de respiração, uma vez que continha maior quantidade de ametrina (240 µL) disponível para o consumo.

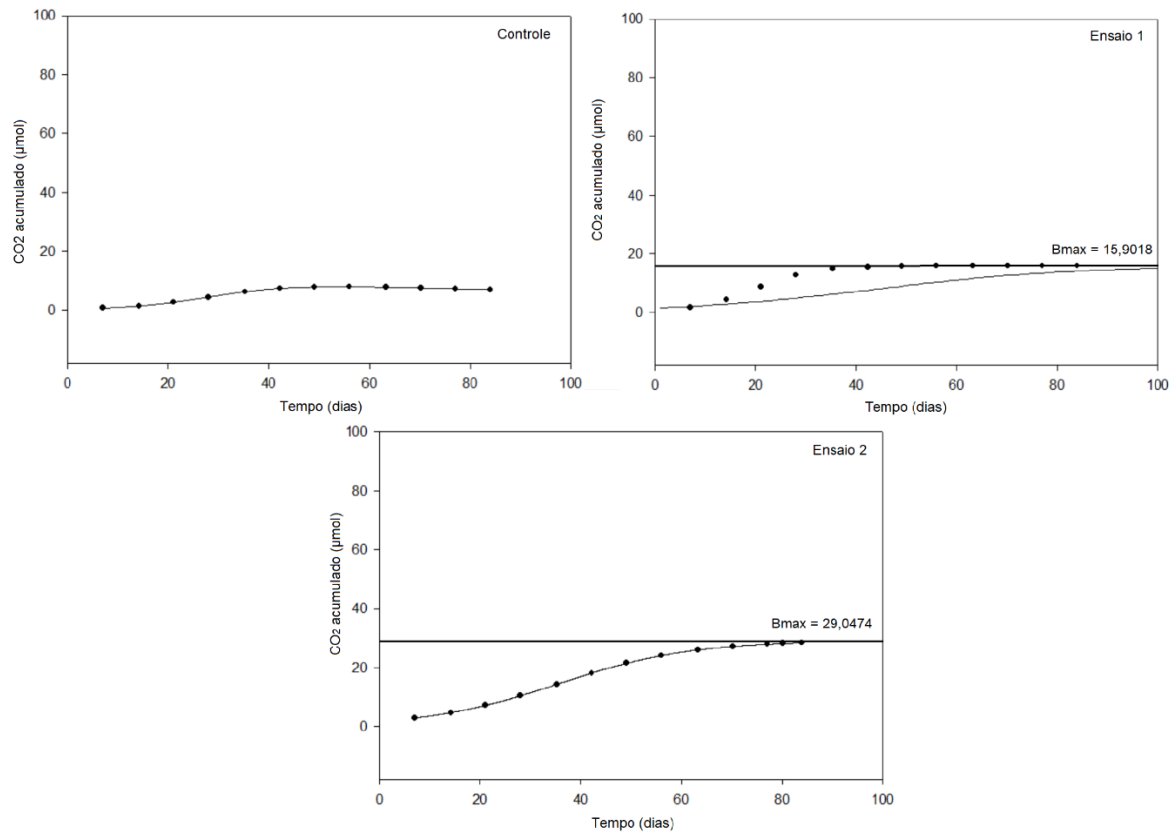
Para ambos os ensaios 1 e 2 foi possível notar o comportamento esperado de um consórcio microbiano quando em contato com substrato favorável ao seu desenvolvimento. Traçado o gráfico de dispersão dos dados respirométricos semanais, foram obtidas curvas de tendência que, aproximadamente nos 40 dias iniciais do estudo, indicaram comportamento referente à “fase log” do crescimento bacteriano. Entre 40 e 60 dias, nos três ensaios, pôde-se observar os maiores valores de produção de CO₂. Isso condiz com o período de meia-vida da ametrina, que varia entre 20 e 100 dias, como exposto no Item 3.1. Após os 70 dias, contudo, observa-se a queda na atividade metabólica dos microrganismos, que indica a “fase de morte celular” do crescimento bacteriano e pode ser justificada pelo esgotamento do contaminante.

