



ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO

8° ENEPE UFGD • 5° EPEX UEMS

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE PESTICIDAS EM LAVOURAS DE CANA-DE-AÇÚCAR DO ESTADO DO MATO GROSSO DO SUL

Gleyce Hellen de Almeida de Souza¹; Alisson Alves da Silva¹; Maricy Raquel Lindenbah Bonfá²
UFGD-FCBA, C. Postal 533, 79804-970 Dourados-MS, E-mail: gleycehellen_biotec@hotmail.com
¹Voluntários em Pesquisa do CNPq. ²Orientadora PIVIC/UFGD/CNPq

RESUMO

Atualmente no Estado de Mato Grosso do Sul está ocorrendo uma grande expansão canavieira, o que pode levar à contaminação tanto do solo, quanto da água devido à crescente utilização de pesticidas agrícolas. Até o momento, há poucos estudos sobre a diversidade microbológica e a capacidade da microbiota natural deste solo em biodegradar compostos tóxicos recalcitrantes. Assim, o objetivo deste projeto foi estudar o potencial de degradação do herbicida atrazina por bactérias bioprospectadas de solos de cultivo de cana-de-açúcar com histórico de aplicação deste herbicida. Coletou-se amostras de solo em diferentes locais em 2 fazendas (Celeiro e Vacaria) da região de Rio Brillhante-MS. As amostras de solo das duas fazendas foram incubadas em meio de cultura MSN-ágar + atrazina e 0,1% extrato de levedura. Este processo resultou em 9 isolados que apresentaram crescimento significativo no meio proposto. Identificou-se através de testes bioquímicos 8 cepas escolhidas por apresentarem maior potencial de crescimento em atrazina. Destas, 7 cepas eram Gram-positivas e catalases positivas e 1 cepa era Gram-negativas e oxidase positiva. Realizou-se testes de crescimento com os isolados que visualmente apresentaram crescimento satisfatório (P3.c1 e P5.c1). Monitorou-se o crescimento por densidade óptica (600 nm). Retirou-se alíquotas das culturas em horários pré-estabelecidos, até que estes entrassem em fase de declínio. A cepa P3.c1 apresentou crescimento máximo em vinte horas de incubação. Já a cepa P5.c1 teve crescimento máximo em cinco horas. Assim, a cepa P5.c1 atingiu o crescimento máximo em menor tempo quando comparada a cepa P3.c1. Portanto, a cepa P5.c1 apresenta potencial para ser utilizada na biorremediação de sítios contaminados. Observa-se que o solo com

histórico de aplicação de atrazina apresenta características microbianas favoráveis ao processo de biorremediação, pois apresentou micro-organismos autóctones com capacidade de degradação do poluente orgânico, neste caso a atrazina.

Palavras-chave: Bioprospecção, atrazina e biorremediação

1. INTRODUÇÃO

A qualidade de vida na Terra está estritamente ligada às condições ambientais. Até recentemente acreditava-se que os recursos naturais eram abundantes e ilimitados, hoje em dia, no entanto, o comprometimento desses recursos mostra, em maior ou menor grau, a negligência humana ao utilizá-los (VIDALI, 2001). A contaminação ambiental é observada em todo o planeta, e no último meio século, observou-se passivamente a introdução de numerosos poluentes, cujos efeitos finais, na biosfera e na saúde humana, em particular, são totalmente desconhecidos, sendo que na maioria das vezes esses produtos são extremamente tóxicos (DOBSON et al., 1997).

O número de substâncias químicas de origem antropogênica expandiu-se enormemente e com isso, grandes quantidades de produtos tóxicos, como combustíveis, detergentes, fertilizantes, lubrificantes, pesticidas e muitos outros são lançados no ambiente, contaminando o ar, o solo e os cursos d'água (BONAVENTURA; JOHNSON, 1997). Governos de todo mundo estão procurando abordagens economicamente viáveis para a recuperação de áreas poluídas e para a conservação da biodiversidade (DOBSON et al., 1997). A problemática é decorrente principalmente do fato de que muitos desses poluentes não podem ser removidos por processos físicos convencionais, estes compostos são encontrados em diferentes concentrações em diversos tipos de ambientes, a poluição que afeta essas áreas é hoje um grande problema, pois muitos poluentes possuem utilidades não dispensáveis, como os agrotóxicos. Estes produtos bem como outros poluentes, possuem características bastante preocupantes, devido à sua persistência no solo, na água e nos alimentos (COUTINHO; BARBOSA, 2007).

Os agrotóxicos começaram a ser usados em escala mundial após a Segunda Grande Guerra (DAMS, 2006). No Brasil, o uso de pesticidas teve um aumento considerável a partir da década de 70, quando o país adotou o pacote agrícola intitulado "Revolução Verde", como forma de buscar o aumento imediato de produtividade (UETA et al., 2001).

O aumento da população mundial e a demanda crescente por alimentos incentivou o agronegócio e motivou a agricultura a implementar processos de mecanização e o emprego de agroquímicos em geral, pois ao longo dos anos, a agricultura mundial cresceu em área cultivada e produtividade acompanhada pelo uso intenso de pesticidas, adubos químicos e outras substâncias

sintéticas (ARMAS; MONTEIRO, 2005). Utilizam-se por exemplo pesticidas, que são produtos utilizados na agricultura para o controle de pragas, doenças e plantas daninhas, visando o aumento da produtividade, melhoria na qualidade do produto e a redução do trabalho e gastos, de um ponto de vista econômico, esse aumento só traz benefícios à sociedade, no entanto, o meio ambiente invariavelmente é afetado (SOUZA, 2011).

Os termos pesticida, biocida, defensivo agrícola, praguicida e agrotóxico são comumente usados com o mesmo significado, embora definições mais restritas possam incluir ou excluir algumas dessas classificações diferentes grupos de substâncias químicas (MARASCHIN, 2003). Segundo Brasil (1998), a Lei brasileira nº 7.802 de 11.07.89 define agrotóxicos como sendo os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento.

O mercado mundial de pesticidas atinge atualmente a elevada cifra de mais de 22 bilhões de dólares anuais (UETA et al., 2001). No mercado mundial dos pesticidas, os herbicidas merecem destaque por representarem 47% do total comercializado, sendo seguidos pelos inseticidas que representam 25% do mercado mundial de pesticidas (GUEDES, 2010). O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo e o principal da América Latina. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, as vendas de pesticidas entre 1999 e 2004 aumentaram cerca de 190% (MAPA, 2004), com destaque para os herbicidas e inseticidas. Apesar do aparente efeito benéfico sobre a produtividade agrícola, o uso indiscriminado destes agroquímicos tem representado um risco à saúde humana e ambiental (LÓPEZ et al., 2005).

