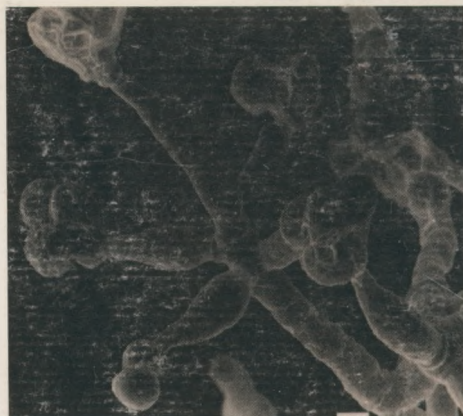


WORKSHOP SOBRE BIODEGRADAÇÃO

14 a 16 de outubro, 1996

Campinas, SP



Anais....

1996

PC-PP-1996.0506A

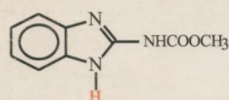


CNPMA-13439-1

COOCH₃

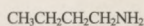
NHCH₂CH₂CH₂CH₃

Benomil

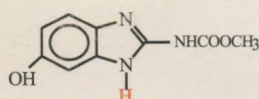


Carbendazim

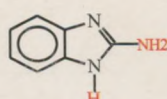
+



n - Butilamina



5-Hidroxicarbendazim



2-Amino-Benzimidazol

?

2-AB nucleotídeo

CO₂

Anais

Embrapa





ISSN 1413-0084

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental - CNPMA

Ministério da Agricultura e do Abastecimento - MA

WORKSHOP SOBRE BIODEGRADAÇÃO

14 a 16 de Outubro de 1996

Campinas, SP

ANAIS

Jaguariúna, SP
1996

Embrapa-CNPMA. Documentos, 5.

Exemplares dessa publicação podem ser solicitados à:

Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental - CNPMA

Rodovia SP 340 - km 127,5 - Bairro Tanquinho Velho

Caixa Postal 69

13820-000 - Jaguariúna, SP

Fone: (019) 867-5633

Fax: (019) 867-5225

e.mail: adi@cnpmembrapa.br

Editoração: Ivanilde Dispatto

Normalização: Maria Amélia de Toledo Leme

Digitação e diagramação: Maria Inês Martins

Tiragem: 500 exemplares

Impressão: Emopi Gráfica e Editora Ltda.

WORKSHOP SOBRE BIODEGRADAÇÃO, 1996.
Campinas. *Anais*. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA,
1996. 256p. (Embrapa-CNPMA. Documentos, 5).

1.Pesticidas-biodegradação.2.Bioremediação. I.Título. II.
Série.

CDD 632.95043

©Embrapa-CNPMA, 1996

WORKSHOP SOBRE BIODEGRADAÇÃO

Realização: Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental (CNPMA)

Promoção: - Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA)

- Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)
- Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente
- Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental (CNPMA)

Apoio: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

PATROCINADORES

AGREVO - Hoeschst Schering AgrEVO do Brasil Ltda.

ANDEF - Associação Nacional de Defesa Vegetal

BAYER S.A.

BIOAGRI - Biotecnologia Agrícola Ltda.

CIBA AGRO - Ciba-Geigy Química S.A.

DU PONT do Brasil S.A.

FMC do Brasil S.A.

LEO - Microscopia Eletrônica Ltda.

MARCONI Equipamentos Laboratórios

MERCK SHARP & DOHME

NESTLÉ Industrial e Comercial Ltda.

RHODIA AGRO Ltda.

ROHN & HAAS Brasil Ltda.

COMISSÃO ORGANIZADORA

Itamar Soares de Melo (Presidente)

Ariovaldo Luchiari Júnior

Rosângela Blotta Abakerli

Rosa Toyoko S. Frighetto

Pedro José Valarini

Célia Maria M.S. Silva

Regina T.R. Monteiro (CENA)

Luis Antonio S. Melo

Shirlei Scramin

Leslie M.S. Zavatti

Manoel Messias A.S. Júnior

Vera Lúcia Ferracini

Roberto Cesnik

Comissão Científica: Regina T.R. Monteiro (CENA)

Itamar Soares de Melo

Rosa Toyoko S. Frighetto

Vera Lúcia R. Bononi (Instituto de Botânica)

Sioni Maluf Barbieri (UFSCar)

Maria Raphaela Musumeci (Instituto Biológico SP)

Cristine Gallarde (UFRGS)

Comissão de Divulgação: Eliana de Souza Lima
Regina Lúcia S. Rodrigues
Cláudia Regina Viscardi

Comissão de Apoio: Regina Lúcia S. Rodrigues
Agnelo Frizi Filho
Dagmar Nunes S. Oliveira
Deliane de Oliveira
Edislene A. B. Ruzza
Ivanilde Dispato
Margarete E. N. Crippa
Maria Amélia de Toledo Leme
Maria Inês Martins
Maria Terezinha Siscaro
Marilza Ap. Stefanuto
Nilce Chaves Gattaz

PROGRAMA

Segunda-feira, 14.10.96

8:30-9:00 Abertura

9:00-10:00 Padrões de Qualidade de Solo e Águas Subterrâneas
Palestrante: Dra. Dorothy C.P. Casarini (CETESB)

10:15-12:15 Mesa-Redonda: Avanços Tecnológicos em Biodegradação de Pesticidas.

Coord.: Dr. Marçal Zuppi da Conceição (ANDEF)

“Processos de Degradação de Pesticidas em Solo e Água”

Dr. Luiz Lonardoní Foloni (UNICAMP-Cps)

“Lixiviação de Pesticidas no Solo”

Dr. Rene L.O. Rigitano (UFLA-Lavras, MG)

“Mecanismos de Adsorção de Pesticidas no Solo”

Dr. Guilherme Luiz Guimarães (DowElanco-São Paulo, SP)

“Metodologias para Avaliação de Pesticidas no Solo e na Água”

Dr. Álvaro A.T. Vargas (Bioagri-Piracicaba, SP)

11:45-12:15 Debates

14:00-15:00 Importância do Uso de Métodos Padronizados nos Estudos de Degradação de Pesticidas: Experiência em Condições Brasileiras

Palestrante: Dra. Mara Mercedes de Andrea (IB-SP)

15:15-16:15 Monitoramento Químico e Biológico de Áreas Contaminadas - Tecnologias Emergentes

Palestrante: Dr. René Schneider (Austrália)

16:15-18:00 Mini-Simpósio : Interação entre Pesticidas e a Microflora do Solo

Coord.: Dra. Sioni Maluf Barbieri (UFSCar)

Degradação de ^{14}C -Atrazina em Condições de Campo

B. P.V. de Queiroz, R.T.R. Monteiro, P.B. e A. Wais
(CENA/USP)

Mineralização de Atrazina em Meio de Cultura de Microrganismos
Obtidos por Cultura de Enriquecimento do Solo
M.A. Albuquerque, A.C. Johnson e M. Wood

Influência de Teor de Carbono na Degradação de ^{14}C -Trifluralina
em Solos

A.C. Cella, M. Storino e R.T. Monteiro

Evidências da Via Metaclivagem do Catecol em *P. putida*
 $\text{Crim}_3\text{C}_1\text{C}$

E.K., Yonamine, J.B. Molfetta & S.M. Barbieri

Degradação do Fungicida Carbendazim e Caracterização
Molecular de Mutantes de *Trichoderma harzianum*

I.S. Melo, C.M.M.S. Silva, A.C.F. Silva e J.L. Faull

Bioacumulação e Cotransporte do Acaricida Dicofol pela
Pseudomonas fluorescens

B. Brunninger, B.C. Vasconcellos; S.J. Maciel e T. Langenbach
(Instituto de Microbiologia).

Terça-feira, 15.10.96

8:30- 9:45 **Interação Metais Pesados x Microrganismos**

Palestrante: Dr. Oswaldo Garcia Júnior (UNESP-Araraquara)

10:00-12:00 **Mesa-Redonda: Herbicidas no Meio Ambiente**

Coord.: Dr. Ariovaldo Luchiari Júnior (EMBRAPA-CNPMA)

Palestrantes: **“Comportamento de Herbicidas no Meio Ambiente”**

Dr. Arquimedes Lavoretti (ESALQ-USP)

**“Mecanismos de Sorção e Degradação de Herbicidas em Solos
e Água”**

Dr. Ladislau Martin Neto (EMBRAPA-CNPDA)

“Biodegradação de Herbicidas”

Dra. Regina T. Rosim Monteiro (CENA-USP)

“Distribuição de Triazinas em Diferentes Solos Brasileiros”

Dr. Tomaz Langenbach (UFRJ)

13:30-15:00 Seção de Pôsteres

Coord.: Dra. Célia M. M. S. Silva (EMBRAPA-CNPMA)

14:00-14:45 Biodegradação de Cafeína

Palestrante: Dr. Paulo Mazzafera (UNICAMP)

14:45-15:30 Perspectiva de Utilização do Solo como Agente de Purificação e Detoxicação de Resíduos Líquidos da Indústria Cítrica

Palestrante: Dra. Djanira de S. Angelis (UNESP, RJ)

16:00-17:00 Geração e Uso de Dados Sobre Destino Ambiental na Determinação de Segurança Ecológica de Produtos Fitossanitários.

Palestrante: Dr. Joseph J. Dulka (Du Pont-USA)

17:00-17:45 Plástico Biodegradável de Origem Bacteriana

Palestrante: Dra. Maria Filomena de Andrade (IPT-SP)

Dr. Celso Lellis Bueno Neto (IPT-SP)

Quarta-feira, 16.10.96

8:30-9:45 Bioremediação de Áreas Contaminadas

Palestrante: Dr. Jean Marc Bollag (Pennsylvania-USA)

10:00-11:00 Microrganismos Utilizados como Indicadores de Agentes Genotóxicos

Palestrante: Dra. Tânia Maria A.D. Zucchi (Instituto de Ciências Biomédicas - USP)

11:00-12:00 Eliminação Biológica de Fósforo: Tecnologia de Baixo Custo e Alta Eficiência

Palestrante: Dr. Miguel A. Rubio (Argentina)

14:00-15:00 **Biodegradação de Petroquímicos**

Palestrante: Dra. Christine Gallarde (UFRGS)

15:15-16:30 **Recuperação de Áreas Contaminadas por Hexaclorobenzeno e Pentaclorofenol**

Palestrante: Dra. Vera L. R. Bononi (Instituto de Botânica, SP)

16:30-17:30 **Regulamentação de Agentes Biológicos para Fins de Bioremediação: Situação Brasileira**

Palestrante: Dr. Mário Cesar B. de Oliveira (IBAMA)

17:30 **Encerramento**

Quinta-Feira, 17.10.96

Visita ao Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental (CNPMA).

SUMÁRIO

Pág.

PALESTRAS

Padrões de Qualidade de Solo e Água Subterrânea D.C.P. Casarini.....	21
Microrganisms for Detection of Genotoxic Agents T.M.A.D. Zucchi, L.T. de A. Pires.....	39
Bioremediation of Contaminated Environmental Sites J.M. Bollag.....	40
Biodegradation of Petrochemicals C.C. Gaylarde.....	52
Interação Metais e Microrganismos O. Garcia Júnior.....	54
Eliminación Biológica del Fósforo: Tecnología de Bajo Costo y Gran Efectividad. Presentación de Resultados de la Primera Planta Argentina con Eliminación Integral Biológica M.A. Rubio.....	74
Importância do Uso de Métodos Padronizados nos Estudos de Degradação de Pesticidas: uma Experiência em Condições Brasileiras M.M. de Andréa.....	77
Comportamento dos Herbicidas no Meio Ambiente A. Lavoretti.....	81
Mecanismos de Sorção e Degradação de Herbicidas em Solos e Água L. Martin-Neto.....	116
Biodegradação de Herbicidas R.T.R. Monteiro.....	120
Distribuição de Triazinas em Diferentes Solos Brasileiros T. Langenbach.....	129
Biodegradação de Cafeína P. Mazzafera.....	131
Plástico Biodegradável de Origem Bacteriana C.L. Bueno Netto.....	141

Emergentes	
R.P. Schneider.....	152
Generation and Use of Environmental Fate Data to Determine Ecological Safety of Crop Protection Products	
J.J. Dulka.....	183
Regulamentação de Agentes Biológicos para Fins de Bioremediação: Situação Brasileira	
M.C.B. de Oliveira.....	206

RESUMOS

Degradação de ^{14}C -Atrazina em Condições de Campo	
B.P.V. de Queiroz, T.R. Monteiro, P. Buranel e A. Wais.....	213
Mineralização de Atrazina em Meio de Cultura de Microorganismos Obtidos por Cultura de Enriquecimento do Solo	
M.A. Albuquerque, A.C. Johnson e M. Wood	214
.....	
Degradação do Fungicida Carbendazim e Caracterização Molecular de Mutantes de <i>Trichoderma harzianum</i>	
I.S. Melo, C.M.M.S. Silva, A.C. F. Silva e J.L. Faull.....	215
Influência do Teor de Carbono na Degradação de ^{14}C -Trifluralina em Solos	
Cella, A.C., Storino M. e Monteiro, R.T.R.....	216
Bioacumulação e Cotransporte do Acaricida Dicofol pela <i>Pseudomonas Fluorescens</i>	
B. Brunninger, B.C. Vasconcellos, S.J. Maciel e T. Langenbach.....	217
Isolamento e Comportamento de Rhizobactérias Resistentes ao Herbicida Diuron	
M.R.A. Roque, I.S. Melo, D.M.Y. Yano, R.T.S. Frighetto e V. Alves....	219
Biodegradação do Herbicida Atrazina por Linhagens de <i>Penicillium</i> e <i>Eupenicillium</i>	
I.S. Melo, C.M.M.S. Silva, E. Fay, A.M.R. Cassiolato e A.C. Rosamiglia.....	221
Determinação da Biomassa Microbiana em Solo Tropical Através da Técnica de Fosfolípeidos	
J. Brigante e S.M. Barbieri.....	222

Poluição de Voláteis e Lixiviados em Solo Contaminado com BHC P. Österreicher-Cunha, J.P.M.Torres, A. R. Wagner e T. Langenbach...	223
Utilização de Benomil como Única Fonte de Carbono por Biótipos de <i>Trichoderma Harzianum</i> e <i>Trichoderma Viride</i> , Obtidos por Radiação y	224
A.C.F. Silva, R.T.R. Monteiro e J.O.M. Menten.....	
Requisitos Nutricionais para o Fungo <i>Alternaria Alternata</i> C.M.M.S. Silva e I.S. Melo.....	225
Compostagem Natural do Lixo Domiciliar Urbano através de Leiras Estáticas e Revolvidas P. Fortes Neto e P.A. Selbach.....	226
Degradação e Influência do Pentaclorofenol (Pcp) no Desempenho de Reatores Anaeróbios Alimentados Semi-Continuamente, Inoculados com Lodos de Diversas Procedências M.H.R.Z. Damianovic, R.M.L. Bolaños e E. Foresti.....	227
Avaliação da Atividade Microbiana em Função da Adição de Lodo Industrial ao Solo F.S.Fadigas, D.M.F.Oliveira, J.T.Tavares, J.A.Costa e J.A G. Santos.....	228
Contaminação por Metais Pesados em Solo e Cana-de-Açúcar pela Aplicação de Lodo de Esgoto. I. Efeito Imediato F.C.Da Silva, A.E. Boaretto, R.S. Berton, C.A. Pexe e H.B. Zotelli.....	229
Contaminação por Metais Pesados em Solo e Cana-de-Açúcar pela Aplicação de Lodo de Esgoto. II.Efeitos Residual e de Reaplicação F.C.Da Silva, A.E. Boaretto, R.S. Berton, C.A. Pexe e H.B. Zotelli.....	230
Biotransformação de Filmes de Pvc por Tratamento com Chorume S.M.M. Franchetti, E.R. Silva e M.L.B.O. Rodrigues.....	231
Descoloração de Indigotina Azul por Basidiomicetos Ligninolíticos D.S.L.Balan e R.T.R.Monteiro.....	232
Produção de Biosurfactantes por Leveduras Isoladas de Óleo Diesel D.F. Carvalho, D.D. Marchi e L.R. Durrant.....	233
Adaptation Of <i>Acinetobacter Calcoaceticus</i> on Artificial Ceramic Plant Effluent M.L. Bedin, M.E. Perez-Barinotto, T.C.P. Barbosa e N.H. Gabilan.....	234

Influence of Nitrogen Source on Phenol Degradation by <i>Pseudomonas Sp.</i>	
M.E. Pérez-Barinotto, T.C.P. Barbosa, J. Guimaraes e N.H. Gabilan.....	235
Biodegradação Bacteriana de PCBs em Sedimentos do Estuário de Santos, SP	
P.V. Bertacini, R.C.Montone, R.R.Weber e V.H.Pellizari.....	236
Isolamento de Microrganismos Degradadores de Criseno	
G. Brucha, C.R. Nakayama e S.M. Barbieri.....	237
Evidências da Via Metaclivagem do Catecol em <i>P. Putida</i> CRIM ₃ C ₁ C	
E.K. Yonamine, J.B. Molfetta e S.M. Barbieri.....	238
Tolerância de Basidiomicetos Nativos a Altas Concentrações de Hexaclorobenzeno (HCB), em Solo Contaminado por Organoclorados	
D.R. Matheus, D. Santos e V.L.R. Bononi.....	240
Bioconversão de Nitrilas e Amidas por um Isolado de <i>Candida Guilliermondii</i>	
J.C.T. Dias, C. A. Rosa e V. R. Linardi.....	241
Metabolismo de Cafeína em <i>Pseudomonas Putida</i> Isolada de Solo: Caracterização da Via de Degradação e de Enzimas Envolvidas	
D.M.Y. Yano e P. Mazzafera.....	242
Efeito da Adição de Substrato Lignocelulósico no Crescimento de Fungos Basidiomicetos em Solo com Baixo Teor de Matéria Orgânica	
K.M.G. Machado, D.R. Matheus, C. Fabris e V.L.R. Bononi.....	243
Biodegradação Anaeróbia de Celulose a Partir de Cultura Bacteriana Mista Presente no Chorume de Depósito de Lixo Urbano à Céu Aberto	
L.P. Gomes, J. Povinelli, E.R.F. Vazoller.....	244
Isolamento de Linhagens Melhoradas de <i>Trichoderma Harzianum</i> para Degradação de Celulose	
I.S. Melo, J.L. Faull, K.A. Graeme-Cook.....	245
Enzimas Ligninolíticas Produzidas Por Fungos Cultivados Sob Condição Microaeróbica	
L.D. Sette e L.R. Durrant.....	246
Seleção de Microrganismos Ligninolíticos e Estudo da Produção das Enzimas Lignocelulolíticas	
A.H. Aoki e L.R. Durrant.....	247

Seleção de Fungos Capazes de Degradar Material Lignocelulósico sob Condições Aeróbica e Microaeróbica	
E.C. Pavarina e L.R.Durrant.....	248
Seleção de Fungos Ligninolíticos e Estudo do Sistema Enzimático e da Degradação de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos	
A.R. Clemente e L.R. Durrant.....	249
Vanilina como Produto da Biodegradação de Compostos Fenólicos Aromáticos Derivados da Lignina	
H.R.F.Bavutti e L.R.Durrant.....	250
Estudo do Sistema Ligninolítico do Fungo Linhagem H2 e Utilização de “Indutores” no Aumento das Atividades Enzimáticas	
E.B. Neves e L.R. Durrant.....	251
Descoloração de Indigotina Azul por Basidiomicetos Ligninolíticos	
D.S.L. Balan e R.T.R.Monteiro.....	252
Diversidade Lignocelulolítica de Fungos Manchadores e Apodrecedores de Madeiras Amazônicas	
M.A. Jesus.....	253
ÍNDICE DE AUTORES.....	254

PADRÕES DE QUALIDADE DE SOLOS E ÁGUAS SUBTERRÂNEAS

Prof. Dra. Dorothy Carmen Pinatti Casarini, EQSS-Sector de Qualidade de
Solos e Águas Subterrâneas-CETESB, Av. Prof. Frederico Hermann Jr.,
345, São Paulo - SP - 05489-000 - Brasil, e-mail: dorothy@cetesb.br

Introdução

Desde muitos anos e em muitos países, substâncias químicas resultantes das atividades antropogênicas tem se acumulado no solo e nas águas subterrâneas. Entretanto desde a década de setenta, em função da intensificação da atividade industrial, agrícola e doméstica o processo de liberação descontrolada de substâncias químicas em caráter e em escala de fonte de poluição de solo e águas subterrâneas pode ser pontual, tais como tanques, aterros industriais e domésticos ou armazenamento de resíduos perigosos ou ser dispersa como fertilizantes, agrotóxicos e fezes sépticas. O transporte ou migração destes poluentes do solo para as águas superficiais e subterrâneas, constitui a principal ameaça para a qualidade da água de abastecimento em muitos países inclusive no Brasil.

PALESTRAS

O caráter internacional do problema de contaminação de solo é também muito conhecido em função dos incidentes como Love Canal nos Estados Unidos e Lekkerkerk na Holanda, onde um condomínio foi construído sobre um sítio industrial.

A preocupação em relação as consequências desastrosas e a vulnerabilidade do ecossistema, entretanto tem somente emergido recentemente em nosso país. Atualmente já se admite que o solo é um importante recurso

PADRÕES DE QUALIDADE DE SOLOS E ÁGUAS SUBTERRÂNEAS

Prof. Dra. Dorothy Carmen Pinatti Casarini. EQSS-Setor de Qualidade de Solos e Águas Subterrâneas-CETESB. Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345, São Paulo, SP - 05489-900 - Brasil. e-mail: dorothe@cetesb.br

Introdução

Desde muitos anos e em muitos países, substâncias químicas resultantes das atividades antropogênicas tem se acumulado no solo e nas águas subterrâneas. Entretanto desde a década de setenta, em função da intensificação da atividade industrial, agrícola e doméstica o processo de liberação descontrolada de substâncias tóxicas tem mudado em caracter e em escala de fonte de poluição de solo e águas subterrâneas pode ser pontual, tais como lençóis, aterros industriais e domésticos ou armazenamento de resíduos perigosos ou ser dispersa como fertilizantes, agrotóxicos e fossas sépticas. O transporte ou migração destes poluentes do solo para as águas superficiais e subterrâneas, constitui a principal ameaça para a qualidade da água de abastecimento em muitos países inclusive no Brasil.

O caráter internacional do problema de contaminação de solo é também muito conhecido em função dos incidentes como Love Canal nos Estados Unidos e Lekkerkerk na Holanda, onde um condomínio foi construído sobre um atêrro industrial.

A preocupação em relação as conseqüências desastrosas e a vulnerabilidade do ecossistema, entretanto tem somente emergido recentemente em nosso país. Atualmente já se admite que o solo é um importante recurso

natural limitado do meio ambiente. O conceito de proteção do solo começa a despertar como uma proposta nas políticas e legislações ambientais, considerando-se sua multifuncionalidade. Entre suas principais funções as seguintes foram elencadas pelo “Council of Europe” (1990): reserva gênica e habitat biológico; produção de biomassa; função de transformação, biodegradação, imobilização, filtração, tamponamento e armazenamento; fonte de água, cascalho, areia, argila e outros minerais; função de meio físico contrutivo e depósito paleontológico e arqueológico.

Vários países, como os Estados Unidos, Canadá e Oeste Europeu, desde a década de oitenta, já possuem legislações específicas, enquanto que outros como o Japão, a Austrália e o Brasil só mais recentemente iniciou o desenvolvimento de projetos específicos de prevenção e controle da poluição do solo e das águas subterrâneas.

1. Padrões e Legislações Internacionais

O equacionamento da problemática da poluição do solo e das águas subterrâneas, depende do desenvolvimento de políticas e legislações, que funcionem como diretrizes para pesquisas de poluição e estabelecimento de procedimentos, critérios e padrões de referência e remediação.

Siegrist (1989) e Visser (1994) realizaram uma revisão da legislação, critérios e padrões sobre contaminação de solos e águas subterrâneas e apresentam o seguinte cenário internacional.

Estados Unidos

Nos Estados Unidos, não há uma legislação nacional única para estabelecer metas de intervenção e remediação para locais contaminados com resíduos perigosos. Existem leis federais, mas as agências podem usar leis estaduais.

A EPA (USEPA, 1994) estabeleceu um procedimento para avaliar locais contaminados, denominado SSLs (Soil Screening Levels) que identifica níveis de contaminação do solo onde uma intervenção e/ou remediação deve ser implementada. O SSLs foi desenvolvido para 107 compostos químicos, considerando três vias de exposição, ingestão do solo, inalação de voláteis e poeira e ingestão de água subterrânea contaminada. A avaliação é feita caso a caso, utilizando-se os níveis SSLs podendo quando necessário, desenvolver-se uma análise de risco utilizando-se modelos matemáticos específicos.

Canadá

Neste país, há um pequeno guia nacional para determinar a significância da contaminação e estabelecer metas de remediação. A Província de Alberta, publicou um guia com níveis de concentrações aceitáveis para alguns metais em solos ácidos. Baseou-se em muitos fatores, incluindo fitotoxicidade e bioacumulação. A Tabela 1, destaca os elementos e os níveis aceitáveis em pH $\leq 6,5$.

Níquel	250	800
Prata	0,05	0,2
Mercúrio	0,2	1
Chumbo	60	200
Cobalto	100	300
Cromo total	120	1000

Tabela 1. Níveis aceitáveis de Metais em solo ($\text{pH} \leq 6,5$)

Metal	Nível aceitável (mg/Kg)
Cádmio	1
Cromo	600
Cobalto	100
Cobre	200
Chumbo	800
Níquel	250
Zinco (pastagem)	100
Zinco (outros)	700

Fonte: Sannings & Stietzel (1993).

A Província de Ontário, possui um guia publicado pelo Ministério do Meio Ambiente, para inicialmente tratar as principais áreas industriais contaminadas. A Tabela 2 mostra o critério de cenários proposto e seus níveis de metais.

Tabela 2. Critério de Cenários proposto e seus Níveis de Metais

Metal	Critério Proposto		
	Residencial Agricultura	Comercial Parques	Industrial
Concentração	(ppm)	(ppm)	(ppm)
Arsênio	14	25	50
Cádmio	1 - 6	4	8
Cromo (6+)	-	10	10
Cromo total	120	1000	1000
Cobre	100	300	300
Chumbo	60	500	1000
Mercúrio	0,5	1	20
Prata	-	25	50
Zinco	220	800	800

Fonte: Sannings & Stietzel (1993).

Esta referência foi feita para utilização de lodo de esgoto na agricultura. Para áreas de residências/parques, comércio e indústria, foi baseado na fitotoxicidade, exceto para cádmio, chumbo e mercúrio, para os quais foram utilizados testes toxicológicos de saúde humana. Para solos de textura grosseira (areia), os níveis de metais devem ser reduzidos pela metade.

A Província de Quebec, em 1988, publicou um guia para remediação de locais contaminados. Entre outros aspectos, este documento formalizou um sistema “ABC”. Neste sistema, os valores foram em grande parte derivados do Sistema Holandês. O valor A é equivalente ao valor natural (*Background*) ou limite de detecção analítica, o valor B é indicativo de contaminação moderada e o valor C indica contaminação severa. Para metais pesados, o valor B é igual aos padrões de água potável, quando disponível, e o valor C, igual ao critério de disposição de esgotos. A Tabela 3 descreve as concentrações no solo (mg/Kg) para alguns metais nas condições A, B e C.

Tabela 3. Níveis de Metais em Solo em condições A, B e C

Metal	Concentração matéria seca (µg/Kg)		
	A	B	C
Arsênio	10	30	50
Bário	200	500	2000
Cádmio	1,5	5	20
Cromo	75	250	800
Cobre	50	100	500
Chumbo	50	200	600
Mercúrio	0,2	2	10
Prata	2	20	40
Cobalto	15	50	300
Molibidênio	2	10	40
Zinco	100	500	1500

Fonte: Sannings & Stietzel (1993).

Um protocolo nacional para definir um critério de qualidade do solo, foi estabelecido em 1992 considerando o uso do solo, para saúde pública e ambiental. Este critério considera as características físicas e químicas do contaminante, bem como testes toxicológicos e de exposição. O objetivo foi avaliar o destino e o comportamento do poluente no solo e a possibilidade deste atingir a água subterrânea. A proposta considera critérios para saúde pública (EDI, Estimated Daily Intake) e critérios para o ecossistema (Diferentes cenários ou uso do Solo), com o objetivo final de se buscar um critério genérico (Tabela de Padrões de Referências).

Inglaterra

Na Inglaterra existe um guia Federal listando as “Concentrações Gatilho”. Estas concentrações limites têm sido estabelecidas baseadas em grande parte em critérios e padrões existentes. São utilizados para vários usos do solo e por uma variedade de contaminantes usualmente encontrados em locais industriais reutilizados para outros fins. Após as investigações, se as concentrações dos metais estiverem acima das concentrações gatilho, uma ação de remediação deve ser tomada, ou alternativamente, mudar o plano de reuso do local para situações menos nobres. A Tabela 4 descreve as concentrações gatilho para metais em diferentes locais.