Figura 12: Comparativo da produção acumulada de CO₂.



Fonte: Autora, 2019.

Figura 13: Produção acumulada de CO₂.



Fonte: Autora, 2019.

O Gráfico 2 representa a produção acumulada de CO₂ em cada ensaio e possibilita a visualização da discrepância entre as atividades metabólicas dos microrganismos contidos nos ensaios 1 e 2, em comparação com o ensaio controle.

A partir do ajuste dos dados respirométricos no software SYSTAT SIGMAPLOT 14.0, foi possível realizar a previsão dos valores para a máxima produção de CO₂ (Bmax) e para o tempo estimado de maior atividade microbiana (TBmax). Na Figura 11, a linha de Bmax indica o maior valor para a produção de CO₂, definido pelo modelo a partir do momento em que a curva de respiração é estabilizada. A análise destes indicadores permite identificar a eficiência dos microrganismos selecionados, assim como fornece uma previsão do tempo total de biodegradação.

Em relação ao ensaio controle, não foi possível obter o valor de Bmax, devido à inexpressividade dos dados. Pode-se dizer que, devido à baixa concentração de substrato nos respirômetros, os valores de CO₂ produzido ao longo das 12 semanas não apresentaram perfil de crescimento e declínio adequado à modelagem.

Tabela 5: Dados respirométricos (Bmax, TBmax e R²).

ENSAIOS	Bmax (μmol)	TBmax (dias)	R ²
C	-	-	-
1	15,9018	87,598	0,4262
2	29,0475	74,410	0,7373

Fonte: Autora, 2019.

A Tabela 5 apresenta os valores obtidos para Bmax, TBmax e para R², que é o coeficiente de determinação do modelo, ou seja, o fator que indica a variabilidade dos dados obtidos ao final da modelagem. Considerando os volumes da solução de ametrina adicionados em cada ensaio respirométrico, os resultados obtidos foram coerentes com o esperado. Para o ensaio 2, foram obtidos 29,0475 μmol como valor

máximo de produção de CO₂, o que se aproxima do dobro do B_{max} obtido para o ensaio 1, de 15,9018 µmol.

5.2 Ecotoxicidades dos contaminantes

Foram obtidos valores médios para o crescimento do hipocótilo e da raiz, para cada ensaio. A partir deles foram calculados os indicadores Índice de Crescimento (ICR) e Índice de Germinação (IG). Também, foram contabilizados o número de mortes em cada ensaio, ou seja, o número de plântulas cujo crescimento radicular não atingiu os 2 mm. Os resultados foram organizados nas Tabelas 6 e 7.

As Figuras 10 e 11 ilustram o método utilizado para auxiliar na medição das estruturas das sementes de alface e rúcula, respectivamente.

5.2.1 Alface (*Lactuca sativa*)

Figura 14: Placa de papel plastificado com plântulas de alface.



Fonte: Autora, 2019.

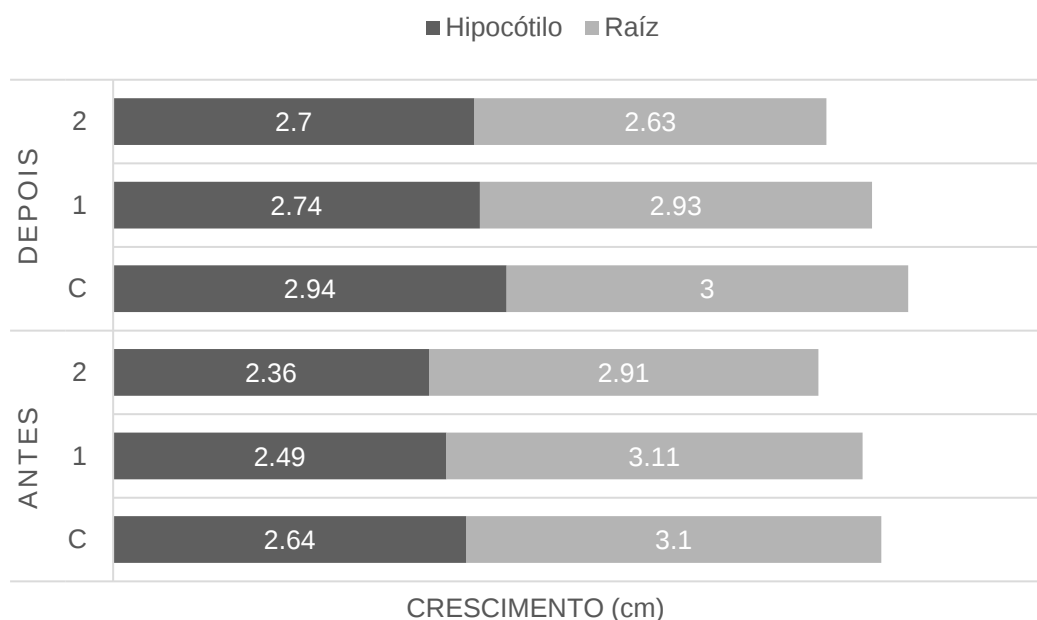
Tabela 6: Resultados do teste de ecotoxicidade (alface).