Em função do uso intensivo de produtos químicos na agricultura moderna e da formação de grandes quantidades de resíduos, nos últimos anos tem havido uma maior preocupação em se conhecer o comportamento e destino dos pesticidas, nos diversos ecossistemas (ARAÚJO, 2002). Seu emprego indiscriminado, sem as devidas precauções e cuidados em relação a manipulação, produção, estocagem e destino final, põe em risco não só o meio ambiente, mas também a saúde das pessoas que de alguma forma entram em contato com tais produtos (DAMS, 2006).

Os pesticidas podem ser classificados em função de vários aspectos que os diferenciam em classes, por exemplo, podem ser classificados quanto ao tipo de peste que controlam: algicidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas, entre outros. Os herbicidas são compostos orgânicos,

quimicamente sintetizados, utilizados na agricultura para o controle de ervas daninhas, e, geralmente, incorporados diretamente ao solo. Nos últimos anos tem aumentado o consumo de herbicidas e defensivos agrícolas, principalmente devido a grande expansão canavieira.

A utilização intensa e abusiva de pesticidas na agricultura a cada ano vem causando prejuízos incalculáveis ao meio ambiente, sendo as consequências do uso de pesticidas quando aplicados, ainda que de maneira correta, à agricultura é a eventual contaminação do solo e em alguns casos a posterior contaminação de fontes hídricas, condição algumas vezes amenizada quando a concentração residual dos poluentes sofre degradação natural por via química, biológica ou por fotólise, isto ocorre quando há condições específicas para promover a degradação, como a presença de bactérias remediadoras ou uma exposição adequada ao sol, entretanto, devido a características como alta massa molecular e persistência a degradação não é favorecida facilmente, permanecendo no meio ambiente por longos períodos de tempo sem sofrer qualquer alteração, dependendo das características do solo, essas moléculas podem ser adsorvidas nas superfícies das partículas e posteriormente lixiviadas (SOUZA, 2011).

A quantidade lixiviada até as águas superficiais dependem principalmente do índice pluviométrico local e da extensão com que tais agentes são adsorvidos pelo solo. A pulverização de pesticidas próxima aos cursos d'água e a disposição inadequada de resíduos e embalagens também são importantes fatores de contaminação (WHO, 2007). A longa persistência de diversos herbicidas no ambiente em que são aplicados tem demandado estudos de impacto ambiental no campo, principalmente em áreas agrícolas sobre mananciais utilizados para o consumo humano (UETA et al., 1999). É importante ressaltar que, em alguns casos, menos de 0,1% da quantidade de pesticidas aplicados alcançam o alvo proposto, os 99,9% restantes tem potencial de atingir outros compartimentos ambientais, como as águas superficiais e subterrâneas, que aparecem como o destino final dos pesticidas (RIBEIRO, 2007).

Até fins de 1970 acreditava-se que a água subterrânea estava protegida de contaminação por pesticida pela superposição de camadas de solo da superfície, da subsuperfície, rochas e argila porém com a proliferação de métodos analíticos acurados e sensíveis percebeu-se que isto não era verdade, pois rotineiramente equipamentos e metodologias sofisticados tem detectado quantidades tão pequenas como 1 parte por bilhão (UETA et al., 2001). Nos Estados Unidos, a contaminação da água subterrânea por fertilizantes químicos e pesticidas tem sido documentada por várias agências públicas. A ocorrência de pesticidas na água subterrânea tem mostrado que há necessidade premente de estudos sobre o entendimento dos processos de transporte desses compostos nos solos (LARA ; BARRETO, 1972; YEN et al, 1994; PEIXOTO et al, 2000 apud UETA et al., 2001).

Os efeitos sobre a saúde humana decorrentes do consumo de água contaminada por pesticidas variam segundo a classe toxicológica do mesmo, dentre os problemas já identificados destacam-se os distúrbios hepáticos, danos ao sistema nervoso central, como dores de cabeça, tonturas, irritabilidade, movimentos musculares involuntários, transtornos cardiovasculares e reprodutivos, há ainda evidências de desregulação endócrina e danos oculares e renais, além de anemia e aumento do risco de desenvolvimento de câncer (NETO; SARCINELLI, 2009).

O consumo de herbicidas tem aumentado principalmente pela resistência de culturas transgênicas (FERREIRA et al., 2011; SINDAG, 2001 apud CARMO et al., 2013). A atrazina representa 12% dos pesticidas usados nos EUA. No Brasil, das 150000 t de pesticidas consumidas anualmente, 33% são herbicidas (UETA et al., 1999). Dentre eles, a atrazina é utilizada em uma variedade de culturas.

A degradação da qualidade dos recursos hídricos, em função da contaminação por pesticidas, tem sido alvo de estudos em todo mundo, dado o impacto ambiental dessas substâncias, o desenvolvimento de metodologias que tenham por objetivo a sua depuração é de extrema importância, tanto do ponto de vista ambiental quanto de saúde pública (CAMPOS, 2009). Assim, é fundamental estudar o risco potencial de contaminação por esses insumos, bem como entender sua dinâmica no ambiente, compreender os mecanismos de degradação que contribuem para o desaparecimento destes xenobióticos, permitindo que medidas de controle sejam adotadas garantindo o equilíbrio do ecossistema.

1.1 ATRAZINA

Atrazina [2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina] é um herbicida seletivo que pertence à família das s-triazinas, que contém na sua estrutura química um hexamérico aromático e anel simétrico constituído por três de carbono e três átomos de nitrogênio nas posições alternadas (Figura 1). A atrazina está entre os agroquímicos mais empregados no mundo, seja nos Estados Unidos ou Brasil (SENE et al., 2010).

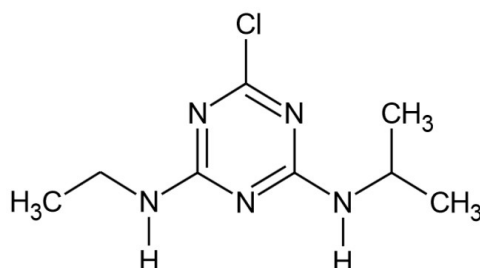


Figura 1. Estrutura química dos herbicidas triazínicos atrazina Fonte: (SENE et al., 2010).