Tabela 4. Concentrações Gatilho de Metais em Solo

Metal	Plano de Uso do Solo	Concentração Gatilho
		matéria seca (mg/Kg)
Arsênio	Jardins Domésticos, Loteamento	10
	Parques	40
Cádmio	Jardins Domésticos, Loteamento	3
	Parques	15
Cromo 6	Jardins Domésticos, Loteamento	25
	Parques	25
Cromo Total	Jardins Domésticos, Loteamento	600
	Parques	1000
Chumbo	Jardins Domésticos, Loteamento	500
	Parques	2000
Mercúrio	Jardins Domésticos, Loteamento	1
	Parques	20
Cobre	Qualquer uso onde há crescimento vegetal	130
	Qualquer uso onde há crescimento vegetal	300

Fonte: Sannings & Stietzel (1993).

Holanda

A Holanda foi o primeiro país a desenvolver um programa nacional para avaliação do nível de contaminação e definir formas de remediação de solos e águas subterrâneas. Estabeleceu padrões considerando o princípio de multifuncionalidade do solo, definindo critérios para a avaliação e remediação de locais contaminados. Estes critérios, resultou em uma lista frequentemente referida como a “Lista Holandesa”. Estabelecida em 1983, o sistema “ABC” inclui três valores tanto para solos como para água subterrânea. O Valor A é um limite abaixo do qual o solo pode ser considerado não poluído e acima do qual

uma investigação preliminar pode ser requerida. O Valor B é um limite acima do qual futuras investigações podem ser requeridas para definir a extensão da contaminação e riscos potenciais. O Valor C é um limite acima do qual normalmente é requerido alguma intervenção ou remediação preferencialmente de volta ao valor A.

O critério ABC foi estabelecido a partir de um esboço, o qual incluía três fatores principais, julgados importantes para a avaliação de magnitude da contaminação.

- Natureza e concentração das substâncias contaminantes;
- Condições específicas do local que afetem a migração e o destino do contaminante;
- Uso e funções do solo e grau de exposição e risco.

Os valores A, para metais, foram estabelecidos baseados na média dos níveis naturais em solos não poluídos da Holanda. Este critério ABC não foi concebido para ser padrão, mas sim limites para decisões sobre a necessidade de maiores investigações e avaliação de riscos. Na prática, entretanto, este critério tem sido implementado como se fosse de fato padrão.

Este critério tem sido usado pelos Estados da Holanda para orientar sobre usos do solo. Por exemplo, solos com valores acima do nível C são dispostos em aterros de materiais perigosos, enquanto que aqueles com nível entre B e C podem ser dispostos em aterros controlados, e ainda, aqueles com níveis entre A e B podem ser usados como cobertura ou enchimento de construção. Onde estão envolvidas atividades de habitação, a meta para qualidade de solo é geralmente o nível A. A Tabela 5 mostra os níveis de metais em solo.

Tabela 5. Níveis de Metais em Solo

Metal	Concentração matéria seca (mg/Kg)		
	A	B	C
Arsênio	20	30	50
Bário	200	400	2000
Cádmio	1	5	20
Cromo	100	250	800
Cobre	50	100	500
Chumbo	50	150	600
Mercúrio	0,2	2	10
Prata	2	20	40
Cobalto	20	50	300
Molibidênio	10	40	200
Zinco	200	500	3000

Fonte: Sannings & Stietzel (1993).

Mais recentemente foi promulgada uma nova Lei de Proteção do Solo onde os padrões ABC foram revisados. Baseando-se em dados analíticos de teores naturais em solos, relações empíricas foram desenvolvidas para se estabelecer concentrações de metais pesados em solos não poluídos como sendo uma função do conteúdo de argila e matéria orgânica no solo. A lista provisória foi discutida e criticada com um comitê de especialistas e a lista revisada de padrões de referências foi preparada. Estes valores estão sendo usados para designar áreas contaminadas por resíduos perigosos e restringir licenças de uso, exigindo formas de intervenção ou remediação. A Tabela 6 descreve as concentrações permitidas de metais em solos, levando-se em consideração as porcentagens de argila e matéria orgânica.

Tabela 6. Concentrações Permitidas de Metais em Solos considerando Porcentagens de Argila e Matéria Orgânica do Solo.

Metal	Fórmula	Padrão de Referência (H = 10% L = 25%)* mg/Kg (matéria seca)
Arsênio	$[15+0,4(L+H)]$	29,0
Cádmio	$[0,4+0,007(L+3H)]$	0,8
Cromo	$[50+2L]$	100,0
Cobre	$[15+0,6(L+H)]$	36,0
Chumbo	$[50+L+H]$	85,0
Mercúrio	$[0,2+0,0017(2L+H)]$	0,3
Zinco	$[50+1,5(2L+H)]$	140,0

*H = % em peso de matéria orgânica, L = % em peso da fração argila do solo.

Para compostos que não ocorrem naturalmente em solos, como os orgânicos aromáticos e clorados, os padrões de referências foram definidos como o limite de detecção do método analítico utilizado. Os valores B foram omitidos e os valores C são definidos através de um modelo matemático denominado C-Soil.

O C-Soil leva em consideração a natureza físico-química do poluente, assim como características ecotoxicológicas e toxicológicas. O aumento na ênfase dos aspectos ecotoxicológicos tem significado que os valores devem ser mais restritivos para certas substâncias como fenóis e clorobenzeno. Do mesmo modo, valores C são mais restritivos quando a toxicologia humana é o fator de influência, como por exemplo, benzeno e tetrahydrofurano. Na Tabela 7 estão descritos os padrões de referência (A) e os de remediação atual (C-atual) e (C-proposto) para metais em solos.

Tabela 7. Níveis de metais em Solo. Padrões de Referência (A) e remediação (C Atual e C Proposto)

Metal	Concentração matéria seca (mg/kg)		
	A (referência)	C atual	C proposto
Arsênio	20	50	55
Bário	200	2000	625
Cádmio	1	20	12
Cromo	100	800	380
Cobre	50	500	190
Chumbo	50	600	530
Mercúrio	0,2	10	10
Prata	2	40	
Cobalto	20	300	
Molibidênio	10	200	200
Níquel	35	500	210
Zinco	200	3000	720

Alemanha

Desde 1980, foram instaladas agências de monitoramento em locais provavelmente contaminados e com isso foram geradas sugestões para medidas de avaliação de contaminação para todos os Estados da Alemanha. Isso resultou na necessidade de um quadro sinóptico dos critérios para serem ajustados, eliminando as diferenças entre as regiões em busca de uma legislação unificada para o país.

Levou-se em consideração se a amostra de solo de um local potencialmente contaminado tinha efeito na saúde humana, como nos casos de parques infantis, principalmente por ingestão e inalação (de solo) ou transferência através de plantas contaminadas (alimentos). Desta forma, foram

definidos os seguintes cenários: Parques Infantis, Áreas de Moradia e Jardinagem, Áreas Livres, Indústria e Comércio.

A área de parque infantil é considerada a mais sensível e os valores são mais baixos do que as outras classes de utilização do solo. O que é avaliado é a ingestão de solo por crianças e que nestes casos a contaminação por inalação é desprezível. Levou-se também em consideração o tempo de exposição. O risco de contaminação por contato diminui nas áreas de moradia, e mais ainda em parques públicos. Os valores para parques de lazer são 2 vezes maiores do que os valores para moradia.

As áreas industriais e comerciais são menos sensíveis por não serem freqüentadas por crianças, ser geralmente cercado, coberta por grama ou concretada e de pouca utilização, a não ser para jardinagem.

Em áreas de moradia ou jardinagem, quando os níveis de metais ultrapassam os estabelecidos, são exigidas mais análises do solo e de crescimento vegetal considerado-se os teores dos metais nos alimentos e mudanças de crescimento das plantas. A Tabela 8 mostra os níveis de metais em diferentes cenários.

Tabela 8. Níveis de Metais em Solos em Diferentes Cenários

Cenários	Parques Infantis	Moradia e Jardinagem	Parques e Áreas Livres	Indústria e Comércio
Metais	mg/Kg			
Arsênio	20	40	100	200
Chumbo	200	400	1000	2000
Cádmio	6	12	30	60
Cobre	300	600	1500	3000
Níquel	60	120	300	600
Mercúrio	40	80	200	400
Selênio	40	80	200	400
Tálio	0,5	1	2,5	5

Fonte: Scannings & Stietzel (1993).

Em 1991, foram publicadas as diferentes “Listas de Berlim”. Estas listas apresentam diferentes níveis de poluentes em solos e águas subterrâneas, constituindo-se de duas partes. A primeira parte, apresenta padrões de remediação em quatro áreas: área de proteção de água subterrânea, área de uso agrícola do solo, área de vale e área de topografia elevada. A segunda parte define os níveis dos contaminantes para a reutilização do solo remediado, bem como os valores para a reinfiltração da água subterrânea descontaminada.

Atualmente existe uma cooperação bilateral entre o BMFT (Ministério Federal de Pesquisa e Tecnologia da Alemanha) e a FPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos). O objetivo desta cooperação é o desenvolvimento de tecnologias de remediação de local contaminado com resíduos perigosos, bem como desenvolver procedimentos e critérios para priorização de remediação de áreas potencialmente contaminadas, utilizando-se métodos de avaliação de risco caso a caso.

2. Situação e Alternativas do Estado de São Paulo

A CETESB, de acordo com a legislação (Decretos 8468/76 e 32955/91), deve controlar e prevenir a poluição dos solos e águas subterrâneas.

De acordo com levantamento preliminar efetuado pela CETESB (Alves, 1996), existem na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), 2300 áreas industriais potencialmente contaminadas e 116 lixões onde foram inadequadamente dispostos resíduos sólidos domésticos e industriais.

Deste total, 800 são indústrias desativadas, localizada em zona urbana em contato direto com áreas residenciais, sendo que algumas estão situadas dentro de áreas de proteção de mananciais como Guarapiranga e região do

ABC. Com base em padrões internacionais, foi avaliado que já estão contaminadas 150 áreas, sendo 45 postos de gasolina, 67 lixões e 38 áreas industriais.

Após o levantamento das áreas potencialmente contaminadas, é necessário uma avaliação do solo e da água subterrânea para, comparando-se com padrões de qualidade, comprovar-se esta contaminação. Em casos específicos, poderá ser efetuado uma qualidade, comprovar-se esta contaminação. Em casos específicos, poderá ser efetuado uma análise de risco para se definir a urgência e o grau de intervenção ou remediação necessário.

Considerando as características específicas dos nossos solos, assim como das águas subterrâneas, a CETESB está desenvolvendo um projeto para definir padrões próprios de qualidade e remediação de solos e águas subterrâneas.

Após um levantamento da experiência internacional desta questão, optou-se pela adoção de uma abordagem combinada, que tem como meta a definição de um critério numérico genérico de padrões de qualidade de solos e águas subterrâneas e para áreas contaminadas específicas uma avaliação de risco, caso a caso.

Critério Numérico Genérico, Padrões de Referência e Remediação (RAI)

O estabelecimento dos padrões de qualidade de solos e águas subterrâneas (RAI) estão sendo desenvolvidos com o objetivo de definir-se os valores de Referência (R), Alerta (A) e Intervenção (I).

Para definir-se os padrões de referência de qualidade serão considerados dois grupos de poluentes, os compostos naturalmente presentes no

solo (metais) e os compostos naturalmente ausentes (compostos industrializados orgânicos).

A definição do padrão de referência para os metais, considera a porcentagem e tipo de argila (caolinita, ilita, montmorilonita etc.), porcentagem de matéria orgânica, capacidade de troca de cátions (CTC) e o teor de óxidos e hidróxidos de ferro e manganês. Os principais tipos de solos serão analisados para estes parâmetros e para os teores dos metais poluentes (Ag, Al, As, B, Ba, Cd, Cr, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Sb, Se, V, Zn). Esses resultados serão analisados em uma análise de regressão, definindo-se os padrões de referência (R) de qualidade para cada metal.

Para os compostos orgânicos, o padrão de referência de qualidade será definido como o limite de detecção do método analítico utilizado.

A definição dos padrões de intervenção (I) utiliza o modelo matemático C-Soil. Este é um modelo de exposição humana que foi desenvolvido pelo RIVM (Instituto Nacional de Saúde Pública e Proteção Ambiental da Holanda). As vias de exposição consideradas são: solo contaminado, água subterrânea e superficial, ar, peixe, carne, leite e vegetais. O modelo está baseado nas propriedades físicas, químicas e toxicológicas dos poluentes e o coeficiente de distribuição entre as várias vias de exposição.

Após a quantificação das vias de exposição, estas são comparadas ao modelo, com o valor de Ingestão Diária Tolerável (TDI) do contaminante em questão, o que representa a avaliação de risco potencial para seres humanos. Baseado nesta comparação, o modelo deriva o padrão de Intervenção (I), que é a concentração do poluente no solo ou na água subterrânea, acima do valor TDI.

Estes padrões serão definidos para cada tipo de solo em questão, sendo que o modelo considera como parâmetros de entrada a porcentagem de argila, matéria orgânica, etc., bem como os diferentes cenários, definidos como: agricultura, residências, industrial/comercial e área de proteção ambiental (área de proteção de manancial e de recarga de aquífero).

Após a definição dos padrões de solos e águas subterrâneas, poderá ser estabelecido uma legislação específica para a remediação de áreas contaminadas, equilibrando-se os interesses sociais, econômicos e ambientais. Diante desta realidade, a alternativa mais adequada seria a prevenção da contaminação do solo e das águas subterrâneas. Isto justifica a importância da definição de solo “limpo” e água subterrânea potável. Este é o instrumento de controle e prevenção da poluição, como também de avaliação de possíveis contaminações.

3. Conclusões

Tem havido muitas discussões a respeito dos métodos apropriados para avaliação da contaminação e para estabelecer procedimentos de intervenção e remediação para locais contaminados com resíduos perigosos. O controle e prevenção da poluição do solo e das águas subterrâneas, atualmente considera além dos padrões de referência e remediação, também os efeitos adversos que o poluente causa nas funções do solo, na Saúde Pública e Ambiental.

Até 1995, pode-se considerar que existiam duas abordagens. A abordagem Holandesa, critério numérico de padrões em contraposição com a abordagem Americana, levantamento de risco caso a caso. Atualmente uma

nova abordagem tem sido adotada, onde o critério numérico de padrões é utilizado nos primeiros estágios de uma avaliação de contaminação, para a identificação e cadastro dos locais contaminados, seguida de uma análise de risco para se definir uma priorização de intervenção e/ou remediação. Somente áreas contaminadas de grande extensão é viável economicamente uma análise de risco, enquanto áreas menores a remediação até padrões de referência para o solo e a água subterrânea são mais viáveis.

Os padrões de remediação podem estar associados ou não ao uso do solo e da água subterrânea. Os países que possuem políticas estabelecidas de proteção de solo exigem a remediação até a função original do solo (multifuncionalidade) e aos padrões de potabilidade de águas subterrâneas.

O Estado de São Paulo por apresentar maior nível de desenvolvimento sócio-econômico, encontra-se em algumas áreas, condições inadequadas em relação a qualidade do solo e das águas subterrâneas, necessitando de forma eficiente definir políticas públicas de incentivo ao desenvolvimento de pesquisa e estabelecimento de legislações, procedimentos, critérios e padrões, para efetivamente controlar e prevenir a poluição dos solos e águas subterrâneas e onde diagnosticado uma contaminação, exigir sua remediação.

4. Referências bibliográficas

ALVES, F. Poluição Industrial. São Paulo tem mais de 2000 áreas potencialmente contaminadas. *Revista de Sanidade Ambiental*, v.37, p.12-13. 1996.

COUNCIL OF EUROPE. Feasibility study on possible national and/or European actions in the field of soil protection: report presented by Belgian DELEGATION. IN: EUROPEAN MINISTERIAL CONFERENCE ON THE ENVIRONMENT, 6., 1990, Strasbourg. *Proceedings*. Strasbourg, 1990.

SANNING, D.; STIETZEL, H. United States/German bilateral agreement on hazardous waste site cleanup project. In: *Contaminated soil* '93. Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1993. p.11-25.

USEPA. Technical background document for soil screening guidance. Washington, DC: EPA, 1994. (EPA 540/r-94/106).

VISSER, W.J.F. *Contaminated land policies in some industrialized countries*. The Hague: Technical Soil Protection Committee, 1994.

MICROORGANISMS FOR DETECTION OF GENOTOXIC AGENTS

Tânia Maria Araujo Domingues Zuchi, Lúdia Teresa de Abreu Pires - Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo.

DNA repair, replication and recombination processes share several enzymatic common pathways. Among them, mitotic crossing-over deserves special attention since it participates of several important biological events. Several physical and chemical agents that promote DNA damage, also induce high rates of mitotic recombination. Very likely this is the only efficient mechanism for cell recovering, after DNA double-strand breaks.

Non repairable lesions can induce the homozygotization of heterozygous markers in diploid cells and the expression of the recessive alleles. This biological consequence, originated from mitotic recombination, has been related to carcinogenesis in higher eukaryotic cells.

In order to detect the recombinogenic effect, a special test using diploids of *Aspergillus nidulans* has been settled. This test is based on the "Homozygotization Index (I)" determination which is an indirect way to evaluate the rates of mitotic crossing-over.

The aim of our actual work is the determination of the recombinogenic (and carcinogenic) potential of some products and byproducts resulting from chemical industries such as a) volatile organic compounds present in the air, b) those inorganic and contaminant elements in food, soil and in several pharmaceutical products. Environmental factors such as temperature, osmotic stress, X-Rays, UV, etc., are also among our goals since they are suspected of promoting teratogenic, carcinogenic and/or mutagenic effects.

Support by FAPESP and CNPq.

BIOREMEDIATION OF CONTAMINATED ENVIRONMENTAL SITES

Jean-Marc Bollag, Laboratory of Soil Biochemistry, Center for Bioremediation and Detoxification, The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802

Although "bioremediation" is a relatively new term, it describes a phenomenon that has existed since the beginning of life. A wide variety of naturally occurring toxic and recalcitrant organic compounds exist on earth and nature has evolved ways of mineralizing them. The formation of organic matter begins with plants capable of harvesting the energy of sunlight. This organic matter serves as an important energy source for entire food chains. In a terrestrial ecosystem, the wastes produced by this food chain end up in the soil.

Soil organic matter is recycled by a diverse array of soil organisms including: bacteria, fungi, actinomycetes, protozoa, earthworms, and insects. Microorganisms are ultimately responsible for mineralizing most organic matter to carbon dioxide. Residual organic matter that is not readily mineralized can be incorporated into humus.

The use of biological systems to bring about the timely remediation or detoxification of man-made pollutants is the goal of bioremediation. The successful implementation of soil bioremediation requires interdisciplinary cooperation among biology, chemistry, and engineering experts.

Biological treatments of man-made waste have been successfully implemented for decades. Municipal and industrial wastewaters and agricultural wastes are treated in bioreactors as activated sludges, in waste

ponds or lagoons, in fixed media reactors using trickling filters, or in fluidized bed reactors containing an active biofilm of microorganisms (Bradford & Krishnamoorthy, 1991). Bioremediation utilizes the natural role of microorganisms for transformation, mineralization or complexation by directing those capabilities toward organic and inorganic environmental pollutants.

Contaminated environments include surface and subsurface soils and surface and ground waters. Various man-made materials have been dumped at contaminated sites. As a result, many sites contain a complex mixture of contaminants, including petroleum products, organic solvents, metals, acids, bases, brines, and radionuclides. Over a very long period of time, natural degradation activities would eventually destroy some of these contaminants. New affordable technologies are needed to speed up natural remediation processes, thus reducing health risks and restoring natural balances. The repertoire of treatments currently used to remove or destroy contaminants spans physical, chemical and biological technologies. The use of bioremediation techniques, however, may have some significant advantages over other treatment methods in that cleanup costs may be reduced and site disruption may be kept to a minimum (Gabriel, 1991).

Four basic techniques may be used in bioremediation to enhance natural detoxification of contaminated environments: (a) stimulation of the activity of indigenous microorganisms by the addition of nutrients, regulation of redox conditions, optimizing pH conditions, etc.; (b) inoculation of the sites with microorganisms of specific biotransforming abilities; (c) application of immobilized enzymes; and (d) use of plants to remove, contain or transform pollutants (phytoremediation).

Microbial activity in the environment

Microorganisms are ubiquitous, inhabiting even the most hostile environments. Their ability to transform virtually all forms of organic material (natural or synthetic) makes them attractive agents of bioremediation. Microbial activity, however, has certain requirements. There are many reasons why organic pollutants may not be quickly degraded when dumped into the environment-high concentrations of pollutants, limited amounts of electron acceptors, inadequate supply of nutrients, and unfavorable environmental conditions such as moisture, temperature, pH, ionic strength or redox status.

In nature, most organic matter is aerobically mineralized, using oxygen as the electron acceptor. This degradation is usually a stepwise process involving different microorganisms in concert, or in succession, to bring about the mineralization of organic matter. The same is often true for the mineralization of xenobiotics. Slater and Lovatt, 1984 showed that mixed communities of microorganisms may be more efficient at mineralizing some pollutants, such as chlorinated aromatic hydrocarbons and alkylbenzene sulfonates, than individual species. Sometimes pollutants cannot be directly assimilated by the microbes that oxidize them (co-metabolism), but may instead be further transformed by other populations.

In contrast to the oxygen-dependent metabolism characteristic of aerated portions of soil, anaerobic environments also contain microorganisms capable of degrading pollutants. These reduced environments provide optimal conditions for denitrifying, methanogenic, or sulfate-reducing microorganisms. Although incubation times are often much longer, the ability of anaerobic microorganisms to remove chlorine from environmentally persistent chemicals,

such as PCB's (polychlorinated biphenyls), PCE (perchloroethylene) and DDT, may be particularly useful for in situ bioremediation of groundwater. Some compounds, like benzene and related compounds, can be completely mineralized to carbon dioxide or transformed to cell mass under anaerobic conditions (Stroo, 1992).

Gene and plasmid transfer enables bacteria to quickly adapt to changes in their environment by disseminating the genetic information for the synthesis of the enzymes necessary for degrading new substrates. This characteristic enables bacteria to degrade xenobiotics and is one reason these organisms have evolved to be the recyclers of our environment.

Bioremediation research has, for the most part, focused on the role of microorganisms. It has been shown, however, that plants may also play an important role in the direct and indirect removal of pollutants (Cunningham & Lee, 1995). Plants can physically remove pollutants from soil by absorbing or translocating them into plant tissue. There, metabolic processes may transform or mineralize pollutants. Plants can also concentrate organic or inorganic pollutants in harvestable portions of the plant; pollutants are then removed by removing the plants. Symbiotic relationships with mycorrhizal fungi may aid in these processes (Donnelly *et al.*, 1993). Plants can also indirectly remove pollutants by increasing the biological activity in soil through: (a) rhizosphere interactions; (b) relationships with nitrogen fixing bacteria; (c) the contribution of dead plant material (leaf litter, etc.); and (d) the provision of suitable habitat for the many other organisms that inhabit the soil.

Humification, the formation of a structureless organic polymer consisting largely of persistent organic substrates, occurs during the microbial decomposition of organic material in soil. In natural soils, humification can be

initiated by free radicals that are reactive products generated by specific microbial enzymes or inorganic catalysts (Haider *et al.*, 1975). The process of humus formation is very complex, because the reactions caused by free radicals occur randomly. It has been found that toxic pollutants can be rendered inert and, thus, be detoxified by their covalent binding to humus (Bollag, 1992). Therefore, it appears feasible to effectively detoxify pollutants on a large scale by enhancing natural humification processes or by increasing free radical reactions through the use of oxidoreductive enzymes.

Treatment technologies

Two types of bioremediation techniques utilize microbes to clean up polluted environments: extraction-treatment techniques and in situ treatments. A combined approach using both of these techniques is also possible. Extraction-treatment techniques require removing contaminated soils or groundwater and treating them in a bioreactor or via surface treatments. In situ bioremediation techniques generally involve the enhancement of indigenous microbial activity, or inoculation of cultivated microbes into the contaminated environment (Morgan & Watkinson, 1989).

Extraction-treatment techniques generally refer to the use of a containment vessel or bioreactor. With a bioreactor, engineers can create optimal conditions for the growth of microorganisms, increase contact between microorganisms and contaminants, utilize specific microbial cultures or enzymes, and manipulate acclimation time for faster biodegradation rates.

In situ bioremediation techniques generally involve enhancing the microbial activity in soil by providing the necessary nutrients, electron

acceptors, moisture, etc. The use of microbial inocula, cell free enzymes and plants are still mostly experimental.

To date, most in situ applications have been carried out by the petroleum industry to clean up hydrocarbon spills and gasoline tank leaks. However, in the last few years the possibility of cleaning up regions that had been contaminated with chlorinated hydrocarbons, nitriles, nitrobenzenes, anilines, plasticizers and others have also been investigated (King *et al.*, 1992).

Landfarming may be applied if only the upper 0.5 m of the soil profile is contaminated. In landfarming, biodegradation is enhanced by supplementing the soil with nutrients and oxygen, then tilling and irrigating to create an optimal environment for microbial activity and to increase contaminant/microorganism contact. Composting is another surface treatment that has been successfully used. Composting involves excavating surface soil, mixing the soil with fertilizer and bulking agents, and watering as necessary. Through landfarming and composting activities, contaminants can often be reduced to acceptable levels.

Sites contaminated with recalcitrant xenobiotics or environments hostile for indigenous microorganisms are potential candidates for inoculation methods. Through the use of classic enrichment techniques or gene transfer technology, large populations of bacteria may be produced, then inoculated into the contaminated media.

Introducing and dispersing inoculum into subsurface soils can be difficult, depending on soil characteristics. Microorganisms introduced to the field must compete for resources with native species; they must also elude natural hazards such as microbial toxins and predation. For this reason, inoculum treatments appear best suited for extreme conditions where

competitors and predators are virtually non-existent (Thomas & Ward, 1989), or for bioreactors where conditions can be optimized for the inoculant (Gibson & Sayler, 1992).

In recent years, there has also been much interest in the use of white rot fungi as a soil inoculum (Bumpus, 1993). In nature, these fungi are able to decompose wood. Their ability to degrade lignin, one of nature's most persistent organic polymers, led researchers to investigate their ability to mineralize other recalcitrant pollutants. Indeed, these organisms were capable of degrading a wide variety of persistent pollutants in the laboratory. Although some success was achieved with field inoculations (Lamar & Dietrich, 1992), the problem of predation and competition with the indigenous microflora existed.

Phytoremediation, the use of plants to detoxify organic or inorganic pollutants, is a promising new area of research (Cunningham & Lee, 1995). Plants may be particularly useful for in situ cleanup of soils with shallow contamination (less than two meters deep). In addition to providing a microbially active rhizosphere, plants can accumulate various pollutants in their vegetative parts, making it possible to harvest the plants and dispose of them through the use of other treatment technologies. The ability of plants to accumulate metals is well known, but the use of plants to detoxify contaminated soils is relatively new (Cunningham & Lee, 1995). The ability of plants to absorb and metabolize pollutants is a well documented phenomenon in the field of weed science.

The use of microbial enzymes has an advantage over the use of organisms, because enzymes may function under a wider range of conditions than is possible for the growth of organisms. Cell free enzymes have been used

in industry to degrade carbohydrates and proteins and have great potential for in situ treatment of environmental contaminants (Nannipieri & Bollag, 1991). Horseradish peroxidase has also been successfully used to dephenolize coal-conversion wastewaters (Klibanov, 1983). Problems encountered with the use of enzymes include the difficulty and expense of their extraction and purification, as well as their limited storage life and activity due to the instability of purified products. The stability of enzymes in the environment can be increased by immobilizing them on a solid support. The use of immobilized enzymes offers specificity and rapid reaction times. In the detoxification of wastewaters, water-soluble chemicals can be enzymatically converted to water-insoluble polymers that can then be removed via filtration or sedimentation.

Aromatic compounds containing hydroxy- or amino-groups are readily bound to soil organic matter. Non-specific oxidative reactions catalyzed by enzymes or abiotic agents generate phenoxy radicals or quinonoid structures that are highly reactive and readily form covalent bonds to humic substances. This irreversible binding of chemicals fulfills a beneficial function by detoxifying these compounds. Future studies should concentrate on attempts to enhance detoxification of xenobiotic pollutants in soil by stimulating oxidative binding processes (Bollag, 1992)

Advantages and disadvantages of bioremediation

A principal reason for the heightened interest in bioremediation is its potential for significantly reducing hazardous waste site cleanup costs. In situ bioremediation offers the added benefit of minimal site disruption, thus

minimizing public concern. Another important consideration is the relative simplicity of the technology, compared with many other on-site treatment technologies. Operational requirements may be lower than on-site incineration, solidification/stabilization, vitrification or soil washing systems, possibly resulting in fewer mechanical problems and lower costs.

Despite the potential benefits and relative simplicity of bioremediation systems, a number of pitfalls exist (Slater & Lovatt, 1984; Litchfield, 1991). The most notable problem areas and issues to consider are: (a) regulatory barriers; (b) scale-up from bench/pilot level to the field; (c) failure of clean-up administration to consider the full range of remediation options or configurations; (d) liability for failure to achieve goals; and (e) development time and costs.