Antes da biodegradação					
AMOSTRA	COMP. MÉDIO HIPOCÓTILO (cm)	COMP. MÉDIO RAIZ (cm)	NÚMERO DE MORTES	ICR	IG (%)
Controle (C)	2,64	3,10	0	1,00	100
1	2,49	3,11	1	1	98,3
2	2,36	2,89	4	0,93	87,0

Depois da biodegradação					
AMOSTRA	COMP. MÉDIO HIPOCÓTILO (cm)	COMP. MÉDIO RAÍZ (cm)	NÚMERO DE MORTES	ICR	IG (%)
Controle (C)	2,95	3,00	0	1,00	100
1	2,74	2,93	0	0,97	97,00
2	2,70	2,91	1	0,97	95,38

Fonte: Autora, 2019.

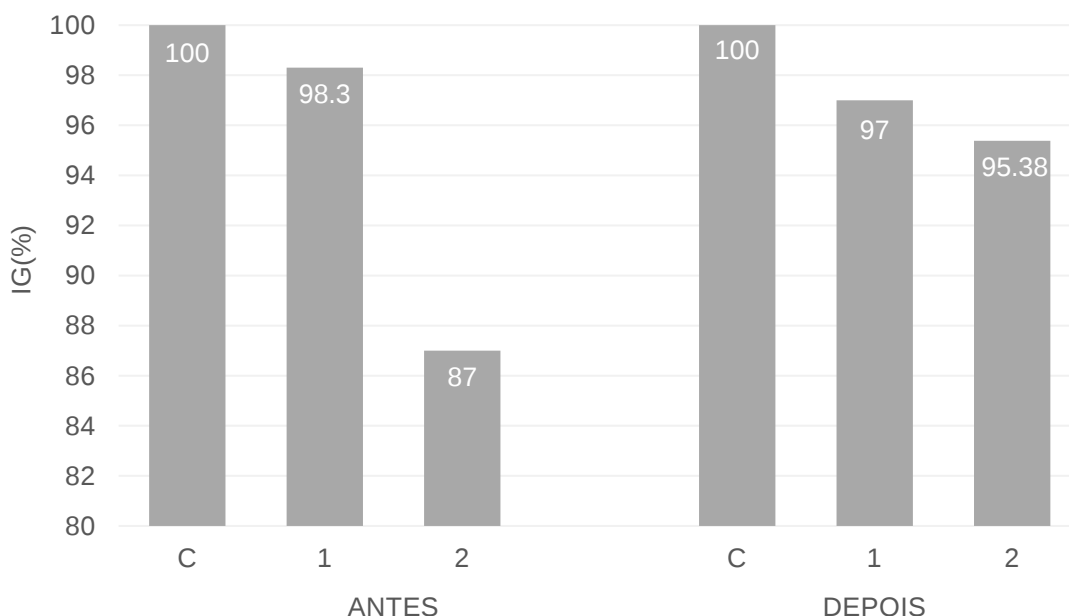
Figura 15: Resultados qualitativos do crescimento das sementes de alface.