A atrazina foi patenteada na Suíça em 1958 e registrada para uso comercial nos Estados

Unidos em 1959 (UETA et al., 2001). Este herbicida é mundialmente utilizado, muitas vezes em combinação com outros herbicidas (CHAN; CHU, 2005). É usada para o controle de ervas daninhas de folhas largas e gramíneas na agricultura, especialmente em culturas de cana-de-açúcar, milho, sorgo e em plantio de reflorestamento. Sendo que atualmente, tem ocorrido uma grande expansão canavieira no estado do Mato Grosso do Sul, que aparece em destaque por estar localizado estrategicamente entre mercados potenciais como o MERCOSUL e grandes centros consumidores brasileiros, ademais, seu potencial de recursos naturais e a infraestrutura moderna voltada para o apoio ao setor produtivo alavancam investimentos nas atividades agroindustriais e de expansão do intercâmbio comercial (GUIMARÃES et al., 2010). Com esta expansão observada nos últimos anos tem-se notado também um aumento no uso dos agrotóxicos que são os compostos mais amplamente encontrados em corpos hídricos superficiais e subterrâneos no mundo todo, em função do amplo uso em áreas agrícolas e urbanas. Incluem uma variedade de moléculas com diferentes características que resultam em distintos graus de persistência ambiental e mobilidade, além de potencial tóxico, carcinogênico, mutagênico e teratogênico, podendo ainda provocar efeitos endócrinos a diversos organismos não alvos, inclusive ao Homem (ARMAS, 2006).

A atrazina é um herbicida sistêmico, seletivo da classe dos triazínicos, atua bloqueando a realização da fotossíntese, classificado como de uso restrito, devido a sua baixa biodegradabilidade e elevado potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas (CHAN; CHU, 2005). Segundo a União Europeia e a Agência de Proteção Ambiental Americana, esse composto está na lista de poluentes prioritários devido a sua persistência ambiental e toxicidade (OLIVEIRA, 2008). Devido ao seu elevado uso em todo o mundo, a atrazina é um dos herbicidas mais prevalentes no meio ambiente, esta apresenta uma solubilidade em água de aproximadamente 30 mg/L e uma meia-vida no solo entre 15 e 100 dias (CAMPOS, 2009).

Embora persista na maioria dos solos durante apenas alguns meses, quando a atrazina e seus metabólitos alcançam os cursos d'água sua meia-vida é da ordem de anos (RALEBITSO et al., 2002; BAIRD, 2002 apud CAMPOS, 2009). No entanto a meia-vida desse herbicida é variável em função do tipo de solo e da condição climática (QUEIROZ; MONTEIRO, 2000). A mobilidade desse composto pode ser influenciada pelas condições climáticas como índice pluviométrico e temperatura, bem como as características intrínsecas do solo (CANUTO et al., 2010). Dependendo de suas características podem permanecer em diferentes compartimentos ambientais, tais como atmosfera, solo, água de superfície e subterrânea (CABRERA et al., 2008).

Após a aplicação, a atrazina pode-se tornar um contaminante potencial de aquíferos baseado em suas características físico-químicas, como: alto potencial de escoamento, persistência no solo, hidrólise lenta, baixa pressão de vapor, solubilidade em água baixa a moderada, absorção moderada

pela matéria orgânica e pela argila (UETA et al., 1999).

A atrazina foi detectada em águas superficiais e subterrâneas em vários países de todo o mundo. A legislação Brasileira estabelece concentrações máximas permitidas para cada pesticida em água, sendo o limite máximo permitido para o pesticida atrazina em água destinada ao consumo humano de $2,0 \mu\text{g. L}^{-1}$ (SOUZA, 2011). A atrazina possui toxicidade aguda de leve a moderada para humanos e alguns animais. Devido à toxicidade e persistência da atrazina no ambiente, há uma série de estudos se direcionam as pesquisas para a remoção destes compostos do meio ambiente principalmente por causa de seus efeitos deletérios ao homem (KOURAS et al.; 1998). A USEPA (Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos) classifica a atrazina como possível agente carcinógeno humano e tem assessorado a realização de projetos com o objetivo de proteger os cursos d'água da contaminação por esse herbicida (SANCHES et al., 2003). A toxicidade potencial da atrazina tem motivado pesquisas direcionadas para a sua biorremediação. Esta técnica tem sido considerada a metodologia de escolha para a recuperação de áreas comprometidas devido ao potencial de metabolização dos micro-organismos, custo relativamente baixo e reduzido impacto ambiental (RALEBITSO et al., 2002 apud CAMPOS 2009).

1.2 BIORREMEDIAÇÃO DA ATRAZINA

A remoção e/ou degradação de diversos poluentes orgânicos xenobióticos no ambiente não é uma atividade fácil (CARMO et al., 2013). Uma vez que a contaminação ambiental já tenha ocorrido, a prevenção de novas fontes de poluição e a remediação do ambiente contaminado tornam-se estratégias fundamentais para garantir a sustentabilidade ambiental (CAMPOS, 2009). As técnicas de recuperação ambiental tem como objetivo a completa degradação dos poluentes, ou, pelo menos, a diminuição de sua concentração até níveis aceitáveis ou sua conversão a substâncias de menor toxicidade, reduzindo os danos ambientais e preservando a saúde humana (BONAVENTURA ; JOHNSON, 1997; VIDALI, 2001 apud CAMPOS, 2009).

A preocupação com o meio ambiente e sua degradação tem levado ao desenvolvimento de novas tecnologias, as quais promovem a recuperação ou a remediação de áreas contaminadas com a utilização de micro-organismos, plantas ou mesmo enzimas (DAMS, 2006). Na procura de alternativas para despoluir áreas contaminadas por diferentes compostos, procura-se identificar técnicas que apresentem eficiência na descontaminação, simplicidade na execução, menor tempo demandado pelo processo e menor custo (PIRES et al., 2003). Nesse contexto, aumenta-se o interesse pela utilização da biorremediação, esta se baseia num processo tecnológico de remoção da poluição e restauração da qualidade ambiental por meio da degradação dos poluentes utilizando micro-organismos de ocorrência natural, como bactérias e fungos (ESPOSITO; AZEREDO, 2004).

As bactérias possuem uma versatilidade muito grande no que diz respeito aos processos metabólicos e os ambientes onde vivem, pois esses micro-organismos são capazes de sobreviver em condições químicas e físicas extremas, sendo possível encontrá-los nos mais variados meios, isto devido a capacidade de utilizarem outros compostos além do oxigênio para o processo de respiração, as bactérias influenciam o comportamento de elementos químicos; como moléculas orgânicas e os metais (MOREIRA, 2013). O herbicida atrazina é um compostos mobilizável no sistema água-solo, e a sua degradação requer estudos de estimulação da microbiota presente em ambientes contaminados para provável uso em técnicas de biorremediação (CARMO et al., 2013). A busca de cepas microbianas capazes de degradar é fundamental para o desenvolvimento de processos de biorremediação, como ferramentas corretivas para resolver os atuais problemas do uso irracional de agrotóxicos (SENE et al., 2010).