Bioremediation may be very effective in achieving a high percentage reduction of contamination in soil and groundwater, yet still fail to meet stringent clean-up goals that would be more applicable to a technology like incineration. Biological systems tend to slow down as substrate levels diminish, with the microorganisms switching to an alternate energy source. In some cases, microbial degradation may cease when contaminant levels are still above the established goals. In addition, projects often run into difficulty when they move from bench-scale to pilot-scale studies, then on to full-scale operation. An understanding of site-specific and chemical-specific limiting factors is critical to successful scale-up.

Future considerations

Application of bioremediation technology to decontaminate sites is still a developing science. The mechanisms driving microbial activity and the degradation pathways of specific pollutants need to be further elucidated before successful and better controlled site-specific treatments can occur. Recent advances in biotechnology are capable of modifying organisms at the molecular level for improved degradative performance. This approach has already contributed new tools for analysis and monitoring of complex environmental processes. Other techniques, such as phytoremediation and application of immobilized cells and enzymes, represent novel approaches for controlling hazardous wastes. A multidisciplinary research approach involving scientists and engineers is needed to provide new strategies for refining available bioremediation techniques. With the cooperation of soil biologists, chemists, and engineers, it should be possible to safely, economically and efficiently reduce pollutant concentrations at contaminated sites.

References

- BOLLAG, J.M. *Environmental Science & Technology*. v.26, p.1876-1881, 1992.
- BRADFORD, M.L.; KRISHNAMOORTHY, R. *CHEM. Engineer. Progr.* 1991, 87, 80-85
- BUMPUS, J.A. In: BOLLAG, J.M.; STOTZKY, G., ed. *Soil Biochemistry*; New York: Marcel Dekker, 1993, v. 8; p. 65-100.

- CUNNINGHAM, S.D.; LEE, C.R. In: SKIPPER, H.D.; TURCO, R.F., ed. *Bioremediation - Science and Applications*. Madison: Soil Science Society of America, 1995. p.145-156. (SSSA Special Publication, 43).
- DONNELLY, P.K.; ENTRY, J.A.; CRAWFORD, D.L. *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, p.2642-2647.
- GIBSON, D.T.; SAYLER, G.S. *Scientific Foundations of Bioremediation - Current Status and Future Needs*. A report from The American Academy of Microbiology. Washington, DC, 1992.
- HAIDER, K.; MARTIN, J. P.; FILIP, Z. In: PAUL, E.A.; MACLAREN, A.D., ed. *Soil Biochemistry*. New York, 1975. v. 4; p.195-244.
- KING, R.B.; LONG, G.M.; SHELDON, J.K. *Practical Environmental Bioremediation*. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992.
- KLIBANOV, A.M.; TU, T.M.; SCOTT, K. P. *Science*, v.221, p.259-261, 1983.
- LAMAR, R. T., DIETRICH, D. M. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, p.3093-3100, 1992.
- LITCHFIELD, C.D. In: SAYLER, G.S.; FOX, R.; BLACKBURN, H.W.; ed. *Environmental Biotechnology for Waste Treatment*. New York: Plenum Press; 1991. p.147-157.
- MORGAN, P; WATKINSON, R.J. *FEMS Microbiology Reviews*, v.63, p.277-300, 1989.

NANNIPIERI, P.; BOLLAG, J.M. *Journal and Environmental Quality*, v.20, p.510-517, 1991.

SLATER, J.H.; LOVATT, D. In: GIBSON, D.T., ed. *Degradation of Organic Compounds*. New York: Marcel Dekker, 1984.

STROO, H.F. *Journal of Environmental Quality*, v.21, p.167-175, 1992.

THOMAS, J.M., WARD, C.H. *Environmental Science & Technology*, v.23, p.760-766, 1989.

BIODEGRADATION OF PETROCHEMICALS

Christine Claire Gaylarde. Departamento de Solos/UFRGS. Av. Bento Gonçalves 7712, Porto Alegre, RS, 90001-970. Fax (051) 316-6029/336-1211

The petrochemical industry is extremely diverse, manufacturing such petroleum products as fuels, varnishes and plastics. Many of these are very resistant to biodegradation and this is normally advantageous. Thus varnishes can be used to protect more readily degradable surfaces, such as wood, from attack. However, when the useful life of the article is finished, or when the materials are released accidentally into the environment, as in the case of oil spills, the recalcitrant nature of some petrochemicals can cause significant pollution problems.

Currently there is much research activity worldwide in the field of bioremediation. That is, the cleaning up of the environment using microbial activities. Perhaps the most widely publicized work is in the bioremediation of oil-polluted environments. A good example is the leakage of fuel from underground tanks, especially at fuel service stations, which has been increasing recently. It is estimated that about 7% of all buried tanks are leaking, polluting the surrounding soil to an unknown degree. The EPA considers that losses of oil from such tanks could amount to 40 million litres/year in the USA alone.

Many microorganisms are able to degrade hydrocarbons and it has been suggested that most soils (unless they are very acidic) contain the organisms required for this process. The situation in the marine environment is quite different, however, and the first patent for microorganisms with the capacity to

clean up marine oil spills was registered in the USA in 1974 by Chakrabarty. However, the controls over release of genetically engineered microorganisms into the environment have restricted the development of further processes. A more popular treatment involves bioaugmentation - the process of increasing the natural degradative activity in an environment by adding fertilizers and/or cultures of indigenous microorganisms. This approach has been successful for the clean up of a polluted beach in Israel and for the Exxon Valdez spill in Alaska. Various other methods are being researched, such as the use of immobilized microorganisms and the addition of biosurfactants. The latter offers a promising non-polluting technology which could be used in conjunction with other methods. Work on biosurfactant production has recently begun at UFRGS using microorganisms isolated from contaminated diesel storage tanks.

A second example of the use of microorganisms to increase degradation of polluting petrochemical materials is seen in the case of plastics. Some plastics, such as polyurethanes, are degraded relatively easily by microorganisms, which produce esterase enzymes capable of attacking the polymer chains. Other plastics, such as polyethylene, are much more resistant and are generally regarded as being non-biodegradable. The new generation of degradable polyethylenes contains an additive, such as starch, which is readily attacked by microorganisms and thus allows the fragmentation of the plastic. The effects of various soil microorganisms on polyethylene formulations with and without starch have been studied at UFRGS. Changes in physical properties were noted after incubation with the microorganisms in laboratory cultures and in soils augmented with the microorganisms.

INTERAÇÃO METAIS E MICRORGANISMOS

Oswaldo Garcia Júnior, Instituto de Química - UNESP - Deptº de Bioquímica. Cx. Postal 355, Araraquara - 14801-970 - SP - Brasil.

E.mail: oswaldo@arq000.uesp.ansp.br

Os microrganismos, de uma maneira geral, estão largamente distribuídos em nosso planeta, mesmo em ambientes de características extremas e presumivelmente adversas, representantes desses seres vivos são muitas vezes encontrados. Estão descritas e plenamente caracterizadas, espécies que vivem em temperaturas elevadas ou extremamente baixas, em altas concentrações salinas ou de metais, submetidas a pressões elevadas, em valores extremos de pH (ácido ou básico), etc. A “Ecologia Microbiana” estuda a interrelação entre os microrganismos, plantas e animais no meio em que vivem, não só em ambientes, digamos normais, como também naqueles extremos citados acima.

Uma característica interessante dos microrganismos em geral, é o papel que os mesmos tem exercido, e continuam exercendo, desde o aparecimento da vida no planeta, em inúmeros processos geológicos fundamentais. Em linhas gerais, a atividade metabólica desenvolvida pelos microrganismos, exercem comprovada influência no intemperismo das rochas, na formação e transformação de sedimentos do solo, na gênese e degradação de minerais e de combustíveis fósseis, etc. Ao estudo da relação dos microrganismos com os processos geoquímicos, é dado o nome de “Geomicrobiologia”, a qual se relaciona com outros assuntos, os quais de certa forma, interagem com o tema central, a Biogeoquímica (Fig. 1).

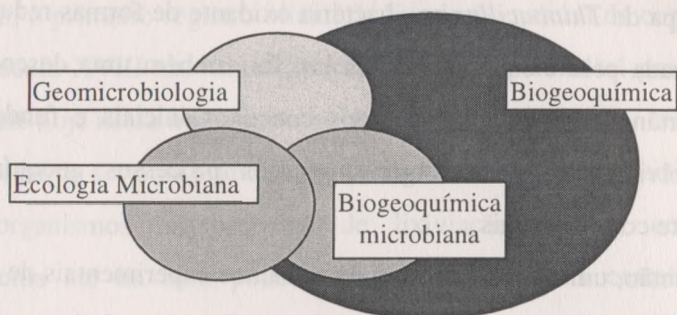


FIG. 1. Diagrama de Venn-Euler mostrando a relação entre várias áreas envolvendo microrganismos e a geoquímica.

Pode-se dizer que o estudo da associação de microrganismos e geologia (geomicrobiologia) começou no século passado com algumas descobertas marcantes que revelaram a participação de microrganismos em processos geoquímicos. A descoberta da bactéria *Gallionella ferruginea* como agente responsável por depósitos ocre de ferro em pântanos, pode ser considerada como o marco inicial dessa área da ciência.

No final do século passado o microbiologista russo S.N. Winogradsky evidenciou o modo **quimilitotrófico** de vida. Isto é, os organismos quimiolitotróficos obtêm energia para fixação de CO_2 atmosférico, através de reações de oxidação de compostos **estritamente inorgânicos**.

Nessa mesma época, o cientista Beijerinck descobria o processo bacteriano de redução do sulfato à enxofre elementar que associado ao processo de oxidação de H_2S , formaram o alicerce experimental da teoria da ativa participação de microrganismos na formação dos depósitos de enxofre na litosfera, a despeito da teoria “inorgânica da gênese dos depósitos de enxofre” ser predominante na época. Nessa mesma época o isolamento e caracterização

da primeira cepa de *Thiobacillus* sp., bactéria oxidante de formas reduzidas de enxofre, realizada pelo cientista Nathansohn, foi também uma descoberta de extrema importância na consolidação dos conceitos iniciais e fundamentais sobre o envolvimento de microrganismos nos processos geoquímicos e especificamente com os metais.

Desde então, um número enorme de trabalhos experimentais de natureza multidisciplinar envolvendo microbiologistas, geólogos, químicos, etc., vem consolidando e dando um contorno de ciência para a geomicrobiologia. Obviamente muitos processos ainda não estão completamente explicados, mas de qualquer forma outros já estão elucidados, permitindo até o desenvolvimento de tecnologias para o aproveitamento racional desses processos microbianos naturais. Neste trabalho serão discutidos de forma sucinta, dois aspectos da interação metais e microrganismos: 1) o processo de solubilização de metais de seus minerais e 2) a acumulação/transformação de metais decorrente das características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas dos microrganismos.

1. Lixiviação de metais por bactérias

Um dos processos mais significativos sobre o ponto de vista tecnológico envolvendo microrganismos e metais é a “**Lixiviação bacteriana de metais**” ou **Biohidrometalurgia**. Devido a sua importância econômica e ecológica, esse processo será discutido mais detalhadamente a seguir.

A recuperação de metais, especificamente do cobre, de efluentes naturais de minas, isto é, de soluções produzidas “naturalmente” pelo contato de águas da própria mina ou de chuvas em caso de minas de céu aberto, foi provavelmente praticada a cerca de 1000 anos A.C. na região mediterrânea.

Entretanto, o primeiro registro oficial da lixiviação natural de cobre em pilhas, data do século XVIII nas minas do rio Tinto na Espanha; tal processo é ainda aplicado até hoje nessa mina de cobre da Espanha.

Apesar de ser uma prática antiga e bastante utilizada, a participação ativa de microrganismos no processo de lixiviação natural, era totalmente desconhecida até há bem pouco tempo. A definitiva correlação entre a lixiviação natural de metais e a participação direta de bactérias no processo, foi estabelecida no final dos anos 40 com o isolamento e caracterização de bactéria *Thiobacillus ferrooxidans*. Tal designação foi atribuída, e plenamente aceita, pela característica peculiar dessa bactéria, em oxidar tanto o enxofre elementar e outras formas reduzidas deste (sulfetos metálicos, por exemplo), como também o íon ferroso (Fe^{2+}), como forma de obter energia para seu crescimento.

A lixiviação bacteriana de metais apresenta-se como uma alternativa promissora para a indústria mineiro-metalúrgica, não só para a recuperação de cobre, como também para uma série de outros metais de interesse econômico, devido a uma série de fatores, dentre os quais podem ser citados: 1) economia de insumos utilizados em um processo hidrometalúrgico convencional (ácidos e agentes oxidantes), pois a própria bactéria produz tais insumos a partir de substratos presentes no referido minério; 2) baixo requerimento de energia, se comparado a um processo pirometalúrgico, e mesmo a um processo hidrometalúrgico em que se utilizam agitadores (lixiviação ácida agitada, por exemplo); 3) baixo investimento de capital inicial e baixo custo operacional, devido à simplicidade das instalações requeridas; 4) reduzida necessidade de mão-de-obra especializada na operação; 5) não poluição atmosférica, pois não

ocorre emissão de SO_2 como no processo pirometalúrgico. Como se sabe o SO_2 é o agente causador da conhecida “chuva ácida”.

Além do aproveitamento de rejeitos minerais (minérios de teores reduzidos), a **Biohidrometalurgia** pode ser ainda uma alternativa para o aproveitamento de jazidas de pequeno porte, ou de localização adversa, isto é, muito longe de centros com infra-estrutura adequada. Atualmente a lixiviação bacteriana é aplicada em escala industrial para recuperação de cobre, urânio e, mais recentemente de ouro, em vários países, destacando-se os E.U.A., Canadá, África do Sul, Rússia, Espanha, Chile, México, Bulgária, Austrália, etc.

O processo operacional da biohidrometalurgia é conduzido de forma quase rudimentar, nos casos do cobre e do urânio, aproveitando-se a ação natural de bactérias já presentes nos minérios apropriados. Isto é, aqueles em que o metal de interesse já se apresenta em forma de sulfeto (por exemplo a calcopirita- CuFeS_2), o qual se transformará sob a ação oxidativa bacteriana, no sulfato solúvel correspondente (no exemplo, o CuSO_4). Caso o metal de interesse não se apresente nessa forma mineralógica, deve existir no minério um outro sulfeto (por exemplo a pirita- FeS_2) para ser oxidado pela bactéria, e se transformar em agentes lixiviantes (ácido sulfúrico e o íon férrico), capazes de promover a solubilização do metal não sulfetado.

Resumidamente o processo consiste na deposição de grandes quantidades de minério (milhares de toneladas) sobre uma base impermeabilizada, seguida de uma irrigação na superfície da pilha formada, com uma solução de ácido sulfúrico (pH-2.0). Essa solução, coletada após a percolação pelo minério, é reciclada constantemente pela pilha, ocasionando uma intensificação da atividade bacteriana no substrato mineral sulfetado. Dessa ação resulta uma elevação da acidez e do poder oxidante da solução, pela produção biológica de

H_2SO_4 e do íon Fe^{3+} , com a consequente solubilização do metal desejado. Após essa etapa, que se constitui na essência do processo de lixiviação bacteriana, o metal é extraído da solução por processos convencionais. Um esquema do processo pode ser visto na Fig. 2.

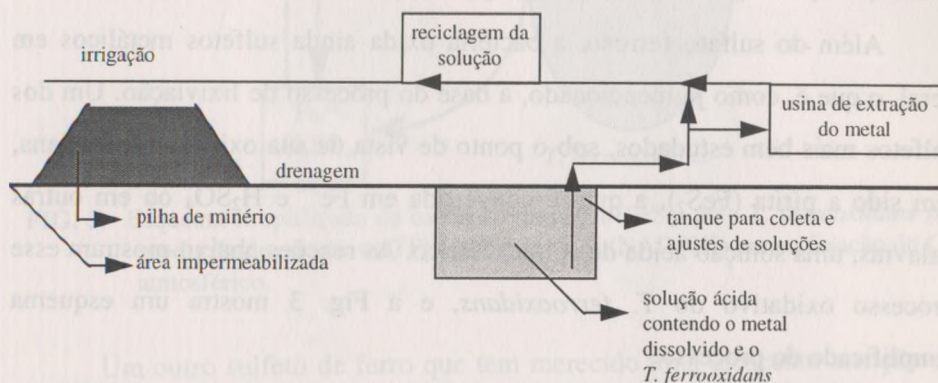
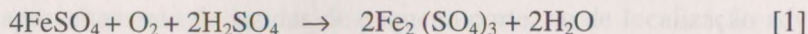


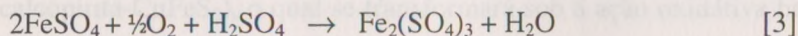
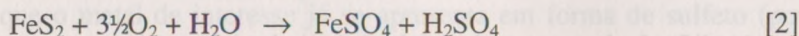
FIG. 2. Esquema simplificado do processo de lixiviação bacteriana de metais.

Existem várias características da bactéria *T. ferrooxidans* que a tornam um interessante microrganismo para estudos básicos de fisiologia, bioquímica e genética, bem como para o desenvolvimento de processos industriais em atividades hidrometalúrgicas: 1) crescimento em condições ambientais extremas, sobretudo elevada acidez e altas concentrações de metais, 2) crescimento autotrófico (fixação de CO_2 atmosférico) proporcionado pela energia liberada da oxidação de compostos estritamente inorgânicos, como o íon Fe^{2+} e formas reduzidas de enxôfre; 3) capacidade de solubilizar metais de interesse econômico, devido ao seu metabolismo oxidativo que produz eficientes agentes de lixiviação ácida de metais (íon férrico e ácido sulfúrico).

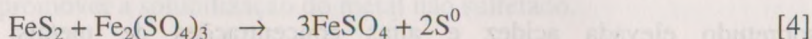
Como destacado, o princípio do processo é a capacidade que o *T. ferrooxidans* apresenta de oxidar substratos inorgânicos para obtenção de energia. O íon Fe^{2+} é uma das principais fontes energéticas da bactéria e sua oxidação ocorre segundo a equação abaixo:



Além do sulfato ferroso, a bactéria oxida ainda sulfetos metálicos em geral, o que é, como já mencionado, a base do processo de lixiviação. Um dos sulfetos mais bem estudados, sob o ponto de vista de sua oxidação bacteriana, tem sido a pirita (FeS_2), a qual é convertida em Fe^{3+} e H_2SO_4 ou em outras palavras, uma solução ácida de sulfato férrico. As reações abaixo mostram esse processo oxidativo do *T. ferrooxidans*, e a Fig. 3 mostra um esquema simplificado do processo.



O sulfato férrico produzido bacterianamente pela reação [3], tem uma ação fortemente oxidativa sobre a pirita e sulfetos metálicos em geral. Assim a pirita é também oxidada quimicamente pelo próprio sulfato férrico, segundo a equação abaixo:



O enxôfre (S^0) e o sulfato ferroso (Fe^{2+}) produzidos quimicamente pela equação [4], são novamente oxidados pelo *T. ferrooxidans* a ácido sulfúrico (H_2SO_4), e sulfato férrico (Fe^{3+}), fechando-se assim o ciclo.

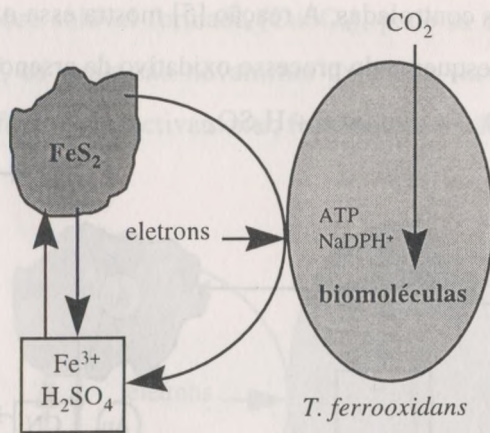


FIG. 3. Esquema simplificado da oxidação da pirita (FeS_2) pelo *T. ferrooxidans* para produção de energia (ATP) e poder redutor (NADPH^+) para a fixação do CO_2 atmosférico.

Um outro sulfeto de ferro que tem merecido uma crescente atenção dos pesquisadores é a arsenopirita, pois a associação desse mineral com o ouro é relativamente comum em minerais auríferos-piritosos. Normalmente a pirita, ou no caso a arsenopirita, ocluem o ouro, dificultando dessa forma sua recuperação por processos convencionais. A ação da bactéria oxidando o sulfeto, expõe o ouro, tornando-o acessível a um processo convencional de recuperação (por exemplo, a cianetação seguida de tratamento com carvão ativo). Essa alternativa biotecnológica para o aproveitamento industrial desse tipo de mineral, tem se mostrado muito promissora sob o ponto de vista econômico e várias unidades pilotos, ou mesmo industriais em vários países (E.U.A., Canadá, África do Sul, etc.), vem aplicando a oxidação bacteriana como um pré-tratamento do mineral para a posterior recuperação do ouro. Deve ser destacado que nesse caso o processo operacional difere profundamente dos exemplos anteriores, pois esse é conduzido em tanques agitados e, assim, em

condições muito mais controladas. A reação [5] mostra essa oxidação biológica e a Fig. 4 mostra um esquema do processo oxidativo da arsenopirita.

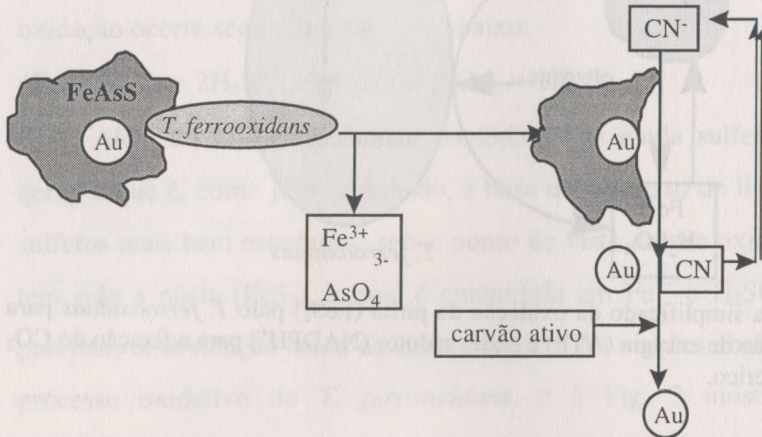
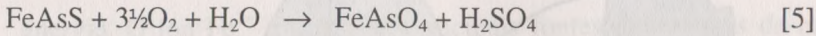
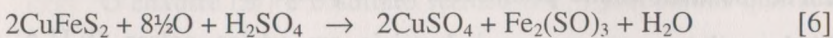


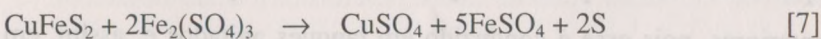
FIG. 4. Esquema da oxidação da arsenopirita pelo *T. ferrooxidans* com consequente liberação do ouro (Au) ocluído e recuperação deste por carvão ativo.

A oxidação bacteriana da calcopirita (CuFeS_2), um dos mais abundantes minerais sulfetados do cobre, tem sido largamente estudada devido a importância do processo para a recuperação do cobre de minérios sulfetados de baixos teores.

Basicamente a dissolução desse mineral ocorre, numa primeira etapa, pelo ataque bacteriano direto conforme a equação abaixo:



Da mesma forma que na oxidação da pirita, ocorre também um ataque bacteriano indireto, pois o sulfato férrico formado inicialmente, tem também atividade oxidativa sobre a própria calcopirita, solubilizando mais cobre:



Além do cobre solúvel formado (CuSO_4), pode-se observar a formação de FeSO_4 e de S^0 , os quais são novamente oxidados via biológica, à sulfato férrico e ácido sulfúrico, respectivamente, fechando-se então o ciclo.

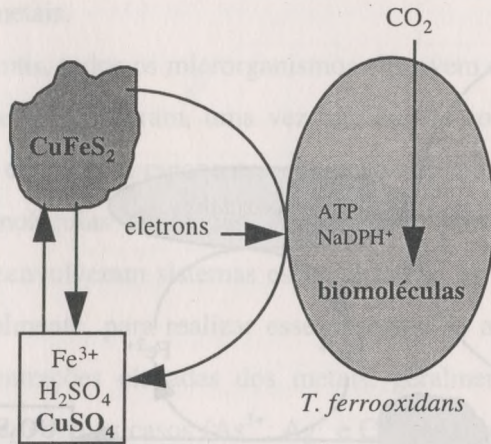


FIG. 5. Esquema simplificado da oxidação da calcopirita (CuFeS_2) pelo *T. ferrooxidans* para produção de energia (ATP) e poder redutor (NADPH^+) para a fixação do CO_2 atmosférico. Notar que o cobre solúvel é produzido na forma de CuSO_4 .

Conforme salientado anteriormente, a lixiviação bacteriana pode ocorrer de forma direta (oxidação do sulfeto do metal desejado) e/ou de forma indireta (produção de agentes lixiviantes que solubilizam o metal não sulfetado). Um exemplo do último tipo, e que na verdade se constitui num exemplo clássico e bem sucedido da própria Biohidrometalurgia, é o caso do urânio. O urânio normalmente se apresenta na natureza na forma de óxidos insolúveis (UO_2) como a uraninita ou a pitchblenda. Nesses minerais o urânio se apresenta na forma reduzida insolúvel (U^{4+}). Um passo necessário para solubilizar o urânio, é sua oxidação para U^{6+} através de íons oxidantes em soluções ácidas como por exemplo o Fe^{3+} . A participação do *T. ferrooxidans* nesse processo, é a de

promover a oxidação de um sulfeto de ferro (pirita ou pirrotita, por exemplo) lixiviação (solução ácida de sulfato férrico). A Figura 6 mostra um esquema simplificado da lixiviação do urânio promovida pelo *T. ferrooxidans*.

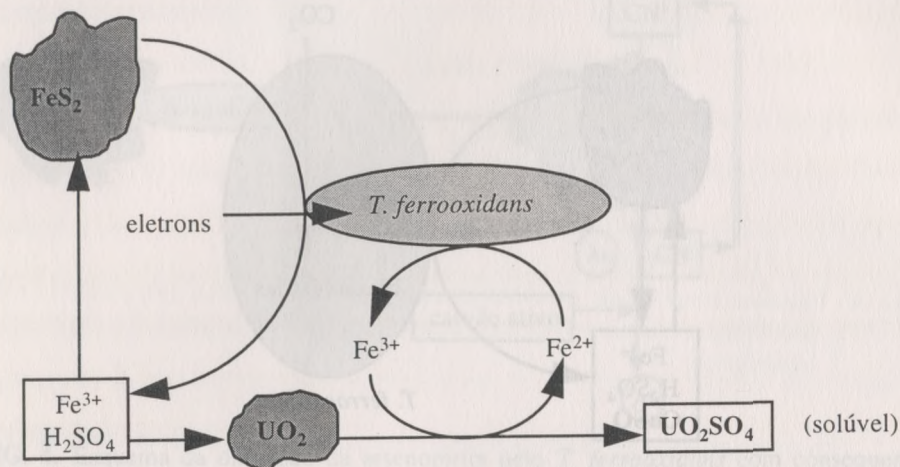


Fig 6. Esquema simplificado da oxidação da uraninita (UO_2) pelos produtos da oxidação da pirita (FeS_2) pelo *T. ferrooxidans*. O íon ferroso (Fe^{2+}) é constantemente reoxidado ao íon férrico (Fe^{3+}) pela bactéria. Notar que o urânio solúvel é produzido na forma de UO_2SO_4 .

2. Bioacumulação e biotransformação de metais

Os microrganismos em geral podem acumular ou transformar elementos metálicos, como resultado de reações enzimáticas específicas ou de mecanismos decorrentes das características e propriedades da parede celular e da membrana plasmática desses microrganismos. Obviamente, esses processos de bioacumulação ou biotransformação de metais vem ocorrendo naturalmente no ambiente desde o aparecimento desses seres no planeta. Entretanto, com o advento da sociedade industrial associada aos avanços do conhecimento

científico deste século, os problemas da poluição ambiental generalizada e, especificamente àqueles relacionados com a presença de metais pesados, determinaram a descoberta e o interesse crescente nos processos relacionando microrganismos e metais.

Em linhas gerais, todos os microrganismos absorvem e acumulam metais dos ambientes onde se proliferam, uma vez que metais como o ferro, zinco, cobre, molibdênio, etc., são componentes essenciais de um grande número de enzimas e outras moléculas biológicas. Ao longo do processo evolutivo, os microrganismos desenvolveram sistemas especializados, os quais foram sendo selecionados naturalmente, para realizar esse processo de absorção e conferir resistência às concentrações elevadas dos metais, geralmente codificada por genes plasmidiais. Em alguns casos (As^{5+} , Ag^+ e Cd^{2+}) essa resistência é devida às diferenças dos sistemas de absorção e transporte do metal tóxico; em outros (Hg^{2+} , As^{3+} e Cr^{6+}), o metal é transformado em espécies menos tóxicas ou espécies voláteis, por processos enzimáticos de oxidação, redução ou metilação. Além disso, as próprias estruturas de revestimento e proteção externa do conteúdo celular, possuem características apropriadas do ponto de vista de carga elétrica, para promover uma interação química com os cátions metálicos ou com ânions de metalóides (por exemplo, o selenato e selenito, arsenato e arsenito, telurato e telurito, etc.).