Fonte: Autora, 2019.

O Gráfico 3 permite comparar os crescimentos dos ensaios C, 1 e 2 tanto antes quanto após o processo de biodegradação. Anteriormente, no ensaio controle, tanto raiz quanto hipocótilo tiveram seu crescimento inibido pela presença de ametrina, enquanto nos testes posteriores à biodegradação eles apresentaram melhor desenvolvimento. Já os ensaios 1 e 2 apresentaram maior crescimento do hipocótilo posteriormente à degradação, mas o mesmo não pôde ser observado em relação à raiz.

Figura 16: Comparação dos Índices de Germinação – IG (%) (alface).



Fonte: Autora, 2019.

Comparando-se a germinação das sementes em cada ensaio anterior e posteriormente à ação dos microrganismos, foram obtidas poucas mortes em sementes de alface. Como era esperado, o ensaio 2, por apresentar maior volume de ametrina nas placas de Petri, apresentou os menores índices de germinação, sendo também o ensaio que mais se beneficiou da biodegradação, registrando um aumento de 8,38% entre os períodos estudados. Quanto ao ensaio 1, influência do consumo da ametrina por parte dos microrganismos não foi muito expressiva, tendo sido observada uma queda de apenas 1,3% entre o início e o fim dos testes respirométricos. A ausência de ametrina nas placas do ensaio controle resultou no bom desenvolvimento das sementes em todas as amostras, o que significa que o ensaio desempenhou com sucesso a sua função de fornecer uma base representativa de um ambiente descontaminado, para a comparação com as demais amostras.

Considerando-se que, nos ensaios 1 e 2, o IG apresentou valores entre 87 e 98,3%, pode-se dizer que a taxa de mortalidade de sementes, para a *Lactuca sativa*, varia entre os perfis de “0 a 10%” ou de “10 a 40%”, o que de acordo com Barbosa (2000, p.110), significa que a ametrina pode ser considerada como não tóxica ou

com indícios de toxicidade.

5.2.2 Rúcula (*Eruca sativa*)

Figura 17: Placa de papel plastificado com plântulas de rúcula.



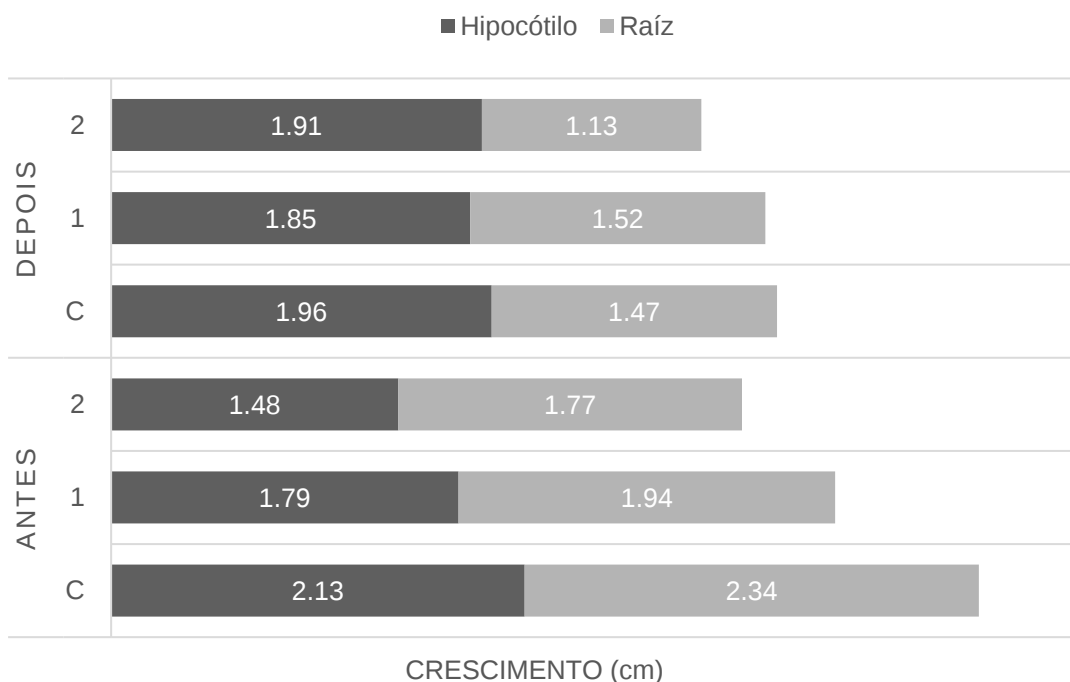
Fonte: Autora, 2019.