Numerosos estudos estão sendo realizados sobre a degradação de pesticidas por micro-organismos, estes estudos têm como objetivo isolar e caracterizar espécies microbianas com elevada capacidade de remover diferentes grupos de pesticidas (LÓPEZ et al., 2005). A biodegradação da atrazina pode variar de acordo com o tipo de solo, microbiota presente e disponibilidade de nutrientes como carbono e nitrogênio (HUNTER; SHANER, 2010). As bactérias são consideradas os principais agentes das mudanças geoquímicas, devido ao seu alto potencial metabólico, distribuição abundante, as taxas de crescimento, capacidade de resposta fisiológica, adaptabilidade evolutiva e grande capacidade de adaptação (WARREN; HAAK, 2001).

Uma das dificuldades para a remoção de resíduos de pesticidas do meio ambiente é o fato de que a persistência do pesticida no solo depende das características do solo, como: umidade, temperatura, aeração, pH e quantidade de matéria orgânica afetam o grau da degradação e dos fatores climáticos tais como radiação, temperatura, umidade e oxigenação em virtude da direta influência desses fatores sobre o crescimento e atividade microbianos (CARMO et al., 2013). É a associação destes fatores, juntamente com as características da molécula, que determinam o tempo de vida dos pesticidas no ambiente (REGITANO; BONFLEUR, 2011).

Assim, a bioprospecção tem emergido neste cenário como uma forma muito utilizada para o isolamento, localização e seleção de micro-organismos que apresentam potencial em degradar pesticidas ou outros compostos tóxicos recalcitrantes. Esta técnica representa uma estratégia essencial para conhecer e estudar a biodiversidade microbiana e o seu potencial biotecnológico, como por exemplo na obtenção de agentes serem usados em processos de biorremediação de áreas contaminadas (FERREIRA, 2012).

A biorremediação é uma ferramenta importante na biotecnologia, pois propicia um aumento

na biodegradação já existente no solo, provocando um aumento da atividade microbiana degradadora já existente, sendo considerado um método natural e relativamente simples, menos agressivo e mais adequado para a manutenção do equilíbrio ecológico, além do baixo custo quando comparados às alternativas físicas e físico-químicas (BRITO, 2010).

Atualmente, tem-se reconhecido os esforços em estudos de bioprospecção de micro-organismos importantes do ponto de vista biotecnológico. Porém, poucos estudos referem-se a diversidade microbiana do solo do cerrado brasileiro com potencial de degradar pesticidas comumente utilizados em lavouras de cana-de-açúcar do Estado do Mato Grosso do Sul. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar o potencial de degradação do herbicida atrazina por bactérias bioprospectadas de solos provenientes de cultivo de cana-de-açúcar com histórico de aplicação deste herbicida. Pois do ponto de vista sustentável, é de suma importância conhecer e isolar a microbiota que naturalmente poderá ser ferramenta chave para serem empregados em processos de biorremediação para a descontaminação de sítios contaminados.

2. METODOLOGIA

2.1 ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS DEGRADADORAS DE ATRAZINA

Foram realizadas coletas de solo em duas fazendas localizadas no Município de Rio Brillhante-MS, Fazenda Celeiro e Fazenda Vacaria, ambas com plantio de cana-de-açúcar, e histórico de aplicação de defensivos agrícolas, como o herbicida atrazina.

Foram coletadas 4 amostras em cada fazenda aleatoriamente, com profundidade máxima de 10 cm. As amostras foram levadas ao laboratório e armazenadas a 10°C. Após a coleta de solo, as amostras foram homogeneizadas e 2,5 g de cada amostra foram pesados totalizando 10 g de cada fazenda. As amostras foram então diluídas em 90 mL de meio líquido contendo 0,1% do herbicida atrazina para o enriquecimento das amostras após a autoclavagem dos meios. Os frascos Erlenmeyer foram incubados a 30°C, 100 rpm por 4 dias.

Após este período inoculou-se 200 µL das duas amostras provenientes de cada fazenda em placas de Petri, contendo meio MSN-ágar + atrazina e extrato de levedura (0,1% YE). Sendo que para o isolamento de bactérias foi utilizado o meio mínimo de sais minerais (MSM) descrito por Radehaus & Schimidt (1992) nas concentrações em g.l⁻¹: Na₂HPO₄ (2,4); KH₂PO₄ (2,0); NH₄NO₃ (0,1); MgSO₄.7H₂O (0,01); CaCl₂.2H₂O (0,01). O pH foi ajustado a 6,5 e o meio esterilizado por autoclavagem a 121°C por 20 minutos. As placas foram incubadas em estufa tipo BOD 35°C até que colônias fossem visualizadas. O isolamento foi realizado através da seleção por visualização morfológica das colônias, sendo que as que apresentaram diferenças morfológicas foram repicadas em uma nova placa com o mesmo meio de origem até que estivessem puras. A técnica para

obtenção de culturas puras foi a esgotamento por estrias descontínuas.

2.2 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA PRE-ELIMINAR

2.2.1 COLORAÇÃO DE GRAM

A análise da morfologia dos isolados foi realizada por microscopia óptica simples, utilizando coloração de Gram. Foi realizado a técnica de coloração de Gram com as colônias bacterianas isoladas. Seguindo o procedimento descrito pelo Ministério da Saúde (1997). Fez-se um esfregaço com uma amostra da colônia bacteriana. Cobriu-se o esfregaço com cristal violeta e deixou agir por aproximadamente 1 minuto, e fez-se a lavagem em um filete de água corrente. Cobriu-se a lâmina com lugol e deixou-se agir por aproximadamente 1 minuto, fez-se a lavagem em um filete de água corrente. Cobriu-se a lâmina com o álcool etílico (99,5° GL) , descorando-a, até que não desprenda mais corante, e fez-se a lavagem em um filete de água corrente. Cobriu-se a lâmina com safranina e deixa-se agir por aproximadamente 30 segundos e faz-se a lavagem com um filete de água corrente. Deixou-se secar ao ar livre, e colocou-se uma gota de óleo de imersão sobre o esfregaço; e a leitura da lâmina se deu em microscópio óptico em objetiva de imersão (100 X), sendo considerada Gram-positivas as colônias que apresentarem coloração roxa, e Gram-negativas as colônias que apresentarem coloração vermelha.

2.2.2 CATALASE

Inicialmente colocou-se uma gota de peróxido de hidrogênio (água oxigenada) 3% sobre uma lâmina em um tubo, e com auxílio de uma alça de platina, agregou-se a colônia em estudo na gota de peróxido de hidrogênio. Sendo considerado resultado positivo a presença imediata de bolhas (a produção de efervescência indica a conversão do H_2O_2 em água e oxigênio gasoso), e resultado negativo pela ausência de bolhas ou efervescência.