Apesar da especificidade de certos sistemas de absorção, essas características (bio)químicas da parede celular e da membrana plasmática, permitem que outros tipos de metais não essenciais e eventualmente tóxicos, sejam acumulados, ou pelo menos, transformados para formas não tóxicas por um grande número de microrganismos. Os microrganismos interagem com metais retirando-os do meio onde vivem, desempenhando dessa forma, um

importante papel nos ciclos geoquímicos desses elementos; a Figura 7 mostra um esquema simplificado desses mecanismos.

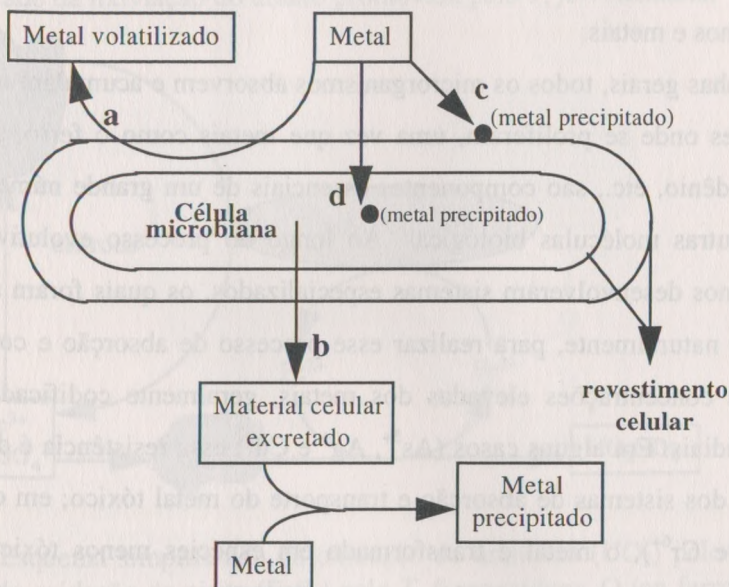


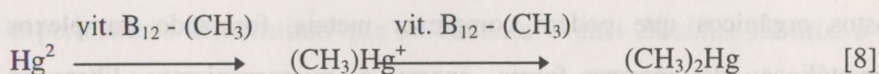
Fig 7. Representação esquemática das possíveis interações (a, b, c, d) entre metais e as células de microrganismos.

Essas interações (a, b, c, d) podem ocorrer através dos seguintes mecanismos principais:

- a. volatilização
- b. precipitação extracelular
- c. ligação à superfície celular (adsorção)
- d. bioacumulação intracelular.

a. Volatilização - a transformação de cátions metálicos tóxicos, tais como Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , etc., e metaloides tais como As, Se e Te, em suas formas metiladas

por microrganismos é bem conhecida. Um dos exemplos mais significativos desse processo microbiano é a metilação do mercúrio e sua consequente volatilização. A metilação microbiana do mercúrio em sedimentos ou soluções, pode ocorrer por um mecanismo não enzimático, através da produção e excreção de metilcobalamina (vitamina B₁₂ metilada), conforme a reação [8].



Inúmeros microrganismos realizam esse tipo de mecanismos, entre os quais podem ser citados: *Clostridium cochlearium*, *Aspergillus niger*, *Scopulariopsis brevicaule* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Entre os mecanismos enzimáticos, sem dúvida nenhuma o mais extensivamente estudado é aquele envolvendo a enzima **mercúrio redutase**, uma flavoproteína que requer como cofator na maioria dos casos estudados o NADPH; em algumas espécies tem sido demonstrado que o NADH pode ser o cofator requerido pela enzima. Essa enzima reduz o íon mercúrico (Hg^{2+}) à mercúrio elementar (Hg^0) volátil, conforme demonstrado em mais de 100 espécies bacterianas.

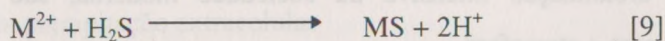
Em ambos mecanismos, compostos de mercúrio presentes naturalmente em minerais, sedimentos e efluentes aquosos, ou ainda presentes em lodos de esgoto decorrentes da urbanização intensiva da sociedade moderna, são volatilizados e liberados para a atmosfera.

Uma outra enzima envolvida na volatilização do mercúrio, embora bem menos estudada, é a **organomercúrio liase**. Compostos orgânicos de mercúrio (metilmercúrio, fenilmercúrio, etc.) são clivados na ligação Hg - C pela liase,

liberando o composto orgânico correspondente e o mercúrio, o qual é então reduzido à Hg^0 pela **mercúrio redutase**.

b. Precipitação extracelular - os metais podem ser imobilizados e acumulados em solos e sedimentos devido à sua ligação com produtos metabólicos microbianos excretados. Os microrganismos em geral produzem e excretam compostos orgânicos que podem complexar metais, formando complexos organometálicos; da mesma forma ocorre a microrganismos liberarem compostos inorgânicos, os quais poderão se associar com os metais do meio externo, imobilizando-os.

Os sulfetos metálicos e muitos compostos fosfatados de metais, são altamente insolúveis. Assim, a produção e excreção desses dois ânions (S^{2-} e PO_4^{3-}) por microrganismos, é um mecanismo de detoxificação, uma vez que os compostos insolúveis resultantes não são praticamente tóxicos. Um exemplo clássico é a deposição de sulfetos metálicos por precipitação do metal com o H_2S gerado bacterianamente. Como já destacado, as bactérias redutoras de sulfato estão largamente distribuídas em ambientes anaeróbios; esses microrganismos acoplam a oxidação de compostos orgânicos para a produção de energia com a redução do sulfato à H_2S . O sulfeto de hidrogênio liberado reage com o metal formando o sulfeto metálico correspondente, conforme a equação geral mostrada abaixo.



Além desse mecanismo ativo, a decomposição microbiana de matéria orgânica em sedimentos, também leva à formação de H_2S , e, conseqüentemente, à deposição de sulfetos metálicos.

c. Ligação à superfície celular (adsorção) - a ligação de metais à superfície celular dos microrganismos, processo chamado de **biosorção**, é um fenômeno de adsorção que acontece através de interações eletrostáticas entre o cátion metálico e a superfície carregada negativamente da célula microbiana. Dessa forma, a capacidade de “adsorver” metais vai depender diretamente das características do revestimento celular de cada espécie. Evidências experimentais demonstram que na bactéria Gram+ *Bacillus subtilis*, o agente primário de ligação com o metal são grupos COO^- do ácido glutâmico do peptidoglicano (componente da parede bacteriana). Para a espécie *Bacillus licheniformis*, essa capacidade é determinada primariamente pelo conteúdo significativo de ácidos graxos do revestimento celular, do que pela fração peptidoglicano.

Deve ser mencionado ainda, que a quantidade de metal ligado à superfície celular é muito maior que aquela prevista pela estequiometria de ligação com os sítios reativos da superfície. Tal constatação pode ser explicada por dois mecanismos básicos, baseando-se em estudos de microscopia eletrônica. Num primeiro estágio, somente a quantidade estequiométrica do metal liga-se aos sítios ativos da superfície celular; após deposição de mais íons metálicos, determinando dessa forma, o aparecimento de agregados de metais chamados “cristaloides”.

Esses princípios demonstrados em espécies bacterianas Gram⁺, são válidos também para as Gram- e para outros tipos de microrganismos como algas, fungos, etc.. Foi demonstrado, por exemplo, que células de leveduras acumulam uma massa de mercúrio equivalente ao seu próprio peso; em outro estudo, constatou-se que as espécies *Pseudomonas aeruginosa* e *Saccharomyces cerevisiae* acumulam urânio equivalente a cerca de 10 a 15% de

seus pesos secos. Um outro exemplo interessante de adsorção microbiana de metais é a generalizada capacidade de adsorver metais pela alga *Hormidium fluitans*, essa espécie, encontrada em efluentes de minas de cobre, acumula de forma intensa metais como Cu, Al, Ag, Fe, Mo, Ti e V.

Um exemplo marcante que a adsorção é um processo passivo decorrente das características do revestimento celular microbiano, foi obtido com a espécie *Streptomyces longwoodensis*, células liofilizadas do microrganismo acumularam cerca de 0,45g de urânio/g de matéria seca em apenas 30 a 40 segundos de exposição ao metal.

A partir dos exemplos citados acima e de muitos outros encontrados na literatura pode-se afirmar que potencialmente qualquer microrganismo possui uma afinidade por cátions metálicos; assim a utilização de biomassa microbiana como um processo de remoção de metais de efluentes vai depender da identificação daqueles que apresentam a mais alta taxa de remoção e maior nível de especificidade.

d. Bioacumulação intracelular - a bioacumulação intracelular de metais, pode ser entendida como uma segunda fase do processo de **absorção** dos metais por microrganismos vivos, decorrendo dessa forma de um mecanismo celular ativo, que ocorre numa primeira fase, com gasto de energia (ATP); assim, esse processo difere na sua essência da **adsorção** físico-química passiva discutida no item anterior.

A bioacumulação de metais na célula requer geralmente, sistemas específicos de transporte e vai depender do grau de tolerância da célula ao metal. Tem sido demonstrado que cátions metálicos atingem o interior celular através do sistema de transporte de micronutrientes, os quais são essenciais ao metabolismo microbiano. Deve-se diferenciar entretanto, os micronutrientes

necessários metabolicamente e aqueles não essenciais. Entre os primeiros, podem ser citados K, Fe, Mg, e em menor quantidade Cu, interior celular pelos sistemas de transporte dos micronutrientes essenciais. Está demonstrado por exemplo, que a acumulação por bactérias de Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} e Zn^{2+} ocorre pelo sistema de transporte do Mg^{2+} e que a acumulação de Rb^{+} ocorre pelo sistema de transporte do K^{+} . Deve ser destacado porém, que a bioacumulação intracelular de metais é em geral, muito menor que atingida na **biosorção**, no caso da bioacumulação o nível do metal acumulado situa-se numa faixa de 0,5 a 2,0% do peso seco celular.

Está também documentado na literatura, exemplos de bioacumulação de metais por outras vias diferentes dos conhecidos sistemas de transporte. Por exemplo, a acumulação intracelular de urânio por *Pseudomonas aeruginosa*, parece independer de sistemas de transporte regulados metabolicamente. Nesse sentido, uma proteína de baixo peso molecular (~ 6.000) e de alto conteúdo de cisteína (30 a 35%) chamada metaloteioneína parece desempenhar papel fundamental na absorção de metais pelos microrganismos; sua presença e função em vertebrados, invertebrados e em microrganismos procarióticos e eucarióticos tem sido bem estudada.

Além da bioacumulação de metais em suas formas catiônicas, exemplos de absorção de formas aniônicas também tem sido mostrados; em *Neurospora crassa*, a acumulação intracelular de CrO_4^{2-} parece ocorrer pelo sistema de transporte de SO_4^{2-} .

Dos exemplos e discussões acima apresentadas, fica evidente a capacidade que os microrganismos apresentam para a imobilização de metais. Essa capacidade é conferida por processos ativos ou processos passivos, através

da excreção de produtos metabólicos ou ainda pela própria matéria orgânica morta.

Essas características microbianas de adsorver, acumular ou precipitar extracelularmente os metais, confere aos microrganismos em geral o potencial para o desenvolvimento de processos de tratamento biológico de efluentes industriais, esgotos domésticos e águas poluídas em geral, nas quais se detecta a presença de metais em suas forma tóxicas.

O tratamento de esgotos municipais pelo conhecido sistema de “lodo ativado” (uma mistura de microrganismos), tem demonstrado que além de sua eficiência na mineralização de matéria orgânica e na clarificação dos efluentes a serem despejados nos rios, também se mostra muito eficiente na imobilização de metais pesados. Com base nesses conhecimentos, processos específicos para remoção de metais de efluentes de descontaminação do efluente a ser lançado no ambiente e de outro, a própria recuperação desses metais.

Referências bibliográficas

- EHRLICH, H.L. *Geomicrobiology*. New York: Marcel Dekker, 1981. 392p.
- HUTCHINS, S.R.; DAVIDSON, M.S.; BRIERLEY, J.A.; BRIERLEY, C.L. Microorganisms in reclamation of metals. *Annual Review of Microbiology*, v.40, p.311-336, 1986.
- ROSSI, G. *Biohydrometallurgy*. Hamburg: McGraw-Hill, 1990. 609p.

ZEHNDER, A.J.B.; ZINDER, S.H. The sulfur cycle. In: HUTZINGER, O., ed. *The handbook of environmental chemistry*. New York: (Springer-Verlag, 1980. v.1, part A, p.106-145.

ELIMINACIÓN BIOLÓGICA DEL FÓSFORO: TECNOLOGIA DE BAJO COSTO Y GRAN EFECTIVIDAD. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS DE LA PRIMERA PLANTA ARGENTINA CON ELIMINACIÓN INTEGRAL BIOLÓGICA

Prof. Dr. Miguel Angel Rubio, Departamento de Ciência y Tecnología,
Universidad Nacional de Quilmes, Biotec de Hamburgo, Alemania

La paulatina alteración de equilibrios ecológicos en los cuerpos de agua de nuestro planeta tiene su origen en la descarga indiscriminada y continúa de eutroficantes como el nitrógeno y fósforo. Ambos son importantes componentes de aguas cloacales y de cierto tipo de líquidos residuales industriales, como los provenientes de los frigoríficos, lecherías, centro de crianzas de cerdos, etc. Las concentraciones en estos efluentes pasa, en la mayoría de los casos, los 5mg P/l. Dependiendo de las legislaciones vigentes y la disponibilidad de medios, la eliminación del fósforo de las aguas residuales se apoya en tecnologías físico-químicas y o biológicas. Ambas alternativas de eliminación exigen la construcción de plantas o pasos de tratamiento adecuados y de elementos accesorios que permitan la operación y ajuste de los procesos.

La aparente sencillez en el manejo y la proporcionalidad en la utilización de reactivos hizo que muchos responsables de la planificación de plantas se decidieran por la vía química de la eliminación del P. En realidad, aunque efectiva, esta vía de reducción de la concentración de fósforo utilizada presenta algunas importantes desventajas a considerar. En primer lugar, los costos operacionales con esta metodología resultan mayores que con la vía biológica

de eliminación del P. En concreto, los costos se ven aumentados por la necesidad de personal que se ocupe de la administración, almacenamiento, manipulación y dosificación de los reactivos. Adicionalmente, desde el punto de vista operativo la dosificación adecuada del reactivo utilizado exige seguimientos y mediciones repetidas de la concentración de P. Por otra parte, las municipalidades o comunidades que operen plantas de tratamiento que se encuentren alejadas de los centros de producción tienen que incurrir en costos elevados de almacenamiento y transporte. Además, la sobredosificación por descuido puede desencadenar reacciones y desajustes en el acuífero receptor. El problema económico-operacional se ve mucho más agravado en países en los que se deben importar estos reactivos. Por último, la adición de sales precipitantes aumenta el volumen de lodos que se generan durante el proceso de depuración de aguas en un 30% como mínimo, lo que conlleva una mayor inversión operacional para espesar, deshidratar y disponer de esos lodos.

La vía biológica, en cambio, requiere la presencia de bacterias especializadas, las que, en determinadas condiciones llegan a fijar al P ingerido en forma de polifosfatos o granos de Volutina en el interior celular. Operacionalmente, la acumulación de los microorganismos y, por consiguiente, la eliminación de P se consigue alternando zonas anaerobias con aerobias, o tiempos de anaerobicidad o aerobicidad. Mediante esta compaginación de procesos se “fuerza” una suerte de *luxury uptake biológico*, o exceso de ingestión de P por parte de las bacterias. El resultado es ventajoso desde el punto de vista económico y operacional ya que esta forma de tratamiento elimina el costo y los pasos operacionales de dosificación de aditivos requeridos durante la precipitación físico-química. Durante mi exposición presentaré los mecanismos de bioeliminación de P y los resultados obtenidos

durante la operación de la primera y en la Argentina, hasta el momento, única planta de tratamiento de líquidos cloacales con eliminación biológica de componentes orgánicos, nitrógeno y fósforo.

IMPORTÂNCIA DO USO DE MÉTODOS PADRONIZADOS NOS ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO DE PESTICIDAS: UMA EXPERIÊNCIA EM CONDIÇÕES BRASILEIRAS

Mara Mercedes de Andréa, Instituto Biológico, Centro de Radioisótopos,
Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, 04014-002 São Paulo, SP

Há uma preocupação mundial crescente a respeito do destino no ambiente de pesticidas usados na agropecuária porque preconiza-se atualmente o desenvolvimento sustentável, isto é, que leve em conta não só a produção agrícola, como também a manutenção das boas condições do ambiente.

Esta preocupação levou autoridades nacionais de muitos países a adotar normas padronizadas de estudos sobre o comportamento dessas substâncias, que fornecem parâmetros relativos, comparáveis entre diferentes localidades. As normas tentam harmonizar os vários requerimentos de vários protocolos de diferentes países, de forma que se possa fazer comparações.

Taxas de degradação de substâncias químicas na principal reserva agricultável, que é o solo, são parâmetros primários para qualquer avaliação de perigo potencial. As taxas de degradação dependem das interações entre as substâncias químicas, o solo e o clima. Assim, os efeitos do tipo de solo, seu conteúdo de umidade e a temperatura influenciam na cinética de degradação dos compostos. Então, para se obter dados intercomparáveis, as condições experimentais precisam ser padronizadas em termos de solos e condições de incubação dos testes, para que se obtenha uma base de dados.

No Brasil, os testes escolhidos como básicos para se obter uma primeira resposta do comportamento de pesticidas foram os testes de biodegradabilidade, de adsorção/dessorção e de mobilidade em, pelo menos, três diferentes tipos de solos (Brasil, 1988).

O teste de biodegradabilidade baseia-se na taxa de mineralização, ou degradação total da molécula, até CO_2 (Bartha & Pramer, 1965). O método envolve a aplicação da substância-teste radiomarcada com ^{14}C . Assim, amostras de solos contidas em frascos biométricos são tratadas com o ^{14}C -pesticida-teste e a liberação de $^{14}\text{CO}_2$ é monitorada em diferentes intervalos de tempo até 64 dias, através de sua absorção em álcali que é analisado quantitativamente por espectrometria de cintilação em líquido. A radioatividade do $^{14}\text{CO}_2$ é calculada como porcentagem da radioatividade total aplicada, e colocada em gráfico versus tempo de incubação. Se aos 64 dias não tiver ocorrido 50% de mineralização do composto-teste, prolonga-se o teste por mais 6 meses, durante os quais amostras de solos tratados são extraídas para determinação de resíduos extraíveis e não-extraíveis ou ligados aos solos, e calcula-se a meia-vida do composto em função do radiocarbono aplicado.

O teste de adsorção/dessorção fundamenta-se no comportamento adsorativo dos compostos pelas partículas do solo, sendo dos principais processos que influenciam o comportamento de pesticidas neste ambiente, pois fornece informações relativas aos processos de transporte e de biodisponibilidade das substâncias (Luchini, 1987). O método baseia-se no decréscimo da concentração de pesticidas na solução do solo após equilíbrio da solução aquosa do composto com o solo. Também utiliza solução de pesticida radiomarcado em cinco diferentes concentrações da substância-teste para cada tipo de solo. Após atingido o tempo de equilíbrio, alíquotas da solução

sobrenadante são retiradas e a concentração é quantificada por espectrometria de cintilação em líquido. A determinação da quantidade de pesticida adsorvido é obtida pela diferença entre a concentração adicionada e a concentração final. Através destas quantidades, nas diferentes concentrações, obtêm-se as isotermas de Freundlich que fornecem os valores dos coeficientes de adsorção.

O teste de mobilidade prevê os potenciais processos de lixiviação e transporte de pesticidas através do perfil do solo. O método adota a técnica de cromatografia em camada delgada, onde a fase estacionária é o solo (Helling, 1971). Alíquotas de solução de pesticidas também radiomarcados são aplicadas sobre as cromatoplasas de solo e as placas são desenvolvidas com água como solvente. Após secagem, efetua-se autorradiografia das placas, através de exposição a filmes de raio-X por, pelo menos, 10 dias. O filme é revelado e calcula-se o R_f (relação de frentes) do pesticida-teste nos diferentes solos.

Os resultados dos três tipos de testes fornecem parâmetros quanto ao comportamento potencial das substâncias em diferentes tipos de solos. Por exemplo, um mesmo composto pode ser biodegradado rapidamente, pouco adsorvido e mover-se em grande quantidade. Este composto, por ser pouco adsorvido, estaria disponível na solução do solo para a ação como pesticida. Por outro lado, por ser rapidamente biodegradado, embora disponível, sua ação seria por tempo curto. Ademais, também poderia lixiviar rapidamente pelo perfil do solo, podendo contaminar outros segmentos do ambiente, distantes do local de aplicação. Desta forma, os resultados dos testes devem ser avaliados caso a caso, tendo-se em vista a utilização de diferentes tipos de solos.

Referências bibliográficas

- 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. Ministério da Habitação, Urbanismo e Meio Ambiente. *Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos*. Brasília: MHU/SEMA, 1988. 351p.
- HELLING, C. Pesticide mobility in soils. *Soil Science Society of America Proceedings*, v.35, n.5, p.732-748, 1971.
- LUCHINI, L.C. Adsorção-dessorção dos herbicidas paraquat, diuron e 2,4-D em seis solos brasileiros. Piracicaba: ESALQ/USP, 1987. 91p. Dissertação, Mestrado.

COMPORTAMENTO DOS HERBICIDAS NO MEIO AMBIENTE

Arquimedes Lavoretti, Departamento de Química - ESALQ/USP -
13418-900 - Piracicaba, SP

Introdução

Estuda-se o comportamento dos herbicidas no meio ambiente para atingir pelo menos dois objetivos principais: primeiro, procura-se descobrir todos os fatores do meio ambiente, além do próprio herbicida, que direta ou indiretamente afetam a eficiência no controle de uma planta invasora; segundo, uma vez que o herbicida está no ambiente, procura-se descobrir as interações do herbicida com os componentes do ambiente, de tal modo a minimizar os efeitos maléficos que a sua presença possa causar ao ambiente.

Em vista do exposto, o herbicida ideal seria aquele que efetuasse o controle da planta invasora com a melhor eficiência possível, finalidade inicial pelo qual ele foi sintetizado, e logo após se autodestruísse sem deixar vestígios e sem ocasionar nenhum dano ao meio ambiente, cumprindo assim também o segundo objetivo.

Definir comportamento de moléculas orgânicas no ambiente, como os herbicidas, é um desafio muito grande, porque as moléculas de herbicidas são entidades químicas bem definidas e puras quanto ao princípio ativo e, o ambiente é heterogêneo e complexo quanto a sua própria natureza, o que torna difícil prever o que pode ocorrer da interação entre ambos.

No entanto, define-se comportamento de herbicidas como sendo a maneira ou jeito da molécula se comportar ou agir em um determinado ambiente, segundo as propriedades físico-químicas da molécula e do ambiente juntamente com a influência climática durante as interações.

Por outro lado, destino é o resultado final a que é dado a uma molécula, após sua entrada e atuação no ambiente mediante os processos de retenção, transformação, e transporte, e a interação íntima entre os mesmos.

Hoje em dia, o estudo do comportamento de herbicidas no meio ambiente tem sido realizado através de estimativas das tendências a que os mesmos estão sujeitos em função dos três processos principais: retenção, transformação e transporte.

A Fig. 1 retrata o que está envolvido no estudo do comportamento de um herbicida no meio ambiente.

Para entender o comportamento dos herbicidas no meio ambiente, é indispensável um conhecimento das propriedades físico-químicas dos herbicidas e dos principais componentes do meio ambiente. Estabelecer em seguida os processos aos quais os herbicidas estão sujeitos da interação com os componentes do meio ambiente, isto é, retenção, transformação e transporte, para poder finalizar com os impactos que poderia causar no meio ambiente.

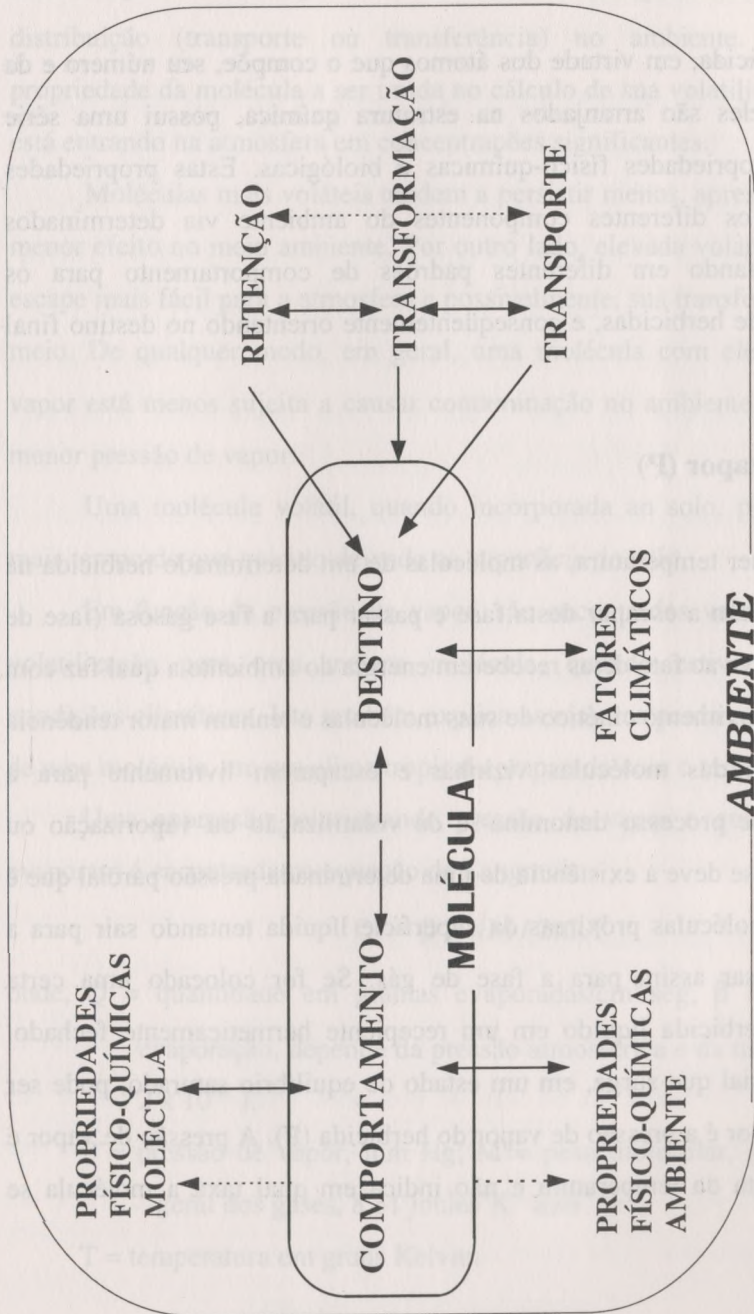


FIG. 1. Interação de molécula orgânica-ambiente.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS HERBICIDAS

Cada herbicida, em virtude dos átomos que o compõe, seu número e da maneira como eles são arranjados na estrutura química, possui uma série específica de propriedades físico-químicas e biológicas. Estas propriedades interagem com os diferentes componentes do ambiente via determinados processos, resultando em diferentes padrões de comportamento para os diferentes tipos de herbicidas, e conseqüentemente orientando no destino final dos mesmos.

1. Pressão de vapor (P)

Em qualquer temperatura, as moléculas de um determinado herbicida na fase líquida, tendem a escapar desta fase e passar para a fase gasosa (fase de vapor). Isto se deve ao fato delas receberem energia do ambiente a qual faz com que aumente o movimento cinético de suas moléculas e tenham maior tendência de se separarem das moléculas vizinhas e escaparem livremente para a atmosfera. A este processo denomina-se de volatilização ou vaporização ou evaporação. Isto se deve a existência de uma determinada pressão parcial que é exercida pelas moléculas próximas da superfície líquida tentando sair para a atmosfera e passar assim para a fase de gás. Se for colocado uma certa quantidade de herbicida líquido em um recipiente hermeticamente fechado, esta pressão parcial que surge, em um estado de equilíbrio saturado, pode ser medida e este valor é a pressão de vapor do herbicida (P). A pressão de vapor é uma função direta da temperatura e não indica em qual taxa a molécula se volatilizará.

A pressão de vapor de um herbicida é importante para avaliar sua distribuição (transporte ou transferência) no ambiente. É a principal propriedade da molécula a ser usada no cálculo de sua volatilização e prever se está entrando na atmosfera em concentrações significantes.

Moléculas mais voláteis tendem a persistir menos, apresentando portanto menor efeito no meio ambiente. Por outro lado, elevada volatilização significa escape mais fácil para a atmosfera e possivelmente, sua transferência para outro meio. De qualquer modo, em geral, uma molécula com elevada pressão de vapor está menos sujeita a causar contaminação no ambiente do que outra de menor pressão de vapor.

Uma molécula volátil, quando incorporada ao solo, pode persistir por mais tempo do que quando deixada na superfície do solo.

Em função da pressão de vapor, são encontrados valores diferentes de volatilização para uma mesma molécula, quando estiver sob diferentes condições climáticas. Isto também explica as maiores perdas, por volatilização, de uma molécula, em um clima tropical comparado com o temperado.