Tabela 7: Resultados do teste de ecotoxicidade (rúcula).

ANTES DA BIODEGRADAÇÃO					
AMOSTRA	COMP. MÉDIO HIPOCÓTILO (cm)	COMP. MÉDIO RAIZ (cm)	NÚMERO DE MORTES	ICR	IG (%)
Controle (C)	2,13	2,34	20	1,00	100
1	1,48	1,77	28	0,75	40,00
2	1,79	1,94	23	0,82	50,50

DEPOIS DA BIODEGRADAÇÃO					
AMOSTRA	COMP. MÉDIO HIPOCÓTILO (cm)	COMP. MÉDIO RAIZ (cm)	NÚMERO DE MORTES	ICR	IG (%)
Controle (C)	1,96	1,47	23	1,00	100
1	1,91	1,13	27	0,77	42,35
2	1,85	1,52	24	1,03	61,80

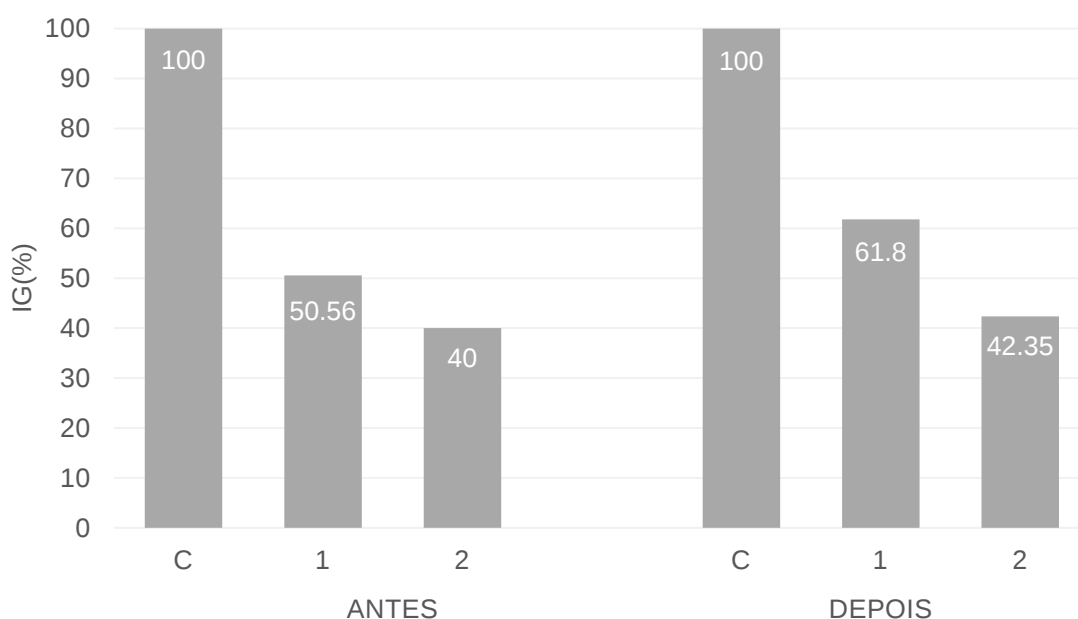
Fonte: Autora, 2019.

Figura 18: Resultados qualitativos do crescimento das sementes de rúcula.

Fonte: Autora, 2019.