2.2.3 OXIDASE

Para a realização do teste utilizou-se as fitas para determinação de oxidase PROBAC DO BRASIL®, e seguiu-se as especificações do fabricante. Este teste foi realizado apenas com bactérias Gram-negativas. Então, utilizou-se uma fita e com auxílio de uma alça de platina fez-se um esfregaço da bactéria a ser identificada na fita. Fez-se a leitura após alguns segundos, sendo considerada oxidase positiva o esfregaço bacteriano na fita que apresentou coloração rosa e oxidase negativa o esfregaço bacteriano que não apresentou alteração de cor.

2.3 CRESCIMENTO DOS ISOLADOS NOS PESTICIDAS

Foram realizadas curvas de crescimento em triplicata utilizando-se as concentrações médias

de aplicação do herbicida atrazina. As curvas de crescimento das bactérias foram construídas em 50 mL de meio MSM + 0,1% de Extrato de levedura + 0,1% do herbicida atrazina em Erlenmeyer de 250 mL, através da medida da densidade óptica em espectrofotômetro (Beckmann DU 640) a 600 nm. A partir dos resultados foram selecionados os melhores isolados, e estes foram armazenados para que futuramente sejam realizados ensaios de degradação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS DEGRADADORAS DO HERBICIDA ATRAZINA

Das placas da fazenda Celeiro com extrato de levedura foram obtidos 4 isolados (C1YE, C2YE, C3YE e C4YE), da fazenda Vacaria foram obtidos 2 isolados (V1YE e V2YE).

Após a incubação das placas em estufa tipo BOD a 25°C (fungo) e 35°C (bactérias), foi realizado o isolamento através da seleção por visualização morfológica das colônias, sendo que as que apresentaram diferenças morfológicas foram repicadas em uma nova placa com o mesmo meio de origem até que estivessem puras. Das placas referentes aos isolados originais da fazenda Celeiro foram isoladas quatro colônias (C1YE, C2YE, C3YE e C4YE). Já referente os isolados originados da fazenda Vacaria foram isolados apenas duas colônias (V1YE e V2YE). Totalizando 9 cepas que cresceram na presença do herbicida atrazina, meio MSM + Extrato de levedura, sendo que estas foram isoladas em duplicata. As cepas receberam nomenclatura que pode ser observada na tabela 1, de acordo com o local de origem (Fazenda Celeiro (C) e Fazenda Vacaria (V)), placa (P), colônia (c), repetição (R). Sendo que a disposição da numeração ocorreu de acordo com a quantidade de placas e colônias.

Tabela 1. Nomenclatura dos isolados

Local de origem	Nomenclatura Replicata 1	Nomenclatura Replicata 2
C1	P1.c1.R1	P1.c1.R2
	P1.c2.R1	P1.c2.R2
C2	P2.c1.R1	P2.c1.R2
C3	P3.c1.R1	P3.c1.R2
V1	P4.c1.R1	P4.c1.R2
C4	P5.c1.R1	P5.c1.R2
V2	P6.c1.R1	P6.c1.R2
	P6.c2.R1	P6.c2.R2
	P6.c3.R1	P6.c3.R2

3.2 COLORAÇÃO DE GRAM, CATALASE E OXIDASE

Os testes foram realizados apenas com 8 cepas que apresentaram crescimento significativo. Com os resultados obtidos através dos testes bioquímicos demonstrados na tabela 2, pode-se observar que das 8 cepas identificadas, 7 cepas eram Gram-positivas (P1.c1, P2.c1, P3.c1, P4.c1, P5.c1, P6.c1, P6.c2 e P6.c3) e apenas 1 cepa Gram-negativa (P5.c1). Das 7 cepas Gram-positivas todas apresentaram resultados como sendo catalases positivas. A catalase é uma enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio. Então foi realizado o teste de catalase com as colônias bacterianas Gram-positivas isoladas para verificar a presença ou ausência desta enzima. Sendo assim em todas as cepas Gram-positivas isoladas apresentaram resultado positivo para esta enzima.

A cepa Gram-negativa isolada apresentou-se como sendo oxidase positiva. A determinação da oxidase é um teste diferencial importante na identificação de bactérias Gram negativas. As bactérias que produzem a enzima oxidase apresentam um sistema de transporte de elétrons denominado sistema citocromo oxidase. Neste sistema, os aceptores eletrônicos naturais podem ser substituídos por substratos artificiais, que na presença de oxigênio atmosférico, são oxidados pela citocromo oxidase, formando um composto colorido (PROBAC DO BRASIL®).

Tabela 2. Classificação dos isolados em Gram (positivos ou negativos), Catalase (positiva ou negativa), Oxidase (positiva ou negativa) e quanto a característica forma.

Local de origem	Placas	Gram	Catalase	Oxidase	Forma
C1	P1.c1	+	+		Bastonetes
C2	P2.c1	+	+		Esferas
C3	P3.c1	+	+		Bastonetes
V1	P4.c1	+	+		Bastonetes
C4	P5.c1	-		+	Bastonetes filamentosos
V2	P6.c1	+	+		Esferas
	P6.c2	+	+		Esferas
	P6.c3	+	+		Bastonetes

Legenda: Local de origem (Fazenda Celeiro (C) e Fazenda Vacaria (V)), placa (P), colônia (c), positiva (+) e negativa (-). Sendo que a disposição da numeração ocorreu de acordo com a quantidade de placas e colônias.

3.3 CRESCIMENTO DOS ISOLADOS NOS PESTICIDAS

Os isolados (P3.c1 e P5.c1) foram submetidos ao ensaio de degradação da atrazina em meio líquido, com o objetivo de avaliar se tais bactérias são capazes de degradar parcialmente a atrazina, utilizando-a como fonte de carbono. Escolheu-se as cepas que visualmente apresentaram crescimento mais satisfatório no meio de cultura proposto. Sendo que a cepa P3.c1 é Gram-positiva e a cepa P5.c1 é Gram-negativa. O crescimento foi monitorado por densidade óptica a 600 nm. Aliquotas foram retiradas das culturas em horários pré-estabelecidos, até que os cultivos entrassem em fase de declínio.

A cepa P3.c1 apresentou seu pico máximo de crescimento em vinte horas de incubação no agitador orbital Shaker, na terceira retirada de amostra, como pode ser observada na Figura 2.