Uma expressão relacionando pressão de vapor e quantidades que se evaporam é encontrada na equação de Langmuir:

$$Q = \beta P \sqrt{M} / 2\pi RT$$

onde, Q = quantidade em gramas evaporadas/cm²/seg; β = coeficiente de evaporação, depende da pressão atmosférica e da turbulência do ar (2×10^{-5});

P = pressão de vapor, mm Hg; M = peso molecular, g; R = constante geral dos gases, 8,31 joules°K⁻¹ mol⁻¹; e

T = temperatura em graus Kelvin.

2. Solubilidade em água (S)

A solubilidade de um herbicida em água pode ser definida como sendo a quantidade máxima de herbicida que se dissolve em água pura a uma determinada temperatura. Acima desta concentração, duas fases distintas existirão se o herbicida é um sólido ou um líquido na temperatura do sistema: uma fase saturada de solução aquosa e uma fase líquida ou sólida do herbicida.

Dos vários parâmetros que afetam o destino e transporte de herbicidas no ambiente, a solubilidade em água é um dos mais importantes. Moléculas altamente solúveis são facilmente e rapidamente distribuídas no ciclo hidrológico. Estas moléculas tendem a ter coeficientes de adsorção para solos e sedimentos relativamente baixos e fatores de bioconcentração na vida aquática também relativamente baixos; assim sendo, elas tendem a ser mais rapidamente biodegradáveis pelos microrganismos no solo e superfície da água. Outros meios de degradação (ex. fotólise, hidrólise, e oxidação) e transporte (ex. volatilização da solução e lavagem da atmosfera pela água de chuva) também são afetados pela extensão da solubilidade em água dos herbicidas.

3. Coeficiente de partição octanol-água (K_{ow})

O coeficiente de partição octanol-água, K_{ow} , é definido como a relação da concentração de um herbicida na fase de n-octanol saturado em água e sua concentração na fase aquosa saturada em n-octanol. Valores de K_{ow} não tem unidade. Ele é expresso normalmente na forma logarítmica ($\log K_{ow}$) e é um valor constante para uma certa molécula a uma dada temperatura.

Concentração na fase n-octanol

$$K_{ow} = \frac{\text{Concentração na fase orgânica}}{\text{Concentração na fase aquosa}}$$

O coeficiente de partição octanol-água tem se tornado um parâmetro muito importante nos estudos do destino de moléculas orgânicas no ambiente. Tem sido observado que ele está relacionado com a solubilidade em água, com os coeficientes de adsorção solo/sedimento, com fatores de bioconcentração para a vida aquática, e muitos outros parâmetros de interesse ao meio ambiente.

A propriedade físico-química mais importante que tem influência no transporte de uma molécula orgânica, após sua aplicação ao solo, é o balanço entre as propriedades hidrofílicas e lipofílicas. Este balanço é estimado, normalmente, através do uso dos coeficientes de partição octanol/água (K_{ow}), uma vez que eles representam a tendência da molécula a se particionar entre uma fase orgânica e uma fase aquosa.

Herbicidas lipofílicos ou não polares, com valores de K_{ow} elevados (maior do que 10000), são fortemente, porém reversivelmente, presos aos materiais lipídicos, com grande potencial de bioacumulação em tecidos gordurosos, incluindo organismos como os invertebrados do solo, partes da planta, e materiais orgânicos degradados tal como a matéria orgânica.

Herbicidas hidrofílicos ou polares, com valores de K_{ow} baixos (menores de 10), são pouco atraídos aos materiais lipídicos e, naturalmente, são mais solúveis em água, e possuem coeficientes de adsorção solo/sedimento e fatores de bioconcentração para a vida aquática pequenos.

A acumulação e transporte de um herbicida nos organismos vivos são controlados pela polaridade, solubilidade em água, afinidade por tecidos gordurosos, e a natureza do potencial de ligação aos receptores biológicos.

Potencial de acumulação de um herbicida é um fator importante na avaliação de riscos. Em conjunto com os dados de degradação, o potencial de acumulação pode ser usado na identificação de herbicidas que podem ser transportados via cadeia alimentar.

Solubilidade em água é um bom indicador do comportamento de várias moléculas orgânicas, porém, por várias razões, nem sempre é assim, e o coeficiente de partição octanol/água deve ser considerado como o indicador mais confiável para indicar o comportamento dos herbicidas.

Quando não se dispõe dos valores de K_{ow} e apenas o valor da solubilidade em água do herbicida é conhecido, então, K_{ow} pode ser estimado através das seguintes equações (Briggs, 1981):

$$\log S = -1,18 \log K_{ow} + 0,84 \quad (\text{para líquidos})$$

$$\log S = -\log K_{ow} - 0,01 (T_m - 25) \quad (\text{para sólidos})$$

onde, S é a solubilidade em água em moles/L e T_m é o ponto de fusão em °C.

O principal fator influenciando o comportamento dos herbicidas em solos é a adsorção pela matéria orgânica do solo (K_{om}).

Existe uma relação simples que relaciona esta adsorção a ser estimada em função dos valores de K_{ow} , para herbicidas não ionizados (Collander, 1950, segundo Briggs, 1973):

$$\log K_{om} = 0,52 \log K_{ow} + 0,62$$

Então, conhecendo-se o teor de matéria orgânica de um solo de interesse, pode-se estimar as proporções relativas de certo herbicida que está adsorvido na matéria orgânica ou que está presente na solução do solo.

Normalmente, a única fonte de herbicidas livres para os organismos do solo e para as raízes das plantas é a solução do solo. Herbicidas na solução do

solo, também estão livres para os processos de transporte via lixiviação e transformação via degradação microbiológica.

4. Entalpia da solução (ΔH)

A maneira mais eficiente de se conhecer o comportamento dos herbicidas no ambiente é conduzir experimentos em condições controladas. A parte do universo sob investigação em um experimento é denominada de sistema, e todos os outros objetos que podem atuar no sistema são chamados de vizinhança (ambiente).

“Um sistema tende a mudar de um estado de maior energia para um de menor energia”. Esta é uma das muitas manifestações que podem ocorrer com os sistemas. Nos sistemas químicos esta mudança de energia é descrita pela entalpia, ΔH .

Porém os sistemas também mudam de um estado de maior organização para um estado menos organizado (maior desordem). Para os sistemas químicos esta mudança na ordem é descrita pela entropia, ΔS .

Quando ambas as tendências não podem ser satisfeitas simultaneamente, o balanço alcançado nesta mudança é descrita por:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

onde ΔG é a variação na energia livre do sistema e T a temperatura em graus Kelvin.

Para que ocorra uma mudança em um sistema, a energia livre deve tender a um decréscimo (valor negativo). O valor negativo na variação da energia livre também indica a probabilidade com que uma reação ocorre.

A entalpia, ΔH , permite estimar a força de ligação de um herbicida com algum componente do ambiente. Isto mostra assim, a susceptibilidade do herbicida à lixiviação e a persistência. É definida pela expressão:

$$\Delta H = \Delta H_0 - \Delta H_w$$

onde, ΔH_0 e ΔH_w são as entalpias no estado final ou adsorvido (fase orgânica) e inicial ou livre (fase aquosa), respectivamente.

Uma reação na qual há liberação de calor (energia) para o ambiente é designada como exotérmica e ΔH_0 é menor que ΔH_w , e então ΔH tem um valor negativo e a reação tem boas chances de ocorrer.

Por outro lado, uma reação que absorve calor do ambiente é designada como endotérmica e ΔH_0 é maior que ΔH_w , e neste caso ΔH tem um valor positivo, e a reação tem boas chances de não ocorrer.

Valores elevados de ΔH_w (positivos) estão associados a moléculas orgânicas de baixa solubilidade em água, isto é, pobre compatibilidade com a água. O correspondente termo ΔH_0 deve ser muito menor, refletindo um aumento de compatibilidade com a fase orgânica.

5. Reatividade (R)

Uma reação química é um processo que transforma uma estrutura em outra. Para se entender uma reação química é necessário que se conheça a estrutura do material inicial e a estrutura do material no fim da reação, e finalmente o que acontece entre os dois estágios, quantitativamente.

Para compreender a estrutura de um herbicida é necessário conhecer a espécie e o número de átomos de que é constituído, seu arranjo no espaço, e as espécies de forças que o mantêm unido.

As reações químicas ocorrem quando, as moléculas colidem numa orientação apropriada e com suficiente energia de ativação para romper as ligações.

A presença de certos grupos funcionais em um herbicida lhes transfere certa peculiaridade em ser mais ou menos reativo, isto é, poder ou não interagir com certos componentes do ambiente.

Assim sendo, grupos reativos tais como: PO_3^- e AsO_3^- transferem elevada reatividade às moléculas que os possuem, pois estes grupos podem se complexar com os minerais de argila dos solos. Por outro lado, moléculas orgânicas que possuem grupo funcional NO_2 , apresentam reatividade moderada em função de que eles podem formar ligações de hidrogênio com substâncias protéicas. No entanto, ausência de certos grupos funcionais reativos nas moléculas orgânicas, caracterizam-nas como de nenhuma reatividade, porém nada impede que certas interações possam ocorrer.

Normalmente, os herbicidas aniônicos não possuem grupos reativos em suas estruturas moleculares, apresentam alta mobilidade no ambiente e também são altamente solúveis em água.

A hidroxilação, isto é, introdução de um grupo hidroxila, OH, no herbicida resulta em uma molécula que pode ser mais reativa biologicamente, mais polar e conseqüentemente mais solúvel em água.

Reações de substituição podem ocorrer com certos herbicidas, os quais ao terem alguns grupos funcionais substituídos por outros, podem levar à produção de moléculas mais difíceis ou susceptíveis de efetuarem uma reação com os componentes do ambiente.

6. Constante da Lei de Henry (H)

A constante da lei de Henry é um coeficiente de partição ar-líquido ou vapor-líquido e é definida pela equação:

$$H = \frac{P_i}{C_i}$$

onde, P_i = pressão parcial na interface ar-água e C_i = concentração na interface ar-água.

Valor de H elevado indica que os solutos são altamente voláteis e, geralmente, o seu valor diminui com o aumento da solubilidade do componente i.

Solubilidade em água, como um parâmetro do meio ambiente, é muito menos importante para herbicidas na fase de gases do que na fase líquida e sólida. A solubilidade de gases é medida, normalmente, quando a pressão parcial do gás citado da solução é uma atmosfera, situação esta que difere da maioria das condições do meio ambiente. Um parâmetro muito mais importante para gases é a constante da lei de Henry, a qual descreve a relação da pressão atmosférica para as concentrações da solução em pressões parciais baixas.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS COMPONENTES DO MEIO AMBIENTE

Os componentes fundamentais do meio ambiente são: ar (atmosfera), água (hidrosfera), terra (litosfera), e biota (biosfera). Sendo o biota compreendido pelos animais, plantas e outros seres vivos.

Quando um herbicida é liberado no meio ambiente ele será distribuído (particionado) entre os vários componentes ou fases do ambiente, e a concentração em qualquer uma das fases é uma função da interação entre as propriedades físico-químicas tanto do herbicida como das fases.

A terra ou solo será o componente alvo no estudo do comportamento de herbicidas no meio ambiente porque ele é, inevitavelmente, o receptáculo final dos herbicidas aplicados na agricultura.

O solo é um sistema dinâmico e heterogêneo que consiste de três fases distintas - uma fase sólida (cêrca de 50%) constituída tanto de sólidos orgânicos e inorgânicos, uma fase líquida (cêrca de 25%), e uma fase gasosa (cêrca de 25%). As fases líquida e gasosa servem como os principais meios de transporte dos herbicidas solúveis e voláteis no solo. A fase sólida é o principal local onde ocorrem as retenções e transformações químicas. Tanto os sólidos orgânicos e inorgânicos podem servir como superfícies de adsorção. Para os efeitos de interação do solo com os herbicidas, as partículas sólidas coloidais são de extrema importância, e dentre estas são destacadas a fração mineral argila, os óxidos/hidróxidos metálicos e a fração matéria orgânica, sendo esta última apenas uma pequena porcentagem em relação ao total.

1. Minerais de argila

Principais características dos minerais de argila:

1. Argilas são formadas de lâminas tetraédricas de sílica e octaédricas de alumina estendidas em diferentes camadas;
2. Há duas maneiras básicas para as camadas se estenderem: dimórfica, onde as lâminas tetraédricas e octaédricas estão numa relação de 1:1, e trimórficas, onde uma lâmina octaédrica é colocada entre duas lâminas tetraédricas numa relação 2:1;
3. A espessura de um único mineral dimórfico e trimórfico é cerca de 7Å e 10Å, respectivamente;
4. Devido as substituições isomórficas de Al^{3+} ou Fe^{3+} por Si^{4+} nas camadas tetraédricas e de Fe^{2+} ou Mg^{2+} por Al^{3+} nas camadas octaédricas, as argilas são carregadas negativamente; sua capacidade de troca de cátions variam tipicamente entre 2 e 200 eq-mg/100 g;
5. Tais cargas negativas são neutralizadas por cátions hidratados trocáveis cujas trocas são incrementadas com o aumento do raio de hidratação e decréscimo da polarizabilidade do cátion e carga iônica do contra-íon;
6. O volume de fase líquida sob influência do campo elétrico ocasionado pela superfície carregada de uma argila é chamada de dupla camada elétrica difusa; neste volume a concentração catiônica é maior do que na solução principal; a espessura desta camada está correlacionada inversamente com a carga dos cátions trocáveis e com a força iônica

da solução principal; em condições ambientes a espessura da dupla camada é freqüentemente menor que 10Å;

7. A distância entre as camadas de silicato é chamada de espaçamento basal e depende do estado de hidratação da argila (argilas desidratadas tem menor espaçamento basal do que as hidratadas) e do tipo de espécies catiônicas presas entre suas treliças de cristal (argilas com íons amônio e potássio presos possuem menor espaçamento basal do que argilas com cátions diferentes); um espaçamento basal típico é cerca de 10Å;
8. Água e compostos inorgânicos bem como orgânicos podem entrar nos espaços entre camadas causando expansão da argila; de acordo com isto, as argilas podem ser classificadas em expandidas, expansão limitada e não expandidas.

Adsorção de herbicidas por argilas pode ocorrer de vários modos:

- a) herbicidas carregados positivamente podem substituir os cátions trocáveis que ocorrem naturalmente nos sítios de adsorção;
- b) herbicidas carregados negativamente podem ser adsorvidos, em valores apropriados de pH, quando ocorre a protonação dos grupos anfólitos de Si-OH e Al-OH;
- c) herbicidas neutros bem como os carregados podem penetrar entre duas lâminas tetraédricas de silicato (adsorção interlamelar) em argilas expandíveis.

2. Matéria orgânica

Informações da maneira como os herbicidas reagem com a matéria orgânica podem fornecer uma base racional para seu uso mais efetivo, reduzindo portanto efeitos colaterais indesejáveis devido ao “carry-over”, contaminação do ambiente e fitotoxicidade às culturas.

Matéria orgânica é uma mistura polidispersa de polieletrólitos orgânicos complexos, não é considerada anfólito e devido a dissociação de seus grupos ácidos ela tem uma carga negativa dependente de pH.

No sistema solo a matéria orgânica é fortemente associada com os constituintes minerais do solo; ela recobre parcialmente os minerais de argila e superfície dos óxidos.

Geralmente a matéria orgânica é subdividida em: **Substâncias não Húmicas**: compreendem substâncias orgânicas que são quimicamente bem definidas e normalmente sem cor. A maioria delas são simples, compostos de baixo peso molecular que podem ser utilizadas como substratos por microorganismos do solo. Entre estas substâncias podem ser encontradas carboidratos, hidrocarbonos, alcoóis, auxinas, aldeídos, resinas, amino-ácidos e ácidos alifáticos e aromáticos. **Substâncias Húmicas**: consistem de uma mistura fisicamente e quimicamente heterogênea de peso molecular relativamente elevado, compostos orgânicos de cor amarela para preta, de natureza alifática e aromática mista, formadas por reações de síntese secundárias (humificação) durante os processos de decaimento e transformação de biomoléculas que originaram de organismos mortos e atividade microbiana (Stevenson, 1982).

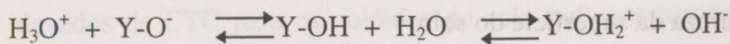
Com base em suas solubilidades em água em vários pH, substâncias húmicas são divididas em três frações principais que são: i) ácidos húmicos, a porção que é solúvel em solução alcalina diluída e é precipitada sob acidificação a pH 2; ii) ácidos fúlvicos, a porção que é solúvel em qualquer valor de pH, mesmo abaixo de 2; iii) humina, a porção que não é solúvel em ácidos e bases (Stevenson, 1982).

A adsorção de herbicidas pela matéria orgânica controla a quantidade de herbicida na solução de solo, e determina sua persistência, lixiviação, mobilidade, e biodisponibilidade. A extensão da adsorção depende da: a) natureza e propriedades do herbicida; b) tipo e quantidade de matéria orgânica; c) condições do próprio ambiente onde vai ocorrer a interação. Uma vez que o herbicida está adsorvido, ele pode: a) ser dessorvido facilmente; b) ser dessorvido com dificuldade; c) não ser dessorvido.

3. Óxidos e hidróxidos metálicos

Óxidos naturais (de Si, Al, Fe, Ti) ocorrendo em solos são os pontos finais estáveis do fenômeno de intemperismo das rochas naturais e constituem basicamente o esqueleto do solo.

A química de tais minerais é dominada por suas propriedades de anfólitos, a qual está associada com a estrutura química dos grupos hidroxilas (dois pares de elétrons sozinhos no oxigênio e um hidrogênio ionizável):



onde Y indica uma superfície hidroxilada qualquer.

Como para qualquer composto anfótero, uma superfície hidroxilada será caracterizada por seu próprio valor de pH_{zpc} (zpc é o ponto de carga zero quando $[Y-O^-] = [Y-OH_2^+]$).

Superfícies hidroxiladas se tornam positivamente carregadas em valores de pH menores que pH_{zpc} e negativamente carregadas para valores de pH maiores que pH_{zpc} .

Para minerais puros os valores de pH_{zpc} para sílica, hidróxidos de alumina e ferro são, respectivamente, 2, 9 e 7. Assim sendo, no pH neutro ($pH = 7$), a carga elétrica da superfície de sílica, hidróxido de alumina e ferro serão, respectivamente, negativa, positiva e zero (neutra).

Herbicidas carregados permanentemente ou ionizáveis serão a classe de compostos que irão interagir mais eficientemente com tais superfícies carregadas. A natureza e magnitude de tais interações dependem principalmente do pH da fase líquida. O pH , de fato, determinará a extensão da protonação das superfícies de hidroxilas, assim também como a dissociação ou protonação de herbicidas ionizáveis.

4. pH

O pH de uma solução ou solo tem um efeito significativo no comportamento dos herbicidas, pois os mesmos não são muito estáveis tanto em valores de pH baixo ou alto. Além disto, uma mudança no valor de pH também influencia na natureza da superfície do solo.

Herbicidas básicos tendem a se tornarem positivamente carregados (cátions) pelo recebimento de íons hidrogênio. A força básica ou alcalina destes herbicidas é medida pela capacidade dos mesmos em receberem os íons

hidrogênio. A este mecanismo de recebimento do íon hidrogênio é denominado de protonação.

Herbicidas ácidos tendem a se tornarem negativamente carregados (ânions) doando íons hidrogênio. A força ácida destes herbicidas é medida pela capacidade dos mesmos em doarem os íons hidrogênio. A este mecanismo de doação do íon hidrogênio é denominado de deprotonação. Em condições de pH elevado (uma ou mais unidades de pH acima do pKa do ácido) se tornam ânions devido à dissociação.

Herbicidas neutros ou não iônicos se comportam diferentemente dos herbicidas ácidos ou básicos. Herbicidas neutros podem estar sujeitos à “polarização temporária” na presença de um campo elétrico, o qual contribui para a adsorção em uma superfície carregada. A disponibilidade de elétrons móveis, tais como elétrons π no anel benzeno, influencia a polarização de uma molécula neutra. Assim, a adsorção de herbicidas neutros em superfícies carregadas pode aumentar com o tamanho molecular quando o aumento envolve a adição de grupos aromáticos.

5. CTC

A Capacidade de Troca de Cátions (CTC) é a quantidade de sítios trocáveis de uma superfície que pode adsorver e liberar cátions. É apenas uma medida da quantidade absoluta e é expressa em termos de eq-mg/100 g. Valores elevados de CTC para os colóides do solo indicam que os mesmos possuem grande capacidade de reter íons de carga positiva para poder manter a neutralidade do sistema.

6. Força iônica

Em termos gerais a força iônica afeta o fenômeno de sorção modificando a espessura da camada dupla difusa da fase sólida e variando o coeficiente de atividade do soluto. A teoria afirma que a espessura da camada dupla difusa é diminuída com forças iônicas maiores.

Adsorção de herbicidas neutros podem ser influenciados pelo efeito da força iônica na atividade aquosa do soluto através do chamado efeito “salting-out”. Este efeito pode variar diretamente ou inversamente com a força iônica, dependendo do sal considerado. Na maioria dos casos ocorre um aumento na adsorção com o aumento da força iônica. Isto pode ser explicado considerando que um aumento na força iônica aumentará a incompatibilidade de um soluto lipofílico com a água de tal modo que o soluto será empurrado para fora da fase aquosa.

Se o herbicida é uma molécula polar ou carregada envolvida em interações eletrostáticas com o adsorvente, um aumento na força iônica causa, normalmente, uma redução da atividade do herbicida devido ao efeito escudo dos íons vizinhos. Em tal caso, interações específicas serão enfraquecidas proporcionalmente. No caso de interações não específicas, tal como partição lipofílica, um aumento na força iônica freqüentemente acarreta um aumento correspondente na concentração do soluto na fase aquosa via um mecanismo que não é o efeito “salting-out”.

7. Capacidade tampão

Processos naturais, práticas agrícolas, assim também como contaminação do meio ambiente, perturbam continuamente a composição química do solo. O

efeito da perturbação depende da capacidade tampão do sistema solo para agir contra as mudanças.

A capacidade tampão depende da reatividade química e é específica ao herbicida. Portanto, a quantificação da capacidade tampão requer entendimento dos processos de especiação (complexação, adsorção/dessorção, precipitação/dissolução, degradação) para os herbicidas de interesse.

PROCESSOS DE INTERAÇÃO ENTRE HERBICIDA E MEIO AMBIENTE

Muitos dos herbicidas que entram no ambiente possuem uma elevada resistência à degradação biológica e, se eles não interagem fortemente e irreversivelmente com os componentes coloidais, insolúveis em água, dos solos, eles podem surgir nas superfícies das águas, ou entrarem nas zonas insaturadas e eventualmente terminarem nas águas subterrâneas.

1. Retenção

O processo de retenção visa “segurar” a molécula de herbicida, impedindo-a de se mover. Pode ser reversível ou irreversível e pode afetar os processos de transporte e transformação.

O termo sorção é utilizado para representar a “apreensão” de um soluto pelo solo (ou constituinte do solo) sem indicar um mecanismo específico. Quando o fenômeno de retenção não é muito bem definido, ou seja, não se pode distinguir entre adsorção e absorção, então o termo sorção é empregado.

1.1. Adsorção/dessorção

Adsorção se refere à adesão ou atração de uma ou mais camadas iônicas ou moleculares para uma superfície. É um processo interfacial. Dessorção é o fenômeno inverso da adsorção, isto é, quando ocorre a liberação das camadas iônicas ou moleculares presas à superfície para a solução.

Categorias ou tipos:

- a) adsorção química - são devidas a forças de coulomb e envolve o compartilhamento de elétrons entre a molécula e a superfície adsorvedora. É caracterizada por energias de adsorção elevadas e tempos de adsorção longos;
- b) adsorção física ou forças de Van der Waals - é caracterizada por energias de adsorção baixas (20 kcal/mol ou menos) e tempos de residência na superfície adsorvedora pequenos (100 segundos ou menos). Muitos herbicidas se incluem nesta categoria e moléculas dipolares são atraídas para as superfícies desta maneira;
- c) ligações de hidrogênio - é uma ligação entre dois átomos altamente eletronegativos intermediada pelo átomo de hidrogênio. As forças de adsorção nesta categoria são intermediárias entre as adsorções físicas e químicas.

Existe um método experimental que é largamente utilizado para avaliar a adsorção - método "batch" ou em batelada ou lotes ou partidas: certa quantidade de solo e solução de herbicida é agitada por um período de tempo pré-determinado, findo o qual a mistura é filtrada ou centrifugada e a concentração do herbicida remanescente na solução é medida. Ele é simples e

razoavelmente rápido, porém possui duas desvantagens: a primeira é que a quantidade adsorvida é estimada pela diferença entre a concentração inicial e a de equilíbrio, e então, se a adsorção é baixa, esta diferença será pequena em relação ao erro analítico e a medida da adsorção terá falta de precisão; a segunda é que a relação solução/solo na mistura, tipicamente entre 5 e 20 para 1, é tão diferente das condições de campo que os resultados podem ser de significância prática questionáveis. A agitação da mistura faz com que as partículas do solo se dispersem de tal modo que uma superfície maior possa ser exposta e seja diferente do que ocorre no campo.

Quantificação da adsorção/dessorção:

Várias equações têm sido usadas para correlacionar dados de estudos de adsorção, porém as mais comumente utilizadas são as isotermas de Freundlich e Langmuir. A equação de Freundlich é puramente empírica e pode ser expressa como:

$$x/m = K C^{1/n}$$

onde, x/m é a quantidade adsorvida por unidade de peso (concentração na fase sólida), K é uma constante de equilíbrio, C é a concentração da solução (concentração na fase líquida), no equilíbrio, e $1/n$ é a constante exponencial que é adicionada para levar em conta a não linearidade em concentrações elevadas, e normalmente tem valor sempre menor do que 1.

A equação contém, portanto, duas variáveis independentes, K e n , as quais variam com o solo e com o herbicida. Isto torna a equação de uso limitado apenas para interpolação e não extrapolação. Para soluções de baixas concentrações, geralmente, o valor de n se aproxima de 1. A equação da

isoterma de Freundlich tem se adaptado a isothermas de adsorção de vários herbicidas.

A constante de adsorção, K , pode ser usada para comparar a adsorção de diferentes herbicidas em vários solos em concentrações unitárias ou para estudar a dependência da adsorção em outras propriedades físico-químicas de um herbicida. O valor de $1/n$ fornece uma estimativa grosseira da intensidade da adsorção.

A equação de Langmuir tem base conceitual porque foi desenvolvida originalmente para adsorção de gases em sólidos, porém ela pode ser escrita em termos de concentração e adaptada para adsorção líquido-sólido, e representada do seguinte modo:

$$x/m = \frac{K_1 K_2 C}{(1 + K_2 C)}$$

onde, x/m e C tem o mesmo significado da equação de Freundlich, e K_1 e K_2 são constantes para o sistema. Para soluções de baixa concentração, o fator $K_2 C$ se torna pequeno comparado com 1 do denominador, e então a equação se torna mais simples.

A equação da isoterma de Langmuir implica que a entalpia de adsorção seja independente da cobertura da superfície. Isto é baseado em um modelo que assume uma superfície uniforme. Uma vez que as superfícies dos solos estão longe de serem uniformes, a equação de Langmuir tem sido de uso limitada; além disto, pode ocorrer mais de uma camada de adsorção.

A adsorção dos herbicidas também pode ser caracterizada quantitativamente pelo coeficiente de adsorção linear, K_d :

$$x/m$$

$$K_d = \frac{x/m}{C}$$

onde, K_d é uma constante de distribuição de adsorção entre duas fases, x/m é a quantidade adsorvida por unidade de peso ($\mu\text{g/g}$ de solo) e C é a concentração da solução.

Númerosos estudos têm demonstrado que a adsorção está correlacionada significativamente com o carbono orgânico do solo, no mínimo no caso dos herbicidas não iônicos. Neste caso, uma melhor equação que descreve esta distribuição é a seguinte:

$$K_{oc} = \frac{x/m}{C}$$

onde, K_{oc} é o coeficiente de adsorção relacionado com o carbono orgânico do solo, x/m é a quantidade adsorvida por unidade de peso ($\mu\text{g/g}$ de carbono orgânico) e C é a concentração da solução. Portanto, o uso de coeficiente de adsorção em função do carbono orgânico do solo é mais adequado e está relacionado ao valor de K_d pela expressão:

$$K_{oc} = \frac{K_d \times 100}{\% \text{ O.C.}}$$

onde, $\% \text{ O.C.}$ é o teor de carbono orgânico no solo (análises da matéria orgânica do solo tem mostrado que aproximadamente 58% é carbono orgânico, e então um fator de multiplicação de 1,724 é usado para converter carbono orgânico em matéria orgânica: $K_{om} = 1,724 K_{oc}$; quando os valores do teor de matéria orgânica são conhecidos, então é utilizado um fator de multiplicação de 0,58 para se obter o teor de carbono orgânico: $K_{oc} = 0,58 K_{om}$).

K_{oc} é um coeficiente de adsorção que descreve a adsorção de um herbicida ao solo baseado apenas nas propriedades da molécula e portanto pode

ser usado para comparar as quantidades relativas de adsorção de diferentes herbicidas. Seus valores também tem sido correlacionados com a solubilidade em água (S), o coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) e fator de bioconcentração na vida aquática (BCF), através da relação geral:

$$\log K_{oc} = a \log X + b$$

onde X representa as propriedades S, K_{ow} ou BCF, e a e b são constantes que variam de acordo com o número de moléculas consideradas e do tipo de composto.