Assim como no item anterior, o Gráfico 5 permite comparar os crescimentos dos ensaios C, 1 e 2 tanto antes quanto após o processo de biodegradação, contudo, relativamente ao teste com sementes de rúcula. Estas se mostraram mais sensíveis à presença da ametrina do que as sementes de alface, devido ao menor crescimento das estruturas mensuradas. Anteriormente à biodegradação, no ensaio controle, tanto raiz quanto hipocótilo tiveram seu crescimento inibido pela presença do contaminante, enquanto nos testes posteriores à biodegradação eles registraram maior crescimento. O mesmo padrão dos testes com alface pôde ser observado: os ensaios 1 e 2 apresentaram maior crescimento do hipocótilo posteriormente à degradação mas o mesmo não pôde ser observado em relação à raiz.

Figura 19: Comparação dos Índices de Germinação – IG (%) (rúcula).



Fonte: Autora, 2019.

As sementes de rúcula, diferentemente das de alface, apresentaram valores mais expressivos de taxa de mortalidade. O ensaio 2 apresentou os menores índices de germinação, porém o ensaio 1, nesse caso, se beneficiou mais da biodegradação, com diferença de 11,24% entre os períodos anterior e posterior a ela. A ausência de ametrina nas placas do ensaio controle, no caso do teste com rúcula, também resultou no bom desenvolvimento das sementes em todas as amostras, o que significa que o ensaio desempenhou com sucesso a sua função de fornecer uma base representativa de um ambiente descontaminado, para a comparação com as demais amostras.

Considerando-se que o IG apresentou valores entre 40 e 60%, pode-se dizer que a taxa de mortalidade de sementes, para a *Eruca sativa*, se encaixa no perfil de maior ou igual a 40%, o que de acordo com Barbosa (2000, p.110), significa que a ametrina é tóxica, nesse caso.

5.3 Condutividade e pH

As tabelas 8 e 9 reúnem os valores médios obtidos para a condutividade e pH de cada amostra, respectivamente.

Tabela 8: Comparativo da condutividade antes e após a biodegradação.

CONDUTIVIDADE ($\mu\text{S/cm}$)		
AMOSTRA	ANTES DA BIODEGRADAÇÃO	DEPOIS DA BIODEGRADAÇÃO
Controle (C)	38,8	161,8
1	39,4	153,6
2	37,7	154,2

Fonte: Autora, 2019.

Tabela 9: Comparativo do pH antes e após a biodegradação.

pH		
AMOSTRA	ANTES DA BIODEGRADAÇÃO	DEPOIS DA BIODEGRADAÇÃO
Controle (C)	6,25	6,18
1	5,62	6,16
2	5,74	6,32

Fonte: Autora, 2019.

Os testes de condutividade e pH forneceram resultados que permitem a comparação entre as condições físicas das soluções estudadas antes e após a biodegradação. Em todas as amostras, a condutividade medida nos ensaios posteriores ao processo de biodegradação apresentou-se muito mais elevada que nos ensaios anteriores à biodegradação, indicando que o resultado da ação dos microrganismos na presença de ametrina foi a geração de soluções altamente iônicas. Com isso, é possível observar a quebra da ametrina em compostos menores, gerando subprodutos da degradação. Os valores elevados (entre 150 e 170 mS/cm) podem ser justificados pela presença de íons em solução, o que representa, indiretamente, a diminuição da concentração de contaminante na amostra.

Nos ensaios 1 e 2 foi possível observar o aumento do pH em direção à neutralidade. Isso mostra a contínua atividade dos microrganismos na degradação do composto. Como discutido no item 3.4, manter o pH próximo da neutralidade (entre 6,5 e 7,0) é essencial para garantir a manutenção da atividade bacteriana. No desenvolvimento de técnicas de biorremediação, portanto, o monitoramento do pH durante todo o processo de descontaminação é relevante para garantir os resultados pretendidos.

6. CONCLUSÕES

Com este trabalho foi possível concluir sobre a eficiência da biorremediação da ametrina em meio líquido. A seleção de microrganismos autóctones foi essencial para a obtenção de organismos adaptados à degradação do contaminante.