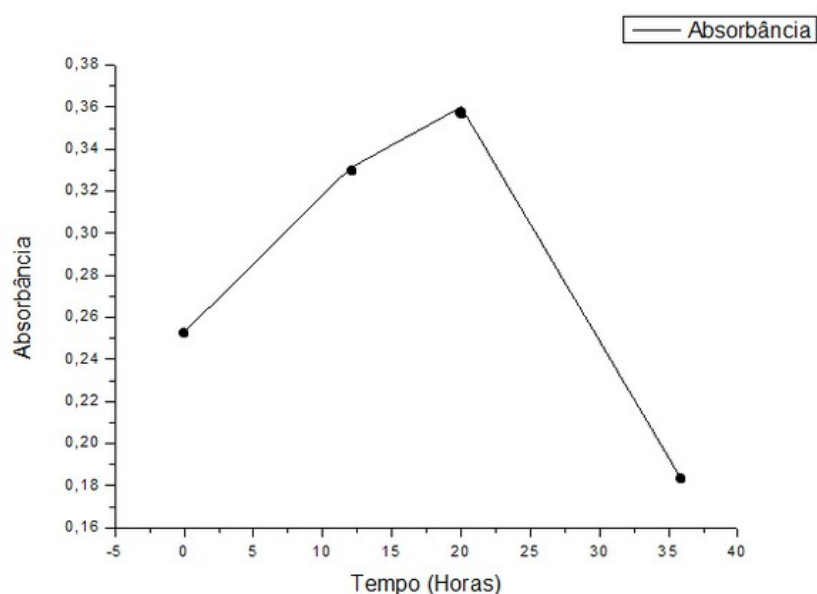


Figura 2. Avaliação da biotransformação da atrazina em meio líquido por espectrofotometria da cepa P3.c1

Já a cepa P5.c1 teve seu pico máximo de crescimento em cinco horas de incubação no Shaker, na segunda retirada da amostra, como pode ser observado logo abaixo na Figura 3. Sendo assim a cepa P5.c1 apresentou uma melhor taxa de crescimento, pois atingiu seu crescimento máximo em menor tempo quando comparada a cepa P3.c1. Sendo assim, neste trabalho a cepa P5.c1 apresenta potencial promissor para ser utilizada em processos de biorremediação de sítios contaminados.

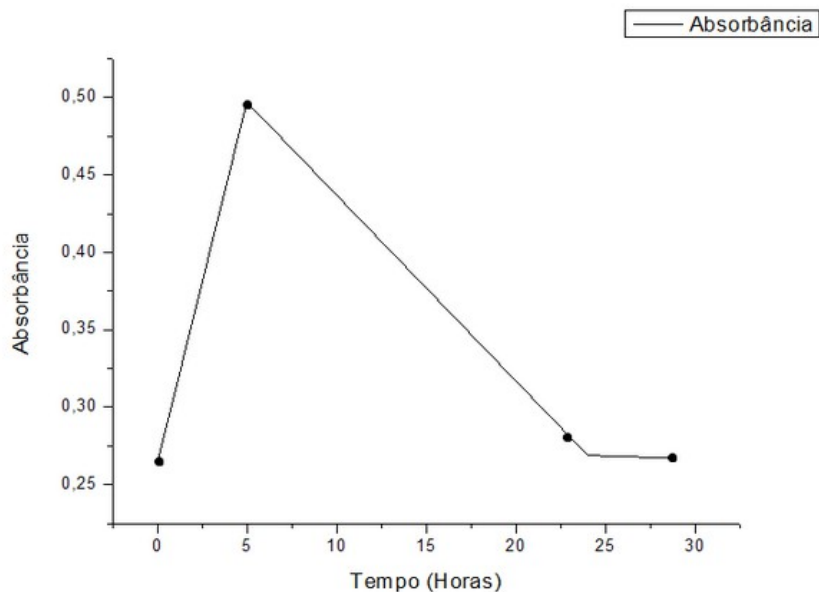


Figura 3. Avaliação da biotransformação da atrazina em meio líquido por espectrofotometria da cepa P5.c1

O estudo dos micro-organismos e da biodegradação dos herbicidas representa uma ferramenta que garante um futuro promissor como alternativa tecnológica mitigadora da ação poluidora do homem, no entanto não substitui, o uso racional dos agroquímicos que permite manter ambientes essenciais à vida do homem sem risco de contaminação (UETA et al., 2001).

Estudos demonstraram a capacidade de alguns micro-organismos do solo para degradar parcial ou totalmente atrazina dirigindo-o para a formação de dióxido de carbono e amônia (MANDELBAUM et al., 1995; ROSSEAU et al., 2003 apud SENE et al., 2010). Estudos de bioprospecção de micro-organismos degradadores de atrazina provenientes de solos da Região do Aquífero Guarani foram descritos por UETA et al., 2001.

As amostras de solo provenientes de região de cultivo de cana-de-açúcar com histórico de utilização intensiva de agroquímicos, faz surgir uma preocupação com relação a contaminação das águas subterrâneas do nosso Estado resultante do uso intensivo destes agentes químicos. O desaparecimento ou mesmo a não detecção de espécies degradadoras é comum, dependendo das condições adequadas de ensaio, dos requerimentos nutricionais e das propriedades dos genes responsáveis pela biodegradação das espécies (UETA et al., 2001).

A pesquisa sobre micro-organismos que degradam a atrazina tem sido dirigida para o isolamento e caracterização de linhagens de ocorrência natural nos ambientes contaminados com este pesticida, sendo que a *Pseudomonas* sp. ADP é a estirpe bacteriana melhor caracterizada capaz de degradar o herbicida atrazina (SENE et al., 2010). Entre as bactérias, existem relatos sobre a

degradação da atrazina por cepas individuais, tais como: *Aerobacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Deinococcus* sp. e *Acidovorans delftia* (VARGHA et al., 2005 apud SENE et al., 2010).

Sendo que algumas espécies microbianas isoladas de solo são capazes de metabolizar parcialmente os compostos triazínicos, tais como *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Rhodococcus* NI86/21, TE1 e B-30, *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus stolonifer* (BEHKI; KHAN, 1986; BEHKI et al., 1993 apud UETA et al., 2001). A biodegradação de um complexo de moléculas normalmente envolve o consórcios microbianos ou culturas mistas com dois ou mais micro-organismos, ou seja uma interação de comunidades mistas de micro-organismos levando em conta com a versatilidade metabólica das bactérias e fungos, exemplo de espécies que são usadas em consórcios incluem *Agrobacterium tumefaciens*, *Caulobacter crescentus*, *Pseudomonas putida*, *Sphingomonas yanikuyae*, *Nocardia* sp., *Rhizobium* sp., *Oryzihabitans*; *Flavobacterium* e *Variovorax paradoxus* (SMITH et al. , 2005 apud SENE et al., 2010).

Em nossos resultados obtivemos micro-organismos bioprospectados do solo do cerrado tendo estes a habilidade de metabolizar atrazina. Pretende-se fazer a identificação dos isolados através do sequenciamento parcial do gene 16S *rDNA*. Mas também são necessários mais estudos sobre o destino da molécula de atrazina. E sobre os genes envolvidos na rota metabólica de degradação deste composto.