Herbicidas são adsorvidos, principalmente, à matéria orgânica, aos minerais de argila, e óxidos/hidróxidos metálicos do solo. As propriedades de ligação destes componentes do solo diferem significativamente e são influenciadas por condições do ambiente, tais como o pH e força iônica da solução.

1.2. Absorção

Absorção se refere à penetração interna nas partículas de solo ou organismos vivos por íons ou moléculas de herbicidas. Este fenômeno é caracterizado por inchaço. A maneira como o herbicida penetra internamente no sistema absorvedor pode ser por um mecanismo físico, passivamente, como o fluxo de massa por exemplo, ou pela atividade metabólica do organismo via ingestão direta. Uma vez que o herbicida é absorvido pode ser acumulado dentro do sistema absorvedor e, caso seja uma planta ou outro organismo vivo, o herbicida pode sofrer interação íntima e ser metabolizado pelos mesmos. A absorção tem relação direta com a eficiência dos herbicidas e com a presença de resíduos dos mesmos nas culturas e alimentos.

A absorção está relacionada com o coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) do herbicida. Se o coeficiente de partição é alto e a taxa de degradação é baixa, o herbicida pode se acumular nos organismos da cadeia alimentar em aumentos sucessivos em cada etapa.

1.3. Precipitação

Se ocorre uma acumulação de herbicida, suficientemente elevada (saturação), em uma interface, pode haver a formação de um precipitado. Tal processo difere tanto da adsorção como da absorção porque resulta na formação de uma fase tridimensional nova e distinta. Ao estudar o comportamento dos herbicidas no meio ambiente, não se deve esquecer da possibilidade de que certos herbicidas de baixa solubilidade em água (valores baixos do produto de solubilidade, K_s) podem formar precipitados.

2. Transformação

Os processos de transformação ocasionam mudanças na estrutura química das moléculas do herbicida e determinam-se e por quanto tempo tais moléculas podem estar intactas no meio ambiente.

Esta transformação também é conhecida como degradação, a qual consiste em desdobrar a estrutura molecular do herbicida em componentes menores ou mais simples por meios bióticos ou abióticos. Estes subprodutos resultantes tendem a diminuir a toxicidade da molécula do herbicida, embora possa, ocasionalmente, resultar em componentes mais tóxicos do que a molécula original.

É de extrema importância na degradação de uma molécula de herbicida saber a maneira como ela se degrada e a taxa na qual ela se degrada, as quais tem influência na persistência da molécula no meio ambiente. Esta persistência tem ligação direta com a eficácia do herbicida e pode resultar na presença indesejável de seus resíduos no meio ambiente.

2.1. Biótica

A maioria das moléculas de herbicidas é transformada pela ação do metabolismo de microorganismos e plantas. Enzimas são secretadas por estes seres vivos as quais em contacto com os herbicidas originam uma série de reações, tais como: oxidação, redução, hidrólise, dealquilação, descarboxilação, hidroxilação, metilação, beta-oxidação, dealcoilação, etc.

Este tipo de transformação também é conhecido como degradação microbiológica, pois muitos microorganismos necessitam de certos nutrientes como o carbono e nitrogênio para a sua manutenção e sobrevivência, os quais eles conseguem através do desdobramento dos herbicidas.

2.2. Abiótica

A molécula de herbicida é degradada pela ação de componentes físicos do meio ambiente. Assim sendo, é possível observar fotodegradação quando ocorre a ação da luz na estrutura da molécula do herbicida; degradação química quando reações químicas tais como hidrólise, oxidação, e descarboxilação se processam no meio ambiente em função da presença de certos reagentes do ambiente que interagem com o herbicida.

3. Transporte

O processo de transporte determina onde as moléculas de herbicida podem estar no meio ambiente.

No solo, o movimento do herbicida pode ocorrer por difusão ou fluxo de massa. A difusão ocorre tanto na fase de vapor ou de não vapor e é influenciada pela umidade, temperatura, densidade total, capacidade adsorviva do solo, profundidade de incorporação, e as propriedades físico-químicas do herbicida. O fluxo de massa é atribuído a forças externas, as quais distribuem o herbicida em solução, como partículas suspensas em solução, ou como um complexo solo-herbicida.

O processo de adsorção/dessorção influencia grandemente a natureza e extensão do movimento do herbicida no solo e, geralmente, há uma correlação inversa entre adsorção e movimento do herbicida no solo.

3.1. Volatilização

Este processo distribui o herbicida do solo ou água para a atmosfera.

Cada herbicida tem uma tendência a mudar da fase sólida para líquida e desta para vapor devido ao movimento das moléculas que o compõe. A tendência de um estado líquido a passar para o estado gasoso ou volatilizar é indicada por sua pressão de vapor.

Uma vez que um herbicida penetra no ambiente, sua entrada e transporte através da atmosfera vai depender de vários fatores tais como a pressão de vapor, a entalpia de vaporização da molécula, o coeficiente de partição entre a atmosfera e qualquer outra fase, e o fluxo de massa de ar o qual transportará qualquer herbicida disperso na fase atmosférica.

A presença de pós suspensos ou partículas de aerossóis na atmosfera pode resultar na adsorção de algumas das moléculas do herbicida no estado de vapor, e conseqüentemente aumentará a função de partição do herbicida entre a fase atmosférica e outros elementos do ambiente. O herbicida assim retido pode então ser transportado por algumas distâncias com o material particulado. Isto pode explicar a presença de herbicidas onde eles nunca foram usados.

Moléculas orgânicas presentes no ar possuem velocidades da ordem de 500 m/s e diâmetros ao redor de 300 μm .

Uma vez que a volatilização de um herbicida de uma superfície está relacionada com sua difusão no ar, correntes de ar podem aumentar a taxa de volatilização.

Vários herbicidas em um sistema aquoso se evaporam simultaneamente com a água. Perdas de vapor de um herbicida do sistema solo, por exemplo, são aceleradas pela presença de umidade.

Embora a pressão de vapor de um herbicida, em grande extensão, determina a entrada do produto na atmosfera, cuidado deve ser tomado em interpretar os dados. A pressão de vapor de um herbicida pode dar uma boa estimativa do transporte de ar enquanto o produto estiver no estado livre ou esteja volatilizando de uma superfície inerte. De qualquer modo, quando o herbicida é ligado à superfície, a pressão de vapor não pode ser usada como um índice para o transporte de vapor.

Deve ser lembrado que enquanto estiver estudando as perdas de vapor de uma superfície de solo outros fatores que podem controlar a liberação do herbicida podem incluir a temperatura, concentração inicial do herbicida, umidade, e pH.

Transporte de um pesticida para a atmosfera:

Este transporte vai ocorrer em função da capacidade da molécula se volatilizar.

Quando uma molécula entra no ambiente, sua entrada e transporte para a atmosfera vai depender de vários fatores:

- 1) Pressão de vapor e entalpia de vaporização (ΔH) da molécula.
- 2) Coeficiente de partição entre a atmosfera e qualquer outra fase (líquida ou sólida)
- 3) Fluxo de massa de ar que transportará qualquer molécula dispersa na fase atmosférica.

A pressão de vapor da molécula desempenha um papel muito importante no transporte atmosférico, uma vez que relaciona, proporcionalmente, com a quantidade da molécula na fase gasosa.

3.2. Lixiviação

Acarreta na movimentação do herbicida ao longo do perfil do solo, juntamente com a percolação da solução do solo, em direção ao lençol freático.

A lixiviação é influenciada pela frequência de chuva e irrigação. Geralmente, quanto maior a quantidade de água recebida, maior a quantidade e mais fundo o herbicida é lixiviado através do solo.

A propriedade dominante que controla a lixiviação de herbicidas em solos é o teor de matéria orgânica. Outros fatores, tais como: teor de argila, CTC, teor de nitrogênio, etc., também podem influenciar positivamente ou negativamente, em certa extensão, a lixiviação.

Os principais fatores contribuindo para a partição de um herbicida em um ambiente aquático são a sua solubilidade em água e a entalpia da solução.

3.3. Escorrimento superficial (Runoff)

Movimenta o herbicida ao longo da superfície do solo em declive, juntamente com o escoamento da água de chuva ou o vento, até a superfície das águas dos rios, lagos e terrenos de menor declividade.

A quantidade de herbicida e a distância que é carregado por transporte de massa superficial, são influenciados por fatores tais como: taxa de aplicação, propriedades físico-químicas do herbicida e do solo, o tempo antes que ocorra a erosão seguindo a aplicação, quantidade de precipitação vs taxa de infiltração, o relevo topográfico do terreno, e o tipo de cobertura vegetal.

A deposição de herbicidas é o resultado final do transporte de massa superficial, a qual é influenciada pela velocidade da força carregadora (água ou vento) e o tamanho da partícula no qual o herbicida pode estar adsorvido.

Referências bibliográficas

- ADAMS JR., R.S. Factors influencing soil adsorption and bioactivity of pesticides. *Residue Reviews*, v.47, p.1-54, 1973.
- BAILEY, G.W.; WHITE, J.L. Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil. *Residue Reviews*, v.32, p.29-92, 1970.
- BRIGGS, G.G. Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.29, p.1050-1059, 1981.
- BROMILOW, R.H.; CHAMBERLAIN, K. Pathways and mechanisms of transport of herbicides in plants. In: KIRKWOOD R.C., ed. *Topics in applied chemistry target sites for herbicide action*. New York: Plenum Press, 1991. p.245-284.
- CHIOU, C.T.; FREED, V.H.; SCHMEDDING, D.W.; KOHNERT, R.L. Partition coefficient and bioaccumulation of selected organic chemicals. *Environmental Science & Technology*, v.11, p.475-478, 1977.
- COLLANDER, R. *Acta Chemica Scandinavica*, v.4, p.1085-1098, 1950.

- FREED, V.H.; CHIOU, C.T.; HAQUE, R. Chemodynamics: transport and behavior of chemicals in the environment - A problem in environmental health. *Environmental Health Perspectives*, v.20, p.55-70, 1977.
- HAMAKER, J.W.; THOMPSON, J.M. Adsorption. In: GORING, C.A.I.; HAMAKER, J.W. ed. *Organic chemicals in the soil environment*. New York: Marcel Dekker, 1972. p.49-143.
- HANCE, R.J. Adsorption and bioavailability. In: GROVER, R., ed. *Environmental chemistry of herbicides*. Boca Raton: CRC Press, 1988. p.1-19.
- HAQUE, R. Role of adsorption in studying the dynamics of pesticides in a soil environment. In: HAQUE, R.; FREDD, V.H., ed. *Environmental dynamics of pesticides*. New York: Plenum Press, 1975. p.97-114.
- LEAKE, C.R. Fate of soil-applied herbicides: factors influencing delivery of active ingredients to target sites. In: KIRKWOOD, R.C., ed. *Topics in applied chemistry target sites for herbicide action*. New York: Plenum Press, 1991. p.189-218.
- LOPES, A.; PETRUZZELLI, D. Interactions of toxic organics with subsoils components. In: PETRUZZELLI, D.; HELFFERICH, F.G., ed. *Migration and fate of pollutants in soil and subsoils*. Berlin: Springer-Verlag, 1993. p.93-110. (Nato ASI Series G: Ecological Sciences, 32).
- LYMAN, W.J.; REEHL, W.F.; ROSENBLATT, D.H. *Handbook of chemical property estimation methods* - Environmental behavior of organic compounds. Washington: American Chemical Society, 1990.

MONTGOMERY, J.H. *Agrochemicals desk reference environmental data*.

Boca Raton: Lewis Publishers, 1993. 625p.

PETRUZZELLI, D.; LOPES, A. Solid-phase characteristics and ion exchange phenomena in natural permeable media. In: PETRUZZELLI, D.; HELFFERICH, F.G. ed. *Migration and fate of pollutants in soil and subsoils*. Berlin: Spring-Verlag, 1993. p.75-92. (Nato ASI Series G: Ecological Sciences, 32).

PIERZYNSKY, G.M.; SIMS, J.T.; VANCE, G.F. *Soils and environmental quality*. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994. 313p.

WEBER, W.J. Transport and fate of pollutants in subsurface systems: contaminant sorption and retardation. In: PETRUZZELLI, D.; HELFFERICH, F.G., ed. *Migration and fate of pollutants in soil and subsoils*. Berlin: Spring-Verlag, 1993. p.3-26. (Nato ASI Series G: Ecological Sciences, 32).

MECANISMOS DE SORÇÃO E DEGRADAÇÃO DE HERBICIDAS EM SOLOS E ÁGUA

Ladislau Martin-Neto, EMBRAPA-CNPDIA, São Carlos, SP

Para haver um bom entendimento do comportamento de um herbicida no solo estudos detalhados em diferentes níveis precisam ser executados. No esquema da Fig. 1 é apresentado os principais parâmetros e níveis nos quais os experimentos devem ser executados, conforme sugerido na literatura internacional. Chama-se a atenção que no caso do Brasil, que ocupa a 5ª posição no Mundo no consumo de pesticidas, há necessidade premente de estudos nas áreas em todas os níveis considerando também o fato que boa parte dos dados obtidos em países de clima temperado não podem ser extrapolados diretamente para o Brasil. Experimentos em escala de laboratório com obtenção de isotermas de sorção, medidas de meia vida dos compostos e o uso de modelos de simulação e outros e monitoramento de resíduos em águas e solos em diferentes ecossistemas tem sido executados por alguns grupos no país. A nível molecular porém pouquíssimos experimentos tem sido efetuados. Contudo as interações a nível molecular podem determinar os parâmetros de adsorção no solo, degradação abiótica e biótica e possível perda da atividade fitotóxica e grau de toxidez do derivado gerado.

Tem sido bem estabelecido que a matéria orgânica do solo é o principal sítio de sorção para os herbicidas apolares, a grande maioria atualmente

Nesta apresentação serão descritos os principais mecanismos existentes da interação herbicidas-substâncias húmicas, principais constituintes da matéria orgânica do solo, como ligações iônicas, pontes de hidrogênio e transferência de prótons, mecanismo de transferência de carga (elétrons), forças de van der Waals, troca de ligantes, adsorção hidrofóbica e partição (Senesi et al., 1992).

Os dados experimentais foram obtidos através do uso simultâneo de diferentes espectroscópicas, como Ressonância Paramagnética eletrônica, Infravermelho com transformada de fourier (FTIR) e Absorção de Luz UV-Visível, e também métodos polarográficos. Resultados disponíveis para a interação dos herbicidas atrazina e 2,4-D com ácidos húmicos extraídos de solos brasileiros e em comparação com solos de outros países serão apresentados (Martin-Neto *et al.*, 1994; Francisco *et al.*, 1996; Traghetta *et al.*, 1996; Sposito *et al.*, 1996).

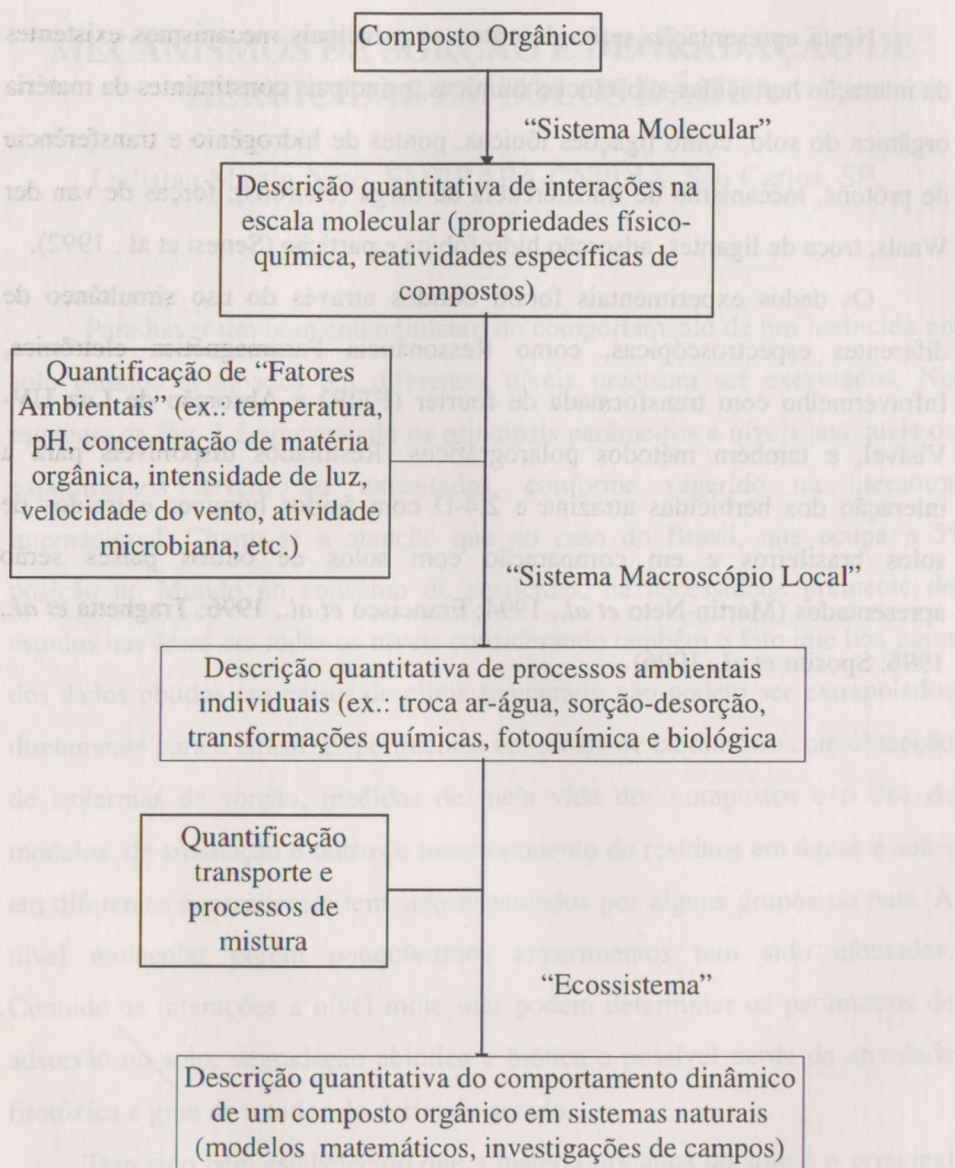


FIG. 1. Níveis e principais parâmetros a serem estudados para entendimento do comportamento de pesticidas (compostos orgânicos) no solo.

Referências bibliográficas

- FRANCISCO, M.S.P.; VIEIRA, E.M.; MARTIN-NETO, L. A interação do herbicida 2,4-D com o ácido húmico. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DO SOLO, 13., 1996. Águas de Lindóia-SP. *Solo suelo 96*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1996. 5p. CD-ROM.
- MARTIN-NETO, L.; VIEIRA, E.M.; SPOSITO, G. Mechanism of atrazine sorption by humic acid: A spectroscopic study. *Environmental Science & Tecnhnology*, v..28, n.11, p.1867-1873, 1994.
- SENESI, N. Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances. *The Science of the Total Environment*, v.123/124, p.63-76, 1992.
- SPOSITO, G.; MARTIN-NETO, L.; YANG, A. Atrazine Complexation by Soil Humic Acids. *Journal of Environmental Quality* (aceito para publicação em Março/95).
- TRAGHETTA, D.G.; SPOSITO, G.; VIEIRA, E.M.; MACHADO, S.A.S.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A.; VAZ, C.M.P.; CRESTANA, S.; MARTIN-NETO, L. Spotion and degradation of atrazine in soil organic matter fractions. In: CONFERENCE ON ENVIRONMETRICS IN BRAZIL, 1996, São Paulo. *Abstracts...* São Paulo: Universidade de São Paulo, 1996. p.L14-L15.

BIODEGRADAÇÃO DE HERBICIDAS

Regina Teresa Rosim Monteiro, Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP, C.Postal 96, 13400-970 - Piracicaba, SP

O termo biodegradação tipicamente se refere a transformação biológica de um composto químico orgânico para outra forma, sem se referir a extensão. Esta transformação pode ser primária envolvendo somente uma mudança estrutural da molécula, tais como uma oxidação ou redução ou perda de um grupo funcional, embora estas modificações são pequenas alteram as características físico-químicas da molécula parental. A transformação pode ser mais complexa envolvendo várias reações sequenciais, implicando na perda da toxidez da molécula. O processo de biodegradação ideal resulta na mineralização do composto, com formação de dióxido de carbono, água, produtos inorgânicos e composto orgânicos de ocorrência comum no ambiente como ácidos orgânicos e outros. A impotência das populações microbianas presentes no solo na degradação de herbicidas é bastante reconhecida. Processos biodegradativos podem ocorrer através de uma simples espécie ou mais freqüentemente requer uma mistura de organismos diversos. Os microrganismos podem tanto utilizar os herbicidas como substratos fornecendo nutrientes ou como fonte de energia. Ou pode ocorrer ação microbiana modificando a estrutura química do produto, mas não há fornecimento de energia para o crescimento (Alexander, 1981).

Fatores do ambiente podem afetar a transformação dos herbicidas tanto na água como no solo. Temperatura, umidade, vento, luz solar, propriedades do

solo, tais como: pH, superfície mineral, nutrientes disponíveis, matéria orgânica, quantidade de oxigênio e a biota, flora e fauna, macro e micro.

No solo as técnicas de aplicação, cultivo, irrigação, natureza das culturas, podem afetar a persistência do herbicida. As Plantas podem absorver e metabolizar herbicidas. Entretanto estes produtos podem reentrar no solo na forma metabolizada, via exudação das raízes. Semelhantemente herbicidas aplicados na folhagem podem entrar no solo através da translocação e exsudação das raízes em sua forma original ou transformados. A taxa de transformação dos herbicidas podem ainda ser modificada na presença de raízes das plantas e associação com a microflora. Um bom exemplo desta associação é dado por Krueger *et al.* (1991), onde o uso de linhagens de microrganismos capazes de degradar o herbicida dicamba, isoladas da rizosfera de plantas resistentes, protegeu plantas susceptíveis na presença de dicamba, em testes de laboratório e campo.

A maioria dos herbicidas degradam no ambiente. Hill (1978) mostrou que após a aplicação do herbicida 2,4-D no solo, houve um período que o produto permaneceu no solo na forma original e então a degradação ocorreu paulatinamente. Seguindo a segunda aplicação, o herbicida 2,4-D, foi degradado mais rapidamente e sem o período de adaptação e com a terceira aplicação a degradação ocorreu mais rápida ainda. Outras investigações tem mostrado ocorrer fenômeno semelhante com outros pesticidas, incluindo os dos grupos carbamatos, organofosfatos e acetamidas (Racke & Coats, 1990). Este fenômeno, denominado de degradação acelerada, ocorre em solos após duas ou mais aplicações prévias. O desaparecimento do composto químico parental e sua taxa de mineralização, comparando o solo com e sem aplicações prévias, são os dois critérios para determinar se o fenômeno está ocorrendo.

A estrutura molecular do herbicida tem efeito marcado nas taxas e rotas da transformação. Os componentes da formulação (solventes, emulsificadores, adsorventes, anti-espumantes, adjuvantes, etc.) e algumas impurezas no produto são potencialmente capazes de afetar a população microbiana e também as propriedades físico-químicas do solo e portanto podem influenciar indiretamente a transformação do ingrediente ativo (i.a.). O tipo de formulação pode também afetar a volatilização e mobilidade e, conseqüentemente, modificar a quantidade de i. a. disponível para transformação.

Altas concentrações no solo pode tornar um produto biodegradável em persistente, por exemplo, alachlor na dose de 3,36 Kg i.a. /ha teve uma vida média de 2-4 semanas (Sharp 1988), entretanto em altas concentrações (100 a 1000 ppm) o produto é persistente (Junk *et al.* 1984; Felsot & Dzanor, 1990).

Há evidências que o tempo de residência do resíduo de um pesticida no solo influencia sua persistência. Quanto mais tempo após sua aplicação, mais resistente ele se torna para degradação (Bollag, 1992). Esta resistência pode ser resultado da redistribuição do herbicida de fracos para fortes sítios de ligação, ou da incorporação lenta do produto ao humus. Os complexos mais persistentes resultam de ligações covalentes do produto ao material químico.

Esses complexos, referidos frequentemente como resíduos ligados ou não extraíveis, são altamente resistentes à hidrólise ácida ou básica, tratamento térmico e à degradação microbiológica.

Por ser os microrganismos os responsáveis pela transformação dos herbicidas, aumento da população microbiana ou de sua atividade é esperada quando a degradação está ocorrendo. A estimativa do número dos microrganismos geralmente é realizada pela técnica de diluição e plaqueamento ou determinação da biomassa através da adição de substrato e fumigação, mais

detalhes sobre estes métodos podem ser encontrado em Turco & Konopka (1990).

Bactérias e fungos são considerados os principais responsáveis pela transformação dos herbicidas no solo. A contribuição da microfauna e microalgas do solo é incerta e tem recebido pouca atenção.

A população microbiana é mais abundante nas camadas mais superficiais do solo, diminuindo com a profundidade. Assim vários autores avaliando a degradação de pesticidas em várias profundidades observaram que a taxa de degradação diminuiu com a profundidade (Veeh *et al.*, 1996).

Estudo da degradação de ^{14}C -atrazina, em nossos laboratórios, em amostras de solo de 0-30, 30-50 e 50-60cm correspondentes aos horizontes A, AB, e B (Monteiro *et al.* 1995), mostrou comportamento semelhante nos três horizontes, com lento desprendimento de $^{14}\text{CO}_2$ até os 16 dias de incubação, aumentando em seguida. Aos 64 dias de incubação o desprendimento foi de 1,6, 1,3 e 0,9% nos horizontes A, AB, e B, respectivamente.

Sua dessorção, tanto no dia da aplicação como após 64 dias, foi alta, ficando ao redor de 27, 30 e 39% no tempo zero e 38, 44 e 35% aos 64 dias, nos horizontes A, AB e B, respectivamente. No mesmo período e horizontes os resíduos extraíveis com solventes foi de 38, 43 e 26% e de 41, 46 e 46%). Os resíduos não-extraíveis foi em média 11% no tempo zero e 20% aos 64 dias, havendo maior quantidade de ^{14}C nas frações de ácidos fúlvicos sendo que esta proporção foi maior aos 64 dias.

A degradação do herbicida ^{14}C -ametrina foi estudada por Costa (1992), em solo Areia Quartzosa (AQ) com adição de 1% de folhas de cana-de-açúcar, oriundas de talhões com aplicação de ametrina por três anos consecutivos e de talhões sem aplicação de herbicidas. A adição das folhas secas aumentou 12 a

13 vezes o desprendimento de $^{14}\text{CO}_2$, mostrando que a biodegradação de ametrina, ocorre, principalmente, por cometabolismo. A adição de solo rizosférico, das mesmas plantas e na mesma proporção, resultou em 3,5 e 1,7 vezes maior desprendimento de $^{14}\text{CO}_2$ do que no solo AQ sem adições, para o tratamento com solo rizosférico oriundo da cultura com tratamento prévio e sem tratamento, respectivamente (Fig. 1)

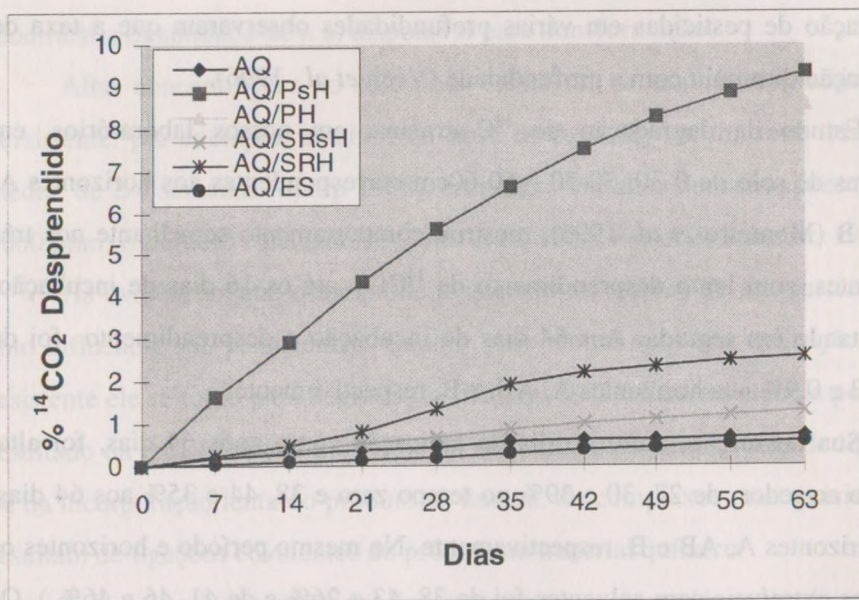


FIG. 1. Porcentagem de $^{14}\text{CO}_2$ desprendido em solo Areia Quartzosa (AQ), acrescido de folhas secas tratadas (PH) com o herbicida ametrina ou não (PsH), acrescido de solo rizosférico tratado (RH) ou não (RsH) e solo esterilizado (ES), durante 63 dias de incubação.