A metodologia de respirometria adotada possibilitou, com êxito, a comparação da atividade microbiana ao longo do tempo. Também foi possível analisá-la nas situações hipotéticas de aplicação regular e excessiva do herbicida em campo. A realização dos testes respirométricos em solução aquosa resultou em valores reduzidos de produção de CO₂. Também, a ausência de nutrientes adicionais contribuiu para inexpressividade dos dados, principalmente no ensaio controle. Como esperado, os ensaios 1 e 2 seguiram o comportamento de crescimento, com as fases exponencial, lag, estacionária e de morte celular e por isso puderam ser ajustados à modelagem matemática.

Os testes de condutividade permitiram analisar a atividade microbiana através de indícios da quebra da ametrina em subprodutos, e o pH se mostrou favorável ao desenvolvimento dos microrganismos ao longo do processo de biodegradação. Foram concluídos a não toxicidade ou indícios de toxicidade da ametrina, em relação às sementes de alface, enquanto para as sementes de rúcula ela se comportou de forma tóxica.

Contudo, os microrganismos do solo se mostraram aptos à biodegradação do herbicida Gesapax® CIBA GEIGY em meio líquido, nas concentrações e volume recomendados para a aplicação em campo. Assim, pode-se concluir que, para casos de contaminação de corpos hídricos com ametrina, a biorremediação é uma solução viável tanto economicamente, por utilizar microrganismos nativos do solo, quanto por apresentar resultados satisfatórios a curto prazo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREO, Ana Paula. **Ensaio de Respirometria: Monitoração de CO₂ utilizando um Sistema FIA com Detecção Condutométrica**. 1999. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

ARMAS, Eduardo Dutra de et al. Diagnóstico Espaço-Temporal Da Ocorrência de Herbicidas nas Águas Superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e Principais Afluentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p.1119-1127, ago. 2007. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol30No5_1119_12-AR06251.pdf>. Acesso em: 13 out. 2019.

ASAHIDE, C.A. **Utilização de sementes de alface na avaliação da toxicidade de sais de metais potencialmente tóxicos**. 52 ° Congresso Brasileiro de Química. Recife, PE. Disponível em: < <http://www.abq.org.br/cbq/2012/trabalhos/5/386-13959.html> >. Acesso em: 13 out. 2019.

AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água na agricultura**. Campina Grande: UFPB, 1999.

BARBOSA, R.M. **Avaliação do impacto de lodos de estação de tratamento de água à biota aquática através de estudos ecotoxicológicos**. 2000, 200p. Tese (doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Carlos, 2000.

BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Science**, v. 100, n. 1, p. 68-70, 1965.

BRASIL. Resolução Conama nº 357, de 17 de março de 2019. **Classificação dos Corpos de água**. Brasília, DF, Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcd_altrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf>. Acesso em: 20 set. 2019.

BRITTO, Fábio Brandão et al. Herbicidas no alto Rio Poxim, Sergipe e os riscos de contaminação dos recursos hídricos. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, p.390-398, jun. 2012. Disponível em: <<http://ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/view/1725/697>>. Acesso em: 10 out. 2019.

BRITO, Gabriela Cristina Barbosa et al. A IMPORTÂNCIA DA BIOPROSPECÇÃO DE MI-CRORGANISMOS EM ÁREAS CONTAMINADAS COM PRODUTOS DERIVADOS DO PETRÓLEO. **Agronegócios e Meio Ambiente**, Maringá, v. 3, n. 3, p.291-310, dez. 2010. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/53539766-A-importancia-da-bioprospeccao-de-mi-crorganismos-em-areas-contaminadas-com-produtos-derivados-do-petroleo.html>>. Acesso em: 21 out. 2019.

CABRAL, M. F. et al. Estudo do comportamento eletroquímico do herbicida ametrina utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. **Eclética Química**, São Paulo, v. 282, p.41-47, jun. 2003.

CARMONA, Nathalia Froiman. **RESPIROMETRIA APLICADA A SOLOS CONTAMINADOS POR DERIVADOS DE PETRÓLEO E FLUORCARBONADOS EM CONDIÇÕES CLIMÁTICAS REAIS**. 2016. 70 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2016.

CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Solos – Determinação da Biodegradação de Resíduos – Método Respirométrico de Bartha. Norma técnica L6.350**. São Paulo, 15f,1990.

CORBI, Juliano José et al. Diagnóstico Ambiental de Metais e Organoclorados em córregos adjacentes a Áreas de cultivo de Cana-De-Açúcar (Estado de São Paulo, Brasil). **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p.61-65, ago. 2006.

COSTA, M. R., **Uso da Respirimetria para Avaliação da Biodegradação Aeróbia de Lixiviado de Resíduos Sólidos Urbanos em Latossolo Vermelho-Escuro**. 2009. 125p. Dissertação (mestrado). Departamento de Engenharia Civil e Ambiental. Faculdade de Tecnologia – Universidade de Brasília. Brasília/DF.

GAYLARDE, Christine Claire; BELLINASSO, Maria de Lourdes; MANFIO, Gilson Paulo. Biorremediação: Aspéctos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvement**, Goiás, v. 34, p.36-43, jun. 2005.

GESAPAX® 500 CIBA-GEIGY. São Paulo: Syngenta Proteção de Cultivos Ltda, [2019]. Bula de remédio.

MARIANO, Adriano Pinto. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS E DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS CONTAMINADOS COM ÓLEO DIESEL**. 2006. 162 f. Tese (Doutorado) - Curso de Geociências e Meio Ambiente, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

MEMBRÉ, J. M.; THURETTE J.; CATTEAU, M. Modeling the growth, survival and death of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 82, n. 1, p.345-350, 1996.

MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Applied models to biodegradation kinetics of lubricant and vegetable oils in wastewater. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 297-305, 2009.

MONTAGNOLLI, R. N. **Biodegradação de Derivados de Petróleo com a aplicação de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis***. 2011. 249 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Rio Claro/SP.

MONTAGNOLLI, R. N. **Incêndios de petróleo e petroquímicos: Biorremediação de áreas afetadas**. 2015. 267 p. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Rio Claro/SP.

PEREIRA, Aline Ramalho Brandão; FREITAS, Diego Antônio França de. **USO DE MICROORGANISMOS PARA A BIORREMEDIAÇÃO DE AMBIENTES**

IMPACTADOS. **Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Minas Gerais, v. 6, n. 6, p.975-1006, jun. 2012.

RÉGO, Ana Paula Justiniano. **INFLUÊNCIA DO HERBICIDA GESAPAX NA ATIVIDADE MICROBIANA DO SOLO E SUA ECOTOXICIDADE**. 2017. 144 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2017.

SCHMIDT, S. K.; SIMKINS, S.; ALEXANDER, M. Models for the kinetics of biodegradation of organic compounds not supporting growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v.50, n. 2, p.323-331, 1985.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA VEGETAL (SINDIVEG). **O que você precisa saber sobre Defensivos agrícolas**. São Paulo: Sindiveg, 2019. 50 p. Disponível em: <<https://sindiveg.org.br/wp-content/uploads/2018/08/oquevoceprecisasabersobredefensivosagricolas.pdf>>. Acesso em: 25 out. 2019.

TONINI, Rita Maria Costa Wetler; REZENDE, Carlos Eduardo; GRATIVOL, Adriana Daudt. DEGRADAÇÃO E BIORREMEDIAÇÃO DE COMPOSTOS DO PETRÓLEO POR BACTÉRIAS: REVISÃO. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 04, p.1010-1020, dez. 2010. Disponível em: <<https://revistas.ufrj.br/index.php/oa/article/view/7128/5709>>. Acesso em: 17 out. 2019.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10ª Edição. Porto Alegre, RS. Artmed, 2012.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. USEPA. **Assessing UST corrective action technologies: early screenig of clean-up technologies for the saturated zone**. EPA/600/2-90/027. p.124, 1990.

YOUNG, L. Y. Anaerobic degradation of aromatic compounds. Em: **Microbial degradation of aromatic compounds**. GIBSON, D. T. (ed.). Marcel-Dekker-Inc., New York, pp. 487-523, 1984.