Pode-se concluir que nas amostras que apresentaram resultado positivo as linhagens envolvidas na biodegradação são distintas. O estudo de biodegradação de atrazina vem sendo realizado por 3 décadas e a seleção de linhagem pura mineralizadora tornou-se um grande desafio aos pesquisadores. Somente em 1995, após décadas de insucesso, vários laboratórios publicaram tal façanha (MANDELBAUM et al, 1995; RADOSEVICH et al, 1995; STRUTHERS et al, 1998 apud UETA et al., 2001) . E desde então, com o advento dos avanços em biologia molecular de micro-organismos o material genéticos destas linhagens, incluindo os genes que lhe dão capacidade de degradação vem sendo descobertos e estudados.

Assim, o este trabalho do ponto de vista da biotecnologia ambiental é de suma importância para conhecer e isolar a microbiota que naturalmente poderá ser ferramenta chave para serem empregados em processos de biorremediação para a descontaminação de sítios contaminados.

4. CONCLUSÃO

Através do projeto desenvolvido pode-se conhecer um pouco da diversidade de micro-organismos cultiváveis com potencial de degradação dos pesticidas utilizados em culturas de cana-

de-açúcar, já que observou-se que as amostras do solo de ambos os locais de coleta apresentaram bactérias com potencial em biodegradar o herbicida atrazina. Assim, o solo estudado com histórico de aplicação do herbicida atrazina apresenta características microbianas favoráveis ao processo de biorremediação, pois apresentou micro-organismos autóctones com capacidade de degradação do poluente orgânico, neste caso a atrazina.

5. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A. S. F. Biodegradação, extração e análise de glifosado em dois tipos de solos. 2002. *Dissertação (Mestrado)* Escola Superior de Agricultura de Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

ARMAS, E. D. Biogeodinâmica de herbicidas utilizados em cana-de-açúcar *Saccharum spp* na sub-bacia do rio Corumbataí. *Tese de doutorado apresentada a ESALQ/USP*, 2006, 186p.

ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. R. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na bacia do rio corumbataí e o risco de poluição hídrica. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo. *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 6, 975-982, 2005.

BAIRD, C. Química Ambiental . Porto Alegre: *Bookman*, 2002. 2. ed. 622 p.

BEHKI, RM e KHAN, SU (1986) - Degradação de atrazina por *Pseudomonas*: N-desalquilação e desalogenação de atrazina e seus metabólitos. *J Agric Food Chem* 34 :. 746-749.

BENKI, RM; Topp, E; Dick, W; Germon P (1993) - Degradação da atrazina, propazine, simazina por *Rhodococcus* tensão e B-30. *J Agric Food Chem* 42: 1237-1241.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Legislação Federal de Agrotóxicos e Afins. *Diário Oficial da União* , Brasília, DF, 12 jul, 1989, p. 011459.

BRITO, G. C. B. A importância da bioprospecção de micro-organismos em áreas contaminadas com produtos derivados do petróleo. Centro Universitário Una – UNA. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente* , v.3, n.3, p. 291-310, dez. 2010.

BONAVENTURA, C.; JOHNSON, F. M. Healthy Environments for Healthy People: Bioremediation Today and Tomorrow. *Environmental Health Perspectives* , v. 105, suppl. 1, p. 5-20, Feb. 1997.

CABRERA. L.; COSTA, F.P.; PRIMEL, E.G. Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na região sul do Estado do RS. *Revista: Química Nova*, Vol. 31, No. 8, 1982-1986, 2008.

CARMO, D. A.; CARMO, A. P. B.; PIRES, J. M. B.; OLIVEIRA, J. L. M. Comportamento

ambiental e toxicidade dos herbicidas atrazina e simazina. *Ambi-Agua*, Taubaté, v. 8, n. 1, p. 133-143, 2013.

CAMPOS, M. M.C. Estudo da remoção e toxicidade dos pesticidas atrazina e oxifluorfem pela cianobactéria *Microcystis novacekii* em condições de cultivo. *Dissertação (Ciências Farmacêuticas)*. Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, 2009.

CANUTO, T. G.; GAMA, A. F.; BARRETO, F. M. de S.; ALENCAR NETO, M. da F. A. Estimativa do risco potencial de contaminação por pesticidas de águas superficiais e subterrâneas do município de Tianguá-CE, com aplicação do método de GOSS e índice de GUS, In: *Congresso brasileiro de águas subterrâneas*. São Luis. Anais. 2010. p. 01-20.

CHAN, K. H.; CHU, W. Effect of humic acid on the photolysis of the pesticide atrazine in a surfactant-aded soil-washing system in acidic condition. *Water Research*, [S.l.], v. 39, p. 2154-2166, 2005.

COUTINHO, H. D ; BARBOSA, A.R. Fitorremediação: Considerações Gerais e Características de Utilização. *Silva Lusitana* 15(1): 103 - 117, 2007 © EFN, Lisboa. Portugal

DAMS, R. I. Pesticidas: Usos e perigos à saúde e ao meio ambiente. *Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal*, v. 7, n. 2, dez. 2006.

DOBSON, A.P., BRADSHAW, A.D., BAKER, A.J.M., 1997. Hopes for the Future: Restoration Ecology and Conservation Biology. *Science* 277 : 515-522.

ESPÓSITO, E. E.; AZEREDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: *Educs*, 2004.

FERREIRA, C. R. R. P. T.; VEGRO, C. L. R.; CAMARGO, M. de L. B. Defensivos agrícolas: desempenho recorde em 2010 e expectativas de aumento nas vendas em 2011. *IEA*. 2011.

FERREIRA, J. V. R. Bioprospecção e identificação de micro-organismos com potencial biotecnológico para biorremediação na interface solo-planta-micro-organismos. *Trabalho de Conclusão de Curso* (Graduação Tecnologia em Biotecnologia) — Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, 2012.

NETO, M. L. F; SARCINELLI, P. N. Agrotóxicos em água para consumo humano: uma abordagem de avaliação de risco e contribuição ao processo de atualização da legislação brasileira. *Engenharia Sanitária e Ambiental* , Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 69 – 78, jan./mar. 2009.

GUEDES, S. F. Estudo da biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, um herbicida selectivo

amplamente utilizado na agricultura, por uma estirpe de penicillium . 210. 280p. Universidade Nova De Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Grupo de Disciplinas de Ecologia e Hidrosfera. *Dssertação de mestrado*, Monte da Caparica, 2010. Orientadora: Ana Lúcia Leitão.

GUIMARÃES, L.T; TURETTA, A.P.D.; COUTINHO, H.L.C. Uma proposta para avaliar a sustentabilidade da expansão do cultivo da cana-de-açúcar no Estado do Mato Grosso do Sul. *Sociedade & Natureza*. v. 22 (2), p.313-327, 2010.

HUNTER, W. J., SHANER, D. L. Biological Remediation of Groundwater Containing Both Nitrate and Atrazine. *Current Microbiology*, v. 60, n. 01, p. 42 – 46, 2010.