A atividade microbiana avaliada, aos 64 dias, pela técnica descrita por Casida *et al.* (1964), através da transformação de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio para 2,3,5-trifenilformazan, mostrou ser proporcional ao número de microrganismos avaliados pela técnica de diluição e plaqueamento

(Tabela 1). A presença de ametrina favoreceu a população de bactérias, enquanto que fungos e actinomicetos foram prejudicados. (Tabela 1)

Tabela 1. Número de microrganismos (unidades formadoras de colônias /g de solo) e atividade desidrogenase (mg hidrogênio/g de solo) de solo Areia Quartzosa (AQ), com adição de palha de cana tratadas (PH) ou não (PsH), acrescido de solo rizosférico tratado (RH) ou não (RsH) e solo esterilizado (ES), durante 63 dias de incubação.

Solo	Dia zero			64 dias			Atividade mgH/g
	Bx10 ⁵	Fx10 ⁴	Ax10 ³	Bx10 ⁵	Fx10 ⁴	Ax10 ³	
AQ	4	5	3	5,4	3,3	310	-
AQ/PsH	4	5	3	1300	930	3000	3,727
AQ/PH	4	5	3	600	50	42000	15,128
AQ/RsH	5	12	5	18000	2	0	-
AQ/RH	0,01	2	6	29	0,6	0	1,045
AQ/ES	0	0	0	36	0	0	0,629

Pouca atenção tem sido dada ao estudo da transformação em solos agrícolas sob condições de inundações. Entretanto os poucos resultados sugerem que condições de inundação podem aumentar a hidrólise, decloração redutiva e nitro-redução, mas a dehidrocloração e a quebra do anel é menos favorecida (Hill, 1978).

A degradação de ¹⁴C-propanil ensaiada em solos de várzeas da região de Piracicaba (SP) e de St.Maria (RS), utilizados para cultivo de arroz (Spessoto, 1996; Monteiro *et al.* 1996). Nos tratamentos com o solos inundados o desprendimento de ¹⁴CO₂, após 32 dias de incubação, foi menor que 1%, nos mesmos solos não-inundação o desprendimento foi de 4,6 e 8,5%, nos solos de Piracicaba e St.Maria, respectivamente. Observando o número de microrganismos, após 64 dias de incubação, nota-se que o número de bactérias

e actinomicetos diminuiu e o número de fungos aumentou. Portanto a presença de propanil favoreceu a população de fungos. (Tabela 2) A biomassa determinada pelo método de fumigação-extração (Vance *et al.* 1987), mostrou ser maior no solo de St. Maria e mais resistente, ocorrendo uma diminuição de cerca de 28% enquanto que o Solo de Piracicaba sofreu 58% da diminuição da biomassa no mesmo período, com relação ao solo não aplicado.(Tabela 2).

Tabela 2. Número de microrganismos (unidades formadoras de colônias/g solo) e biomassa microbiana ($\mu\text{gC/g}$ solo) de solos de várzeas. Média de 4 repetições.

Solo	Dia zero			Biomassa $\mu\text{gC/g}$ solo	64 dias			Biomassa $\mu\text{gC/g}$ solo
	$\text{B} \times 10^6$	$\text{F} \times 10^5$	$\text{A} \times 10^7$		$\text{B} \times 10^4$	$\text{F} \times 10^7$	$\text{A} \times 10^4$	
Piracicaba	4	5,7	2,0	238	7,7	1,2	5,7	94
Santa Maria	3	18,0	4,3	553	1,8	7,3	1,1	414

A maior degradação, o maior número de microrganismos e biomassa microbiana mais resistentes observados no solo de St. Maria, se deve provavelmente ao maior número de aplicações, durante sete anos seguidos, enquanto que no solo de Piracicaba, propanil foi aplicado por três anos seguidos e nos dois últimos anos não houve tratamento.

Referências bibliográficas

ALEXANDER M. Biodegradation of chemicals of environmental concern.

Science, v. 211, p.132, 1981.

BOLLAG, J. M. Decontaminating soil with enzymes. *Environmental Science and Technology*, v. 26, p.1876-1881, 1992.

COSTA, M. A. Biodegradação de ^{14}C -ametrina em areia quartzosa com adição de palha de cana e solo rizosférico. Piracicaba: CENA/USP, 1992. 107p. Dissertação Mestrado.

FELSOT, A.; DZANTOR, E.K. Enhancing biodegradation for detoxification of herbicide waste in soil. In: RACKE K. D.; COATS J.R., ed. *Enhanced Biodegradation of Pesticides in the Environment*, Washington: American Chemical Society, 1990. p.249-268. (ACS Symposium Series, 426).

HILL, I.R. Microbial transformation of pesticides. In: *Pesticide Microbiology: microbiological aspects of pesticide behaviour in the environment*. New York: Academic Press, 1978. p.137-185.

JUNK, G.A.; RICHARD, J.J.; DAHNN, P.A. In: *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*; Washington: American Chemical Society, 1994. p. 37-67. (ACS Symposium Series, 259).

KRUEGER, J. P.; BUTZ, R. G.; CORK, D. J. Use of Dicamba-degrading microorganisms to protect dicamba susceptible plant species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 39, p.1000-1003, 1991.

MONTEIRO, R.T.R.; DELGADO, D.; QUEIROZ, B.P.V. Degradação de ^{14}C -atrazina nos horizontes A, AB e B de um solo podzólico Vermelho-Amarelo Abrupto, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 25, Viçosa, 1995. *Resumos Expandidos*. Viçosa: UFV, 1995, v. 4, p. 2407-2409.

MONTEIRO, R.T.R.; SPESSOTO, A.M.; LEÃO, J.C. Enhanced biodegradation of the herbicide propanil in Brazilian soils. In: GAYLARDE, C.C.; SÁ, E.L.

S. de; GAYLARDE, P.M. *Latin American Biodegradation Symposim*, 2, Gramado, 1996. p. 15-18.

RACKE, K. D.; COATS, J. R. Enhanced biodegradation of insecticides in the midwestern corn soils. In: RACKE, K.D.; COATS, J.R. *Enhanced Biodegradation of Pesticides in the Environment*. Washington, DC: American Society, 1990. p.68-81. (ACS Symposium Series, 426).

SPESSOTO, A.M. Biodegradação do herbicida ^{14}C -propanil em solos secos e alagados. Piracicaba: CENA/USP, 1996. 103p. Dissertação de mestrado.

SHARP, D.D. In: KEARNEY, P.C.; KAUFMAN, D.D., ed. *Herbicides: chemistry, degradation and Mode of Action*. New York: Marcel Dekker, 1988. p.301-333.

TURCO, R.F.; KONOPKA, A.E.. Response of microbial populations to carbofuran in soils enhanced for its degradation. In: RACKE, K.D.; COATS, J. R., ed. *Enhanced biodegradation of Pesticides in the Environment*, Washington: American Chemical Society, 1990. p.153-166. (ACS Symposium Series, 426).

VANCE, E.D.; BROOKS, P.C. ; JENKINSON, D.S. III. An extraction method for measuring soil biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.19, p.703-707, 1987.

VEEH, R.H., INSKEEP, W.P., CAMPER, A.K. Soil depth and temperature effects on microbial degradation of 2,4-D. *Journal of Environmental Quality*, v.25, p.5-11, 1996.

DISTRIBUIÇÃO DE TRIAZINAS EM DIFERENTES SOLOS BRASILEIROS

Prof. Tomaz Langenbach; Inst. de Microbiologia Prof. P. de Góes, UFRJ, RJ, Brasil

A globalização da política de harmonização de registro está sendo impulsionada pela indústria química com o intuito de reduzir custos. De fato dados toxicológicos podem ser intercambiados entre países diferentes enquanto outros aspectos envolvidos no registro como fauna e flora precisam de pesquisa regionalizada. A distribuição e degradação dos pesticidas no solo permanece uma questão aberta em que medida há necessidade de pesquisa regional devido a solos e clima distintos. Muita literatura está disponível sobre este assunto, porém as metodologias empregadas têm sido muito variadas dificultando comparações. Com o objetivo de superar esta dificuldade foi desenvolvido um sistema de microcosmo novo que será utilizado em condições padronizadas em alguns países distintos organizados numa rede.

O sistema de microcosmo consiste: de uma coluna de solo estruturado onde foi aplicado 14C-terbutilazina (herbicida do grupo das triazinas) em concentração agrônômica com simulação de chuva (60mm/mês); captura do lixiviado, captura dos produtos voláteis em armadilhas químicas e por fim do 14C-CO₂ na última armadilha. Periodicamente coleta-se amostras de lixiviado, voláteis e CO₂, que são medidas no cintilador. Três solos brasileiros foram escolhidos contendo o predomínio respectivamente de areia, argila e matéria orgânica. Com o baixo índice pluviométrico a lixiviação ficou abaixo de 1%. A volatilização mais alta foi observada em solos arenosos com 1,5%. A

mineralização em 2 meses foi abaixo de 0.14% e guarda uma correlação com o aumento da matéria orgânica. Em solos com alto teor de matéria orgânica (9.7%) a capacidade de absorção é o fator que se sobrepõe apresentando taxas de mineralização mais baixas. Nestas condições experimentais há uma concentração de terbutilazina nos 2-3cm superficiais do solo com valores bastante baixos nas camadas mais profundas. Solos ricos em matéria orgânica mostram que a retenção no 1 cm superficial é de 90% e do solo arenoso chega a 60%. Estes resultados enfatizam a importância da matéria orgânica na retenção de pesticidas reduzindo a lixiviação, runoff protegendo assim a qualidade das águas de superfície como os rios e lagos e as subterrâneas. Esta observação pode orientar práticas agrícolas que preservem nossos diferentes corpos d'água da poluição maciça com pesticidas.

Alguns dos dados observados em solos brasileiros encontram grande similaridade em experimentos realizados na Alemanha, China e Espanha, porém necessita-se um acervo grande de dados para conclusões seguras.

Apoio financeiro: CNPq-IBAMA-DLR, FUJB.

BIODEGRADAÇÃO DE CAFEÍNA

Paulo Mazzafera, Departamento de Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, CP6109, Unicamp, CEP 13083-970, Campinas, SP

Introdução

Ampla revisão sobre a utilização de purinas e compostos derivados como fonte de energia (carbono e nitrogênio) por microrganismos foi feita por Vogels & van der Drift (1976). Até então, apenas um trabalho mostrava a degradação de cafeína por uma bactéria. Nele, Woolfolk (1975) isolou uma linhagem de *Pseudomonas putida* enriquecendo o meio de cultura com cafeína. Após várias transferências, os isolados, identificados todos como *P. putida*, passaram a ser cultivados em meio sólido contendo apenas cafeína (0,1%) como única fonte de carbono e nitrogênio. Máximo crescimento foi obtido com cafeína a 0,5%. Os isolados também cresciam em qualquer di ou monometilxantinas derivadas de cafeína.

Posteriormente, Blecher & Lingens (1977) obtiveram vários isolados bacterianos a partir de solo, sendo todos identificados como *P. putida*. O melhor crescimento obtido foi com 0.35% de cafeína no meio e, em 0.55%, o crescimento era totalmente inibido. Para o isolamento, 300g de solo foram misturados com 0,5g de cafeína e mantidos a 30°C por 6 meses. Desse solo foram tomadas amostras para o isolamento. Quando o mesmo solo foi incubado com cafeína por apenas uma semana, ao invés de 6 meses, outras bactérias além de *Pseudomonas* eram observadas, confirmando a seletividade de cafeína em incubações por longo tempo.

De modo semelhante, Glück & Lingens (1987), Middelhoven & Bakker (1982) e Asano *et al.* (1983) obtiveram, a partir de solo, isolados *P. putida* apresentando capacidade para degradar cafeína. No isolamento também foi usado o enriquecimento do meio com cafeína. Os isolados de Glück & Lingens (1987) e Asano *et al.* (1983) cresceram em 2% de cafeína e o de Middelhoven & Bakker (1982) em 0,5%.

Vários isolados bacterianos degradando cafeína foram isolados por Yamaoka-Yano & Mazzafera (1995) a partir de solo cultivado com café. Além de *P. putida* e *Pseudomonas fluorescens*, foram isoladas *Acinetobacter* spp, *Moraxella* spp, *Flavobacterium* spp. e uma bactéria corineforme. Os isolados de *P. putida* foram os que apresentaram maior capacidade em crescer em meio contendo exclusivamente cafeína como fonte de carbono e nitrogênio. Crescimento de alguns isolados de *P. putida* foi observado em até 5% de cafeína em meio sólido. Nesta concentração cafeína cristalizava no meio, tornando-o opaco, e a medida que havia o crescimento, no local de crescimento o meio voltava a ficar translúcido. Além de cafeína, vários desses isolados apresentaram capacidade para degradar outras metilxantinas e compostos relacionados, tal como teobromina, teofilina, hipoxantina, xantina e ácido úrico.

A explicação mais provável para a grande capacidade em degradar cafeína pelos isolados de *P. putida* obtidos por Yamaoka-Yano & Mazzafera (1995) é o fato de ter sido usado solo coletado sob plantas de café para o isolamento. Como não foi feito enriquecimento, isto mostra a adaptação das bactérias do solo em aproveitar a cafeína proveniente do cafeeiro como fonte de energia. Anteriormente, Mazzafera *et al.* (1995) também obtiveram de solo cultivado com café um isolado de *Serratia marcescens*, apenas ressuspensando amostras do solo

em água, com posterior semeadura em meio sólido contendo cafeína como única fonte de carbono e nitrogênio.

É interessante notar, no entanto, a natureza indutiva da capacidade de degradação da cafeína por *P. putida*. Woolfolk (1976) observou que quando células de *P. putida* crescidas em meio contendo xantina, ao invés de cafeína, eram usadas como inóculo em meio contendo cafeína, havia atraso no crescimento. O mesmo foi posteriormente observado por Blecher & Lingens (1977), quando o inóculo foi crescido em xantina e ácido úrico. Porém, o crescimento era normal quando o inóculo foi preparado com 7-metilxantina e teobromina. Semelhantemente, quando o isolado L de *P. putida* obtido por Yamaoka-Yano & Mazzafera (1995) foi crescido em meio rico em nutrientes (Luria-Broth - LB) e usado como inóculo em meio contendo apenas cafeína (M9), também houve um atraso no crescimento e na degradação de cafeína, quando comparado com inóculo produzido em meio com cafeína. Portanto, a degradação de cafeína nessas bactérias parece ser induzida pelo próprio alcalóide.

A via de degradação de cafeína em bactérias

Dikstein *et al.* (1957) e Bergmann *et al.* (1964) detectaram em linhagens de *Pseudomonas* a presença de uma desidrogenase capaz de oxidar 3-metilxantina, mas não 1-metilxantina.

No trabalho de Woolfolk (1975), o isolado de *P. putida* também crescia em qualquer di ou monometilxantinas derivadas de cafeína. Usando células intactas ou extratos protéicos livres de células o autor concluiu que cafeína teria os radicais metil removidos hidroliticamente, com a formação sequencial de di- e monometilxantinas, e em seguida, xantina. esta seria então degradada a ácido

úrico por xantina desidrogenase, entrando na via normal do metabolismo de purinas. Woolfolk (1975) sugeriu que uma desidrogenase, provavelmente xantina desidrogenase, era capaz de oxidar 1 e 3-metilxantina a seus respectivos ácidos metilúricos. O autor também descreve a produção de metanol no processo, que seria provavelmente oxidado a CO_2 .

No caso de *S. marcescens* (Mazzafera *et al.*, 1995), através de eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante, observou-se atividade de xantina oxidase contra cafeína, dimetilxantinas e monometilxantinas. Os isolados L e 21 de *P. putida* obtidos por Yamaoka-Yano & Mazzafera (1995) também apresentaram atividade de xantina oxidase contra cafeína e outras metilxantinas, indicando que além da retirada sequencial dos grupamentos metil, pode haver a formação de ácidos metilúricos (Yamaoka-Yano & Mazzafera, dados não publicados).

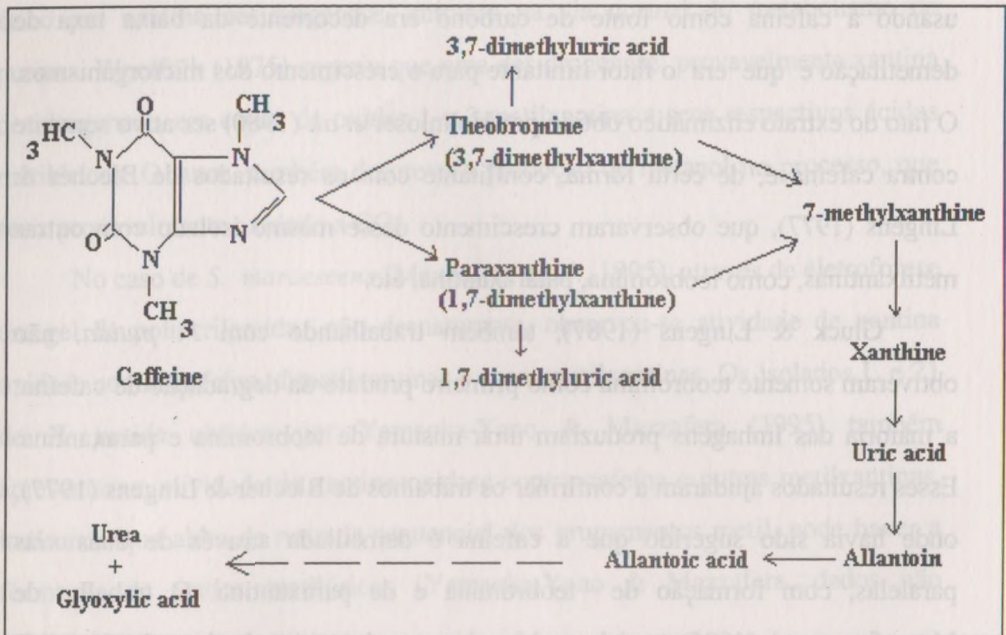
A degradação da cafeína sob efeito de concentração de oxigênio foi analisada por Middlhoven & Bakker (1982) em *P. putida*, concluindo que a primeira etapa enzimática resultava numa remoção sucessiva dos três grupos metil da molécula de cafeína, reações provavelmente catalizadas por monooxigenases.

Aspectos enzimológicos da demetilação da cafeína em uma linhagem mutante de *P. putida* identificada por Blecher & Lingens (1977) foram investigados por Hohnloser *et al.* (1980). Usando cafeína como substrato, e NADPH e o íon cobalto como cofatores, observaram somente a produção de teobromina, indicando que havia um só sistema de enzima que demetilava a cafeína. Utilizando outras xantinas metiladas (paraxantina, teobromina e 7-metilxantina) no lugar de cafeína não observou-se nenhuma atividade. Os resultados sugeriram que o crescimento pobre das bactérias no meio de cultura

usando a cafeína como fonte de carbono era decorrente da baixa taxa de demetilação e que era o fator limitante para o crescimento dos microrganismos. O fato do extrato enzimático obtido por Hohnloser *et al.* (1980) ser ativo somente contra cafeína é, de certa forma, conflitante com os resultados de Blecher & Lingens (1977), que observaram crescimento desse mesmo isolado com outras metilxantinas, como teobromina, paraxantina, etc.

Gluck & Lingens (1987), também trabalhando com *P. putida*, não obtiveram somente teobromina como primeiro produto da degradação de cafeína; a maioria das linhagens produzia uma mistura de teobromina e paraxantina. Esses resultados ajudaram a confirmar os trabalhos de Blecher & Lingens (1977), onde havia sido sugerido que a cafeína é demetilada através de duas vias paralelas, com formação de teobromina e de paraxantina. O trabalho de Mazzafera *et al.* (1995) também evidencia estas duas vias de degradação em *S. marcescens*. Posterior a estes compostos havia formação de 7-metilxantina e xantina.

De acordo com os trabalhos citados acima a via de degradação de cafeína em *P. putida* poderia ser esquematizada como indicado na figura abaixo. Porém, uma vez que a conclusão de tais trabalhos foram obtidas com base no fornecimento de diferentes compostos seguida da constatação do crescimento da bactéria ou não, ensaios com cafeína marcada são necessários para sua total confirmação.



Aplicações tecnológicas de bactérias degradadoras de cafeína

Asano *et al.* (1993) mostraram a possibilidade de se utilizar uma bactéria para a produção de derivados de cafeína. Eles selecionaram uma linhagem de *P. putida* que quando crescida na presença de cafeína e Zn^{2+} , levava ao acúmulo de teobromina. Estudos sobre a atividade da enzima envolvida mostraram que uma monooxigenase responsável pela demetilação de teobromina à 7-metilxantina era inibida por este íon (Asano *et al.*, 1994). Cafeína era degradada por esta mesma enzima, mas também por uma outra, denominada cafeína demetilase. A grande vantagem da inibição de teobromina demetilase por Zn^{2+} é o fato de que 92% da cafeína era recuperada como teobromina, e como esta é pouco solúvel, a maioria precipitava no meio de cultivo, sendo relativamente fácil sua purificação.

No fruto seco do café, perto de 60% do peso corresponde à casca, que é retirada no beneficiamento. Assim, para cada saco de café de 60kg, são produzidos 150kg de palha. Em volume, para cada saco de café correspondem, aproximadamente, 7,5 sacos de palha. O maior uso da palha de café tem sido sua aplicação na lavoura. No entanto, o seu grande volume dificulta não só o seu armazenamento como também sua distribuição na lavoura, ou melhor, para corresponder a poucos quilogramas de esterco animal, são necessários muitos de palha, tornando inviável sua incorporação ao solo da cultura, a maneira mais recomendada da palha para a aplicação de adubo orgânico na cultura do café. Assim, apenas parte da palha retorna à lavoura, sendo o resto descartado.

Entretanto, tem sido mostrado que a palha do café, tem bom valor nutricional, principalmente no teor de proteínas e na quantidade de potássio, podendo ser utilizada como alimento animal (Bressani, 1987a). No entanto, taninos e cafeína limitam o seu uso para este fim, afetando a palatabilidade, assimilação do nitrogênio protéico e influenciando a fisiologia dos animais testados (Bressani, 1987b). O tipo de reação de cada animal à palha de café varia de acordo com a espécie.

Recentemente, estudos realizados por Menezes *et al.* (1993) mostraram que uma linhagem de *Lactobacillus plantarum* era capaz de degradar perto de 90% do tanino encontrado na polpa retirada de frutos ainda não secos de café.

Devido a alta capacidade do isolado L de *P. putida* em degradar cafeína, Mazzafera & Yamaoka-Yano (dados não publicados) realizaram ensaios para averiguar a possibilidade do seu emprego na descafeinação da palha de café, para uso na alimentação animal. Guardando certas proporções entre o volume do inóculo de uma cultura em fase de crescimento exponencial e palha seca de café,

após 96h da inoculação observou-se redução de 40% da cafeína inicial. Períodos mais prolongados propiciavam o crescimento não controlado de outros microrganismos, principalmente fungos, uma vez que o material não era estéril. A aplicação conjunta das técnicas de destanização e descafeinação da palha de café vem sendo feita, e prevê-se que em um curto espaço de tempo serão iniciados os testes com animais de laboratório.

Em termos econômicos, talvez a maior aplicação das bactérias degradadoras de cafeína seria na transferência dessa característica para o cafeeiro, ou melhor, acelerar a degradação de cafeína. Sabe-se que desde o início da década de 70 o consumo de café descafeinado vem aumentando, sendo que atualmente mais de 25% do café comercializado no mundo é destinado à descafeinação. A propaganda contra a cafeína é tão grande, que a simples conversão à teobromina (um diurético) retiraria o café da lista negra de muitos médicos e adeptos de certo extremismo.

No entanto, os problemas para tal não são restritos ao isolamento do(s) gene(s) envolvido(s) na degração de cafeína, mas também na obtenção de cafeeiros transgênicos, o que teve início a pelo menos 6 anos atrás. Até o momento, apesar de vários esforços, plantas transformadas, ou com *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes* e por bombardeamento de partículas, têm mostrado expressão transiente de GUS. Além disso, na maioria dos casos as plantas não se desenvolveram.

Referências bibliográficas

- ASANO, Y.; KOMEDA, T.; YAMADA, H. Microbial production of theobromine from caffeine. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, Tokyo, v.57, p.1286-1289, 1993.
- ASANO, Y.; KOMEDA, T.; YAMADA, H. Enzymes involved in theobromine production from caffeine by *Pseudomonas putida*. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, Tokyo, v.58, p.2303-2304, 1994.
- BERGMANN, F.; UNGAR-WARON, H.; KWIETNY-GOVRIN, H. Action of 8-azaguanine and 8-azaxanthine on *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical Journal*, Liverpool, v.91, p.270-276, 1964.
- BLECHER, R.; LINGENS, F. The metabolism of caffeine by a *Pseudomonas putida* strain. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologie und Chemie*, Strassburg, v.358, p.807-817, 1977.
- BRESSANI, R. Potential uses of coffee berry by-products.. In: BRAHAN, J.E.; BRESSANI, R. ed. *Coffee pulp: composition, technology, and utilization*. [s.l.]: Institute of Nutrition of Central America and Panama, 1987a. p.17-25
- BRESSANI, R. Antiphiysiological factors in coffee pulp. In: In: BRAHAN, J.E.; BRESSANI, R. ed. *Coffee pulp: composition, technology, and utilization*. [s.l.]: Institute of Nutrition of Central America and Panama, 1987b. p.83-88.
- DIKSTEIN, S.; BERGMANN, F.; HENIS, Y. Studies on uric acid and related compounds. IV. The specificity of bacterial xanthine oxidases. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v.224, p.67-77, 1957.
- GLUCK, M.; LINGENS, F. Studies on the microbial production of theobromine and heteroxanthine from caffeine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Heidelberg, v.25, p.334-340, 1987.
- HOHNLOSER, W.; OSSWALD, B.; LINGENS, F. Enzymological aspects of caffeine demethylation and formaldehyde oxidation by *Pseudomonas putida*

- C1. Hoppe-Seyler's *Zeitschrift fur Physiologie und Chemie*, Strassburg, v.361, p.1763-1766, 1980.
- MAZZAFERA, P.; OLSSON, O.; SANDBERG, G. Degradation of caffeine and related methylxanthines by *Serratia marcescens* isolated from soil under coffee cultivation. *Microbial Ecology*, v.31, p.199-207, 1996.
- MENEZES, H.C.; SAMAAN, F.S.; CLIFFORD, M.N.; ADAMS, M.R. The fermentation of fresh coffee pulp for use in animal feed. In: COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LA CHIMIE DU CAFÉ, 15., 1993, Montpellier. *Resumos*. Montpellier: Association Scientifique International du Café, 1993. p.858-860.
- MIDDELHOVEN, W.J.; BAKKER, C.M. Degradation of caffeine by immobilized cells of *Pseudomonas putida* strain C3024. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, Heidelberg, v.15, p.214-217, 1982.
- VOGELS, G.D.; van der DRIFT, C. Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. *Bacteriological Review*, Baltimore, v.40, p.403-468, 1976.
- WOOLFOLK, C.A. Metabolism of N-methylpurines by a *Pseudomonas putida* strain isolated by enrichment on the caffeine as sole source of carbon and nitrogen. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, v.123, p.1088-1106, 1975.
- YAMAOKA-YANO, D.M.; MAZZAFERA, P. Degradation of caffeine by *Pseudomonas* and other bacteria isolated from soil. Manuscript (submitted to Journal of Allelopathy, 1995.)

PLÁSTICO BÍODEGRADÁVEL DE ORIGEM BACTERIANA

Celso Lellis Bueno Neto, Agrupamento de Biotecnologia da Divisão de Química, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S/A. IPT - Cidade Universitária "Armando Salles Oliveira", Caixa Postal 7141, CEP 01064-900 - São Paulo, SP

O texto que segue foi em grande parte transcrito da Tese de Mestrado do Biólogo José Gregório Cabrera Gomez "Isolamento e Caracterização de Bactérias Produtoras de Polihidroxialcanoatos" - 1994.

1. Plásticos Biodegradáveis a partir de Polihidroxialcanoatos (PHAs)

Os plásticos representam um papel fundamental na sociedade moderna, apresentando-se de múltiplas formas. Partes destas formas de apresentação são de descartabilidade muito rápida. Sabendo-se que os plásticos são degradados muito lentamente, eles representam um sério problema ambiental. Para se ter uma idéia do alcance deste problema, basta lembrar que somente na cidade de São Paulo produz-se diariamente 12 mil toneladas de lixo, das quais mais de 1.300 toneladas correspondem a materiais plásticos que demoram de 50 a 60 anos para se degradarem.

Uma contribuição para a solução deste problema seria a produção de plásticos biodegradáveis, materiais que reúnem, além das características dos plásticos, que os tornaram indispensáveis à sociedade moderna, a propriedade de serem degradados pela ação de organismos vivos, quando descartados no

ambiente. Neste aspecto, destacam-se os PHAs por serem materiais termoplásticos, biodegradáveis, biocompatíveis e possíveis de serem produzidos a partir de matérias-primas renováveis.

2. Polihidroxialcanoatos: características e aplicações

Polihidroxialcanoatos (PHAs) são ésteres poliméricos cuja fórmula estrutural está representada na Fig. 1. O Radical "R" (Fig. 1) pode ser um simples átomo de hidrogênio, ou uma cadeia contendo até 11 carbonos; a cadeia de carbonos pode conter insaturações, ramificações ou mesmo átomos como bromo, flúor ou cloro; cadeias cíclicas e mesmo grupos aromáticos também foram detectados (Doi, 1990; Steinbüchel, 1991a; Steinbüchel, 1991b), (Tabela 1).