KOURAS A.; ZOUBOULIS, A. I.; SAMARA, C.; KOUIMTZIS, T. H. (1998). “Removal of pesticides from surface waters by combined physicochemical processes”. Part II: Lindane. *Environmental Pollution*, 103 (2-3), pp. 193-202.

LARA, WH.; BARRETO, HH. Resíduos de pesticidas clorados em águas. *Revista IAL*. 32: 69-74. 1972.

LÓPEZ, L .; POZO, C .; Rodelas, B .; CALVO, C .; Juarez, B .; MARTÍNEZ-TOLEDO, M.V .; & GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. (2005). "A identificação de bactérias isoladas de um lago, oligotróficas". *Ecotoxicology*, 14, pp. 299-312.

MANDELBAUM, RT; ALLAN, RD; WACKETT, LP (1995) - Isolamento e caracterização de uma Pseudomonas sp que mineraliza a s-triazina herbicida atrazina. *Appl Environ Microbiol*. 61: 1451-1457.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2004). Meios de produção. Tabela 4.3: Vendas de defensivos agrícolas. *Vendas 1992- 2004*.

MARASCHIN, L. Avaliação do grau de contaminação por pesticidas na água dos principais rios formadores do pantanal mato-grossense. 2003. 88 f. *Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente)*- Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, 2003.

MARTINS, A. Biorremediação. *III Fórum de Estudos Contábeis* (2010), Faculdades Integradas Claretianas. Rio Claro, SP. Disponível em: <www.ceset.unicamp.br/ite/artigos/3fec2401>. Acesso em: 22 de julho de 2014.

MOREIRA, M. Identificação de consorcio bacteriano com potencial para biorremediação de arsênio e sulfeto. *Dissertação (Engenharia Ambiental)*; Universidade Federal de Ouro Preto- Minas Gerais, 2013.

OLIVEIRA, J. L. M. Comportamento do dicofol e da atrazina nos processos de tratamento de esgoto por lodo ativado e de pós-tratamento do lodo por biodigestores anaeróbios. 2008. 138f. *Tese (Doutorado em Microbiologia)* - Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

PEIXOTO, M.S.P; LAVORENTI, A; REGITANO, JB; TORNISIELO, VL (2000) – Degradação e formação de resíduos ligados de ¹⁴C- atrazina em latossolo vermelho escuro e glei húmico. *Sci Agric* 57.

PIRES, F.R., SOUZA, C.M., SILVA, A.A., PROCÓPIO, S.O., FERREIRA, L.R., 2003. Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. *Planta Daninha* 21(2) : 335-341.

QUEIROZ, B. P. V. de; MONTEIRO, R. T. R. Degradação de ¹⁴C-Atrazina em solo sob condições semicontroladas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35, n. 04, p. 849- 856, 2000.

RADOSEVICH, MS; TRAINA, SJ; HAO, Y-L; TUOVINEM, O (1995) A degradação e mineralização de atrazina por bactérias do solo isolares. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 297-302.

RALEBITSO, T. K.; SENIOR, K.; VanVERSEVELD, H. W. Microbial aspects of atrazine degradation in natural environments. *Biodegradation* , Dordrecht, v. 13, n. 1, p. 11-19, jan. 2002.

REGITANO, J. B.; BONFLEUR, E. J. Pesticides residues in the environment: processes. *II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais* (2011) – Foz do Iguaçu, PR. Volume I – Palestras.

RIBEIRO, M. L. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. *Química Nova* , São Paulo, v. 30, n. 3, p. 688-694, maio/jun. 2007.

ROUSSEAU, S.; HARTMANN, A.; LAGACHERIE, B.; PIUTTI, S.; ANDREUX, F.; SOULAS, G. (2003), A inoculação da estirpe atrazina-degradantes, *Chelatobacter heintzii* Cit1, em grupos de quatro diferentes tipos de solos: . efeitos de diferentes densidades de inóculo . *Chemosph*, 51 , 569 - 576.

SANCHES, S.M. et al . Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. Pesticidas: *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, Curitiba, v. 13, p. 53-58, 2003.

SENE,L.; CONVERTI, A.; SECCHI, G.A.R; SIMAO, R.C.G. New aspects on atrazine biodegradation. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2010, vol.53, n.2

SINDAG. Estatísticas de consumo de defensivos agrícolas no Brasil. *Sindicato nacional da indústria de produtos para defesa agrícola*. São Paulo, 2001.

SMITH, D.; ALVEY, S.; CROWLEY, D.E. Vias catabólicas cooperativos dentro de uma cultura de enriquecimento atrazina degradante isolado do solo (2005). *FEMS Microbiol. Ecol.*, **53**, 265 - 273.

SOUZA, Bruno Santos Avaliação do Processo de H₂O₂/UV como Pós- Tratamento e Remoção da Atrazina de um Efluente Secundário de ETE para Fins de Reuso. *Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química*, 2011.

STRUTTERS, JK; JAYACHANDRAN, K; MOORMAN(1998) - Biodegradação de atrazina por *Agrobacterium radiobacter* J14a e utilização desta estirpe em biorremediação de solos contaminados. *Appl. Environm. Microbiol* 64: 33688-3375.

UETA, J.; PEREIRA, N. L.; SHUHAMA, I. K.; CERDEIRA, A. L. Biodegradação de herbicidas e biorremediação: micro-organismos degradadores do herbicida atrazina. *Biotecnologia*, Brasília, v. 10, p. 10-13, 1999.

UETA, J*;N.L*; SHUHAMA, I,K*; CERDEIRA, A.L. Biodegradação de herbicidas e biorremediação: micro-organismos degradadores de atrazina provenientes de solos da Região do Aquífero Guarani. *Revista Plantio Direto*, 1 fev. 2001.

USEPA (Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos. Sobre Agrotóxicos. *Pesticidas Home*. 2009 Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticidas/about/index.htm>> Acesso em: 23 de julho de 2014. .

VARGHA, M., TAKATS, Z., MARIALIGETI K. (2005), a degradação da atrazina em um sistema modelo em escala de laboratório com o rio Danúbio sedimentos. *Wat. Res.*, 39 , 1560 - 1568.

VIDALI, M. Bioremediation. *Pure Applied Chemistry* , v. 73, n. 7, p. 1163-1172, 2001.

WARREN L. A., HAACK E. A. Controles biogeoquímicos sobre o comportamento do metal em ambientes de água doce. *Earth-Science Reviews* Volume 54, Issue 4, August 2001, Pages 261–320.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chemical safety of drinking water: assessing priorities for risk management . Geneva: *World Health Organization*, 2007. 160 p.

YEN, PY; KOSHIKEN, WC; SCHWEIZER, EE. (1994) - Dissipação de alachlor em quatro tipos de solos, influenciados por processos de degradação e sorção. *Weed Sci.* 42: 233-240.