PHAs já foram detectados tanto em organismos procarióticos como eucarióticos. Poli- β -hidroxibutirato (PHB - um homopolímero do ácido 3-hidroxibutírico) foi o primeiro PHA.

3. Metabolismo de PHAs e estratégia de desenvolvimento de processo fermentativo

A concepção de um processo industrial de produção de PHAs deve assegurar aos microrganismos as condições para que sua atividade metabólica seja orientada na direção exigida pelo processo. Para que isto seja possível é necessário que se conheça as vias metabólicas envolvidas na síntese do produto desejado e, a partir delas, conceber uma estratégia de produção adequada.

3.1. Síntese de PHB

A via metabólica mais estudada de produção de PHB é aquela encontrada em *A. eutrophus* (Fig. 2), e que também está presente em várias outras bactérias (Steinbüchel, 1991a).

Para a síntese de PHB a partir de acetil-CoA são necessárias três enzimas. β -cetotiolase catalisa a condensação de duas moléculas de acetil-CoA, formando uma molécula de acetoacetil-CoA, esta por sua vez é reduzida a D(-)-3-hidroxiacetil-CoA numa reação estereoespecífica catalisada pela enzima 3-cetoacetil-CoA redutase NADPH dependente, o último passo compreende a polimerização da unidade D(-)-3-hidroxiacetil-CoA a um polímero em crescimento, numa reação catalisada pela enzima PHA síntase (Fig. 2).

A enzima chave para regulação desta via metabólica é a β -cetotiolase. Em condições balanceadas de crescimento, onde todos os nutrientes necessários à multiplicação celular estão disponíveis, espera-se que os níveis de CoA livre sejam altos, devido a grande demanda por grupos acetil pelo ciclo de Krebs para formação de esqueletos carbônicos e energia. Segundo alguns autores, CoA livre tem efeito inibitório sobre a enzima β -cetotiolase, impedindo deste modo a síntese de PHB. Quando algum nutriente se torna limitante à multiplicação da bactéria, a demanda por acetil diminui e com isso os níveis de CoA livre se tornam reduzidos, diminuindo a inibição sobre β -cetotiolase e desencadeando a síntese de PHB (Steinbüchel, 1991a).

3.2. Síntese de P (3HB-co-3HV)

A via metabólica de síntese do copolímero P(3HB-co-3HV) realizada por *A. eutrophus* a partir de ácido propiônico é apresentada na Fig. 3. O primeiro passo consiste na formação de propionil-CoA, a partir do ácido propiônico e CoA livre (CoASH), em uma reação catalisada pela enzima acil-CoA sintetase (Slater *et al.*, 1992). A enzima β -cetotiolase não catalisa apenas a condensação de duas moléculas acetil-CoA, mas também pode catalisar a condensação de uma molécula propionil-CoA e uma molécula acetil-CoA, formando, assim, 3-cetovaleril-CoA. A enzima 3-cetoacil-CoA redutase NADPH dependente também não é tão específica e pode catalisar a redução de 3-cetovaleril-CoA a D (-)-3-hidroxisovaleril-CoA. As unidades D (-)-3-hidroxisovaleril também funcionam como substrato para ação da enzima *PHA sintase*, embora esta enzima tenha atividade específica muito maior com unidade D(-)-3-hidroxisobutiril-CoA em *A. eutrophus*. Haywood e colaboradores demonstraram que *in vitro* a atividade da enzima *PHA sintase* de *A. eutrophus* para monômeros de D(-)-3-hidroxisovaleril-CoA corresponde a apenas 7,5% da atividade desta mesma enzima para monômeros D(-)-3-hidroxisobutiril-CoA (Haywood *et al.*, 1989b).

Se ácido propiônico é fornecido a *A. eutrophus* como única fonte de carbono o polímero produzido conterá cerca de 45 mol% de unidades 3HV (Anderson & Dawes, 1990). Se de modo otimista assumirmos que um polímero contendo 50 mol% de unidades 3HV pudesse ser formado, isto implicaria que pelo menos $\frac{3}{4}$ do ácido propiônico fornecido foi de algum modo convertido a acetil-CoA ($\frac{1}{4}$ se condensa com propionil-CoA para formar unidades 3HV e $\frac{2}{4}$ se condensam entre si para formar unidades 3HB). A observação que uma

importante parcela do ácido propiônico fornecido é drenado para a formação de energia ou para síntese de unidades 3HB é de grande importância sob o ponto de vista industrial, uma vez que ácido propiônico é um substrato relativamente caro para a produção de PHAs.

4. Bases para Concepção de um Processo Fermentativo para Produção de PHAs

Estas características do metabolismo de bactérias produtoras de PHAs constituem o ponto de partida para o estabelecimento de uma estratégia de desenvolvimento do processo. Trata-se de um sistema que deve ocorrer em duas fases distintas. Em uma primeira fase deve-se favorecer o crescimento celular atingindo concentrações celulares as mais altas possíveis e ao mesmo tempo assegurar que a síntese do produto seja a menor possível. Inversamente, na segunda fase do processo deve-se bloquear o crescimento celular, e fazer com as células acumulem o máximo possível de produto.

Para que a primeira fase ocorra como o descrito acima é necessário fazer com que o nível de CoA livre seja elevado e para tanto, o meio de cultivo deve ser adequadamente balanceado, tanto no que diz respeito a fonte de carbono como à oferta de macro e micro-nutrientes. Também os teores de oxigênio dissolvido devem ser suficientemente elevados, para que as reações envolvidas na cadeia respiratória possam ocorrer, permitindo a regeneração de NAD^+ a partir de NADH. No entanto, a oferta de substrato (fonte de carbono), não pode ser muito elevada pois podem ser desencadeados efeitos inibitórios por excesso de substrato. Mais ainda, qualquer desbalanceamento nas concentrações de substrato, nutrientes e oxigênio dissolvido pode desencadear a síntese de PHAs

o que, nesta fase, deve ser evitado. Finalmente, estas concentrações além de balanceadas, devem ser proporcionais à concentração celular, descoberto. PHB foi detectado inicialmente em bactérias na forma de grânulos citoplasmáticos que podem representar até cerca de 89% da massa seca celular. PHB também foi detectado como um componente estrutural da membrana citoplasmática de bactérias, plantas e animais.

O acúmulo de PHAs na forma de grânulos geralmente ocorre quando existe um excesso da fonte de carbono e limitação de pelo menos um nutriente essencial à multiplicação da bactéria. Por isso, a principal função atribuída a esses materiais é a de reserva de carbono e energia. Também é mencionado que PHAs poderiam funcionar como armazenadores de equivalentes redutores, permitindo a reciclagem de NAD (P) H. Além destas funções, tem sido mencionado que PHAs aumentariam a resistência da bactéria sob diferentes condições estressantes como: pressão osmótica, dessecação e irradiação por UV. A mobilização de PHAs fornece ainda uma fonte de carbono e energia para formação de endósporos de *Bacillus* e para o encistamento de *Azotobacter* (Steinbüchel, 1991a).

Em termos industriais, é importante lembrar que a grande maioria dos PHAs é pouco conhecida, pelo menos com relação às suas propriedades físicas e mecânicas e mesmo com relação a aspectos de sua produção em escala industrial. Entretanto, homopolímeros de 3HB (ácido 3-hidroxiбутírico) ou copolímeros de 3HB e 3HV (ácido 3-hidroxi-valérico) foram largamente estudados com relação às suas propriedades físicas e mecânicas; sendo produzidos na Europa em escala industrial (Byrom, 1990; Steinbüchel, 1991a) e utilizados na confecção de embalagens de pelo menos dois produtos comercializados na Alemanha (Steinbüchel, comunicação pessoal).

A principal aplicação industrial de PHAs está associada às propriedades termoplásticas deste polímero, bem como à sua biodegradabilidade. Outro aspecto que desperta o interesse sobre estes materiais diz respeito ao grande número de monômeros encontrados como constituintes de PHAs (Tabela 1), que indicam que poliésteres com várias composições diferentes podem ser produzidos por bactérias. Espera-se que estes diferentes PHAs possuam características físicas e mecânicas diversificadas (Doi, 1990).

Um exemplo que indica nessa direção são os copolímeros de P(3HB-co-3HV). O homopolímero de 3HB apresenta propriedades muito boas, mas é duro e quebradiço, o que limita suas aplicações. Entretanto, a incorporação de quantidades crescentes de unidades de 3HV permite aumentar gradativamente a maleabilidade e a resistência do polímero, permitindo obter poliésteres com características diferentes, variando-se apenas a quantidade de unidades de 3HV (Holmes, 1985), que na fase de crescimento, deve variar de aproximadamente 1g/l até 60-70 g/l.

Na segunda fase do processo é necessário impor ao sistema uma limitação nutricional para impedir que o consumo da fonte de carbono seja totalmente drenado para a síntese de estruturas celulares e obtenção de energia. Com este procedimento a síntese de PHAs é desencadeada pois os níveis de CoA livre diminuem devido ao excesso de fonte de carbono associado à carência de nutrientes, notadamente, à limitação em nitrogênio e/ou fósforo. Esta fase tem também uma segunda exigência importante que diz respeito à fonte de carbono. Como mostrado anteriormente, para que a síntese do copolímero PHB/HV ocorra, é necessário que a via de metabolização da fonte de carbono passe não só pela síntese de acetil-CoA mas também de propionil-CoA. Isto é possível por uma dupla oferta de substratos, no caso, hexoses e

ácido propiônico. Na fase de acúmulo não só a taxa de alimentação deve ser controlada de forma a minimizar os fenômenos de inibição, como também a razão entre as concentrações dos açúcares e o ácido proiônico deve obedecer uma relação adequada, de forma a garantir que a composição do produto seja a desejada, notadamente no que diz respeito ao teor de unidades de hidroxivalerato incorporadas à cadeia polimérica. Estas características da fase de acúmulo do processo exigem uma segunda estratégia de condução do processo totalmente diferente daquela da primeira fase.

Referências bibliográficas

- ANDERSON, A.; DAWES, E. Microbiological Review, v. 54, p.450-472, 1990.
- DOI, Y *et al.* FEMS Microbiology Letters, v.67, p.165-170, 1990.
- HAYWOOD, G. *et al* FEMS Microbiology Letters, v.57, p.1-6, 1989b.
- HOLMES, P. Physies and Technology, v.16, p.32-36, 1985.
- STEINBÜCHEL, A. Biomaterials, N.Y.. Macmillan Prees, p.123-213.
- STEINBÜCHEL, A. Acta Biotechnologica, v.11, p.419-427, 1991b.

Tabela 1. Alguns monômeros detectados em PHAs.

MONÔMEROS	R*	REFERÊNCIAS
ÁCIDO 3-HIDROXIPROPIONICO	-H	DOI TE AL., 1990B
ÁCIDO 3-HIDROXIBUTÍRICO	-CH ₃	LEMAIGE, 1926
ÁCIDO 3-HIDROXIVALÉRICO	-CH ₂ CH ₃	WALLEN & ROHWEDDER, 1
ÁCIDO 4-HIDROXIBUTÍRIO	-H	KUNLOKA ET AL., 1988
ÁCIDO 4-HIDROXIVALÉRICO	-CH ₃	VALENTIN ET AL., 1992
ÁCIDO 5-HIDROXIVALÉRICO	-H	DOL ET AL., 1990B
ÁCIDO 3-HIDROXI-2-BUTENÓICO	-CH ₃	DAVIS, 1964
ÁCIDO 3-HIDROXI-4-PENTENÓICO	-CH=CH ₂	LENZ ET AL., 1990
ÁCIDO 3-HIDROXIHEXANÓICO	-(CH ₂) ₂ -CH ₃	LAGEVEEN ET AL., 1988
ÁCIDO 3-HIDROXIHEPTANÓICO	-(CH ₂) ₃ -CH ₃	LAGEVEEN ET AL., 1988
ÁCIDO 3-HIDROXIOCTANÓICO	-(CH ₂) ₄ -CH ₃	DE SMET ET AL., 1983
ÁCIDO 3-HIDROXINONANÓICO	-(CH ₂) ₅ -CH ₃	LAGEVEEN ET AL., 1988
ÁCIDO 3-HIDROXIDECANÓICO	-(CH ₂) ₆ -CH ₃	LAGEVEEN ET AL., 1988
ÁCIDO 3-HIDROXIUNDECANÓICO	-(CH ₂) ₇ -CH ₃	LAGEVEEN ET AL., 1988
ÁCIDO 3-HIDROXIDODECANÓICO	-(CH ₂) ₈ -CH ₃	LAGEVEEN ET AL., 1988
ÁCIDO 3-HIDROXI-4-HEXANÓICO	-CH=CH-CH ₃	FRITZSCHE ET AL., 1990A
ÁCIDO 3-HIDROXI-5-HEXANÓICO	-CH ₂ -CH=CH ₂	FRITZSCHE ET AL., 1990A
ÁCIDO 3-HIDROXI-6-OCTANÓICO	-(CH ₂) ₂ -CH=CH-CH ₃	FRITZSCHE ET AL., 1990A
ÁCIDO 3-HIDROXI-7-OCTANÓICO	-(CH ₂) ₃ -CH=CH ₂	LAGEVEEN ET AL., 1988
ÁCIDO 3-HIDROXI-8-NONANÓICO	-(CH ₂) ₄ -CH=CH ₂	LAGEVEEN ET AL., 1988
ÁCIDO 3-HIDROXI-9-DECANÓICO	-(CH ₂) ₅ -CH=CH ₂	LAGEVEEN ET AL., 1988
ÁCIDO 3-HIDROXI-5-DODECANÓICO	-CH ₂ -CH=CH-(CH ₂) ₅ -CH ₃	HULBERTS ET AL., 1992
ÁCIDO 3-HIDROXI-6-DODECANÓICO	-(CH ₂) ₂ -CH=CH-(CH ₂) ₄ -CH ₃	EGGINK ET AL., 1990
ÁCIDO 3-HIDROXI-7-TETRADECANÓICO	-(CH ₂) ₃ -CH=CH-(CH ₂) ₅ -CH ₃	HULBERTS ET AL., 1992
ÁCIDO 3-HIDROXI-5,8-TETRADECADIENÓICO	-(CH ₂ -CH=CH) ₂ -(CH ₂) ₄ -CH ₃	EGGINK ET AL., 1990
ÁCIDO 3-HIDROXI-6-BROMO-HEXANÓICO	-(CH ₂) ₃ -Br	LENZ ET AL., 1990
ÁCIDO 3-HIDROXI-8-BROMO OCTANÓICO	-(CH ₂) ₆ -Br	LENZ ET AL., 1990
ÁCIDO 3-HIDROXI-11-BROMO-UNDECANÓICO	-(CH ₂) ₈ -Br	LENZ ET AL., 1990
ÁCIDO 3-HIDROXI-7-FLÚOR-HEPTANÓICO	-(CH ₂) ₄ -FL	DOL, 1990
ÁCIDO 3-HIDROXI-9-FLÚOR-NONANÓICO	-(CH ₂) ₆ -FL	DOL, 1990
ÁCIDO 3-HIDROXI-6-CLORO-HEXANÓICO	-(CH ₂) ₃ -CL	DOL, 1990
ÁCIDO 3-HIDROXI-8-CLORO-OCTANÓICO	-(CH ₂) ₆ -CL	DOL, 1990
ÁCIDO 3-HIDROXI-4-METIL-HEXANÓICO	-(CH ₃) CHCH ₂ CH ₃	FRITZSCHE ET AL., 1990B
ÁCIDO 3-HIDROXI-5-METIL-HEXANÓICO	-CH ₂ CH(CH ₃)CH ₃	FRITZSCHE ET AL., 1990B
ÁCIDO 3-HIDROXI-6-METIL-OCTANÓICO	-CH ₂ CH(CH ₃)(CH ₂) ₂ CH ₃	FRITZSCHE ET AL., 1990B
ÁCIDO 3-HIDROXI-6-METIL-OCTANÓICO	-(CH ₂) ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	FRITZSCHE ET AL., 1990B
ÁCIDO 3-HIDROXI-7-METIL-OCTANÓICO	-(CH ₂) ₃ CH(CH ₃)CH ₃	FRITZSCHE ET AL., 1990B
ÁCIDO 3-HIDROXIALCANÓICO COM CADEIA CIRCULAR		STEINBÜCHEL, 1991B
ÁCIDO 3-HIDROXIALCANÓICO COM GRUPO AROMÁTICO		STEINBÜCHEL, 1991B

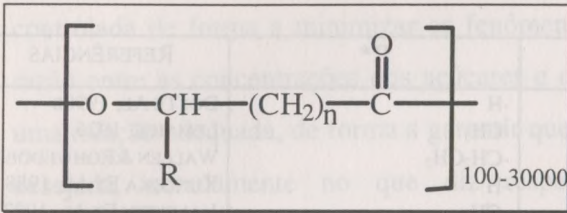


FIG. 1. Fórmula geral de polihidroxialcanoatos.

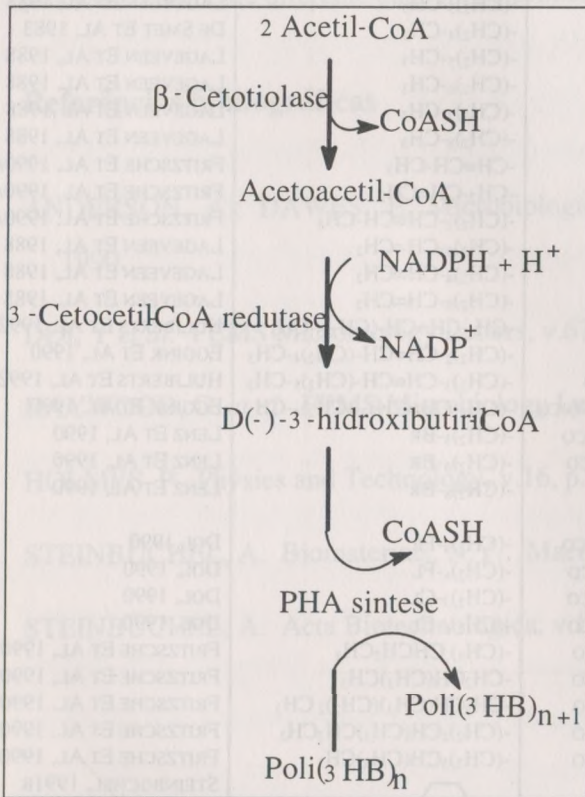


FIG. 2. Via metabólica de síntese de PHB em *Alcaligenes eutrophus*.

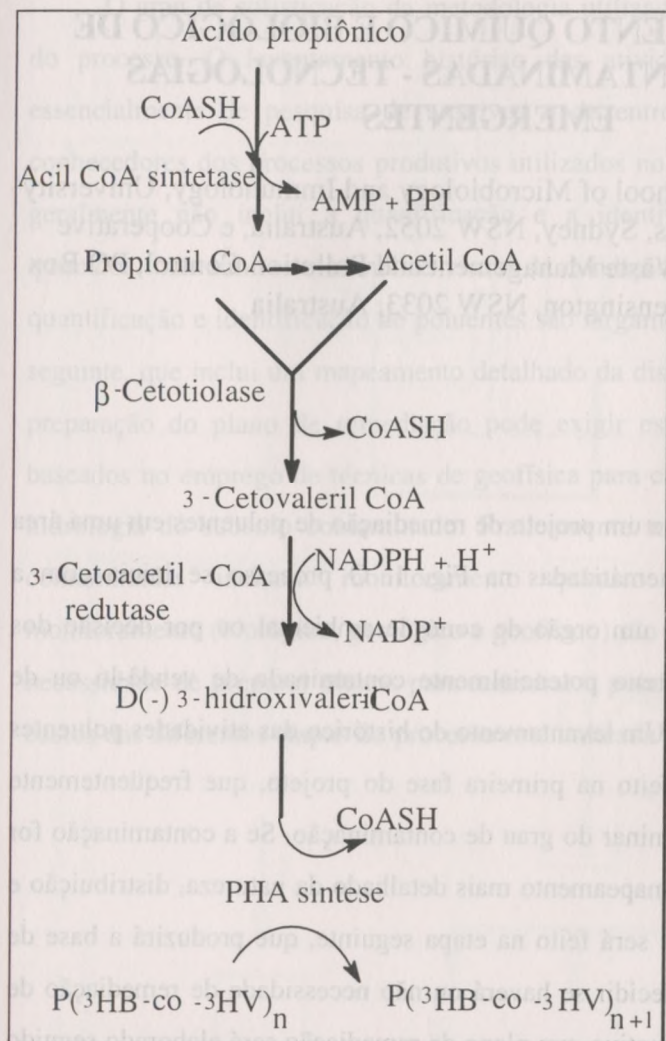


FIG. 3. Via metabólica de síntese de P(3HB-co-HV) a partir de ácido propiônico.

MONITORAMENTO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE ÁREAS CONTAMINADAS - TECNOLOGIAS EMERGENTES

René P. Schneider, School of Microbiology and Immunology, University of New South Wales, Sydney, NSW 2052, Australia, e Cooperative Research Center for Waste Management and Pollution Control, PO Box 1, Kensington, NSW 2033, Australia

1. Introdução

As várias etapas de um projeto de remediação de poluentes em uma área contaminada estão esquematizadas na Fig. 1. O processo se inicia com a notificação por parte de um órgão de controle ambiental ou por decisão dos proprietários de um terreno potencialmente contaminado de vendê-lo ou de mudar o padrão de uso. Um levantamento do histórico das atividades poluentes conduzidas no local é feito na primeira fase do projeto, que freqüentemente inclui uma análise preliminar do grau de contaminação. Se a contaminação for significativa, então um mapeamento mais detalhado da natureza, distribuição e quantidade de poluentes será feito na etapa seguinte, que produzirá a base de dados necessária para decidir se haverá ou não necessidade de remediação de poluentes. Em caso afirmativo, um plano de remediação será elaborado seguido do processo de remediação. A propriedade será liberada para uso após confirmação da remoção dos poluentes aos níveis estipulados pelas autoridades ambientais.

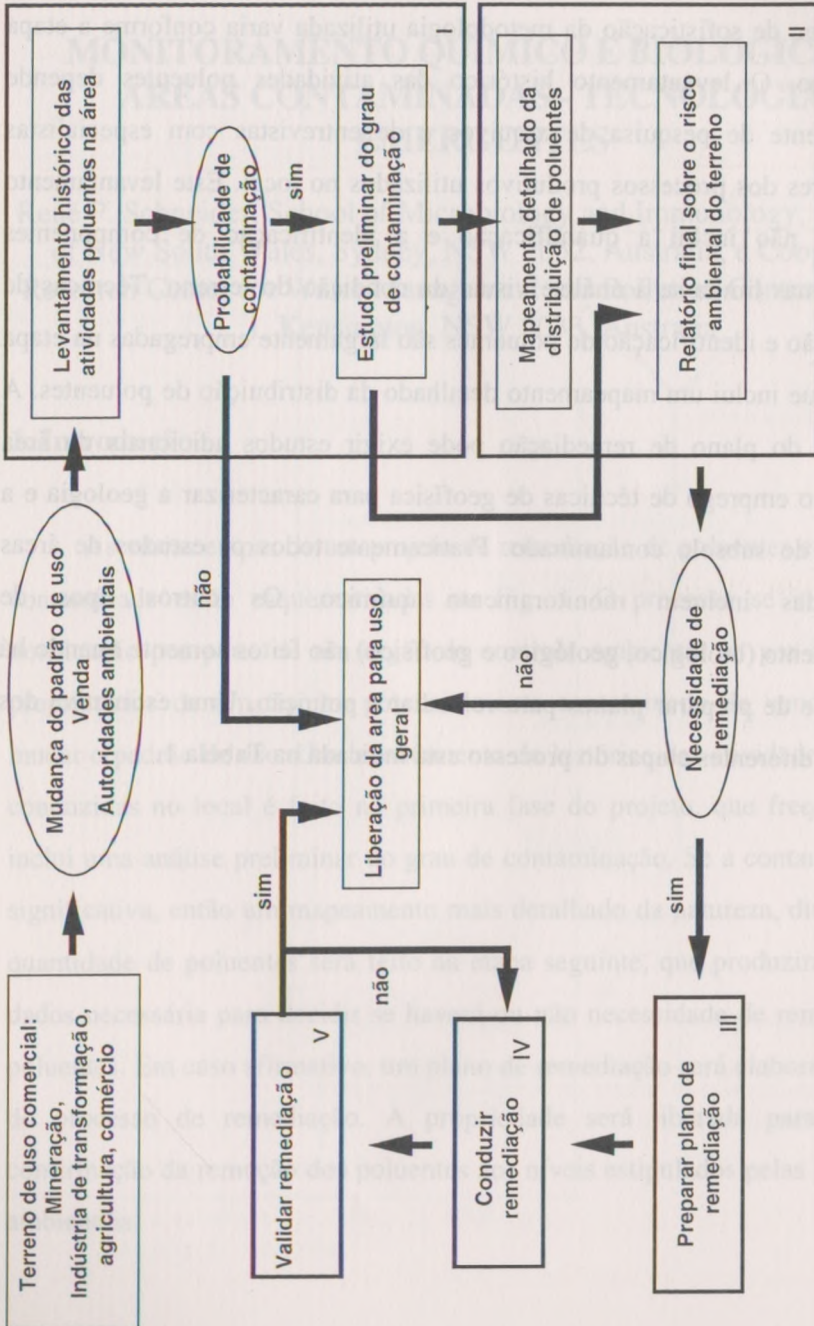


FIG. 1. Representação esquemática do processo de análise e remediação de uma área contaminada. Os círculos representam momentos de decisão; os quadrados definem atividades. As atividades associadas a cada etapa estão indicadas por algarismos romanos.

Tabela 1. Estimativa dos custos das diversas etapas de caracterização de áreas contaminadas.

Atividade	Custo (US\$ x 10 ³)
Estudo preliminar	5 - 30
Caracterização da contaminação	10 - 500
Preparação do plano de remediação	3 - 10
Remediação	30 - 50,000
Validação	5 - 200

2. Monitoramento químico

A análise química é uma parte essencial do estudo de áreas contaminadas. Seu custo varia dependendo do número de amostras e do tipo de poluente, mas normalmente absorve entre 15% e 40% do orçamento. O mercado de remediação de áreas contaminadas nos EUA em 1996 é estimado em US\$ 12 bilhões. Estas cifras incluem US\$ 1.8 bilhão para análises química, que incluem um montante de US\$ 1.06 bilhão que será gasto em atividades preparatórias como a coleta e o transporte de amostras. A tecnologia tradicional de amostragem consiste no estabelecimento de poços para a coleta de amostras de subsolo ou de água subterrânea. Estas amostras devem ser armazenadas de forma a evitar a perda de componentes voláteis ou a transformação química e/ou biológica dos poluentes durante o transporte para o laboratório de análise que normalmente está localizado em um centro urbano distante da área de estudo. A instrumentação analítica destes laboratórios inclui equipamentos de

alto custo unitário, como por exemplo, cromatógrafos a gás equipados com detetores que incluem FID, captura de elétrons e espectrômetros de massa, além de aparelhos de HPLC, de absorção atômica, etc. Frequentemente as amostras não podem ser injetadas diretamente no equipamento analítico; o componente a ser analisado deve ser extraído e purificado por procedimentos morosos e caros e que produzem poluentes (solventes) em quantidades muito superiores às presentes na amostra. Todos estes fatores contribuem para encarecer o custo de análise laboratorial de poluentes, que varia entre US\$ 70 a US\$ 400 por amostra, dependendo do tipo de material analisado e da natureza do poluente.

Os procedimentos tradicionais de monitoramento químico impossibilitam uma análise em tempo real de poluentes em áreas contaminadas. O emprego destas técnicas para conduzir um programa de screening para identificar amostras com altas concentrações de poluentes é inviável devido ao alto custo. Além disso, a qualidade dos dados obtidos é muitas vezes duvidosa, devido à falta de cuidados no armazenamento das amostras. Solos são ambientes extremamente heterogêneos tanto na macro como na micro-escala. As técnicas de coleta de amostras de material sólido de poços que produzem resultados representativos são caras e pouco utilizadas em estudos comerciais. A instalação de poços de amostragem custa entre US\$ 2,000 e US\$ 20,000 por unidade, dependendo da profundidade e das condições geológicas do terreno o que significa que a distribuição de poluentes será analisada com dados de um número reduzido de amostras. A baixa quantidade de poços perfurados e a considerável dúvida sobre a representatividade dos dados contribuem para o certo grau de incerteza sobre a distribuição e a quantificação de poluentes em solos contaminados. A metodologia tradicional de monitoramento químico

portanto permite somente uma análise muito superficial e pouco detalhada de áreas contaminadas.

Baseando-se nas considerações acima, novas tecnologias para análise e monitoramento de áreas contaminadas deveriam reduzir os custos do processo e melhorar a representatividade dos dados obtidos. Sensores capazes de medir a concentração de poluentes *in situ* em tempo real e a baixo custo seriam os sistemas ideais para estas aplicações. Alternativamente, a possibilidade de monitorar poluentes no campo com aparelhos portáteis eliminaria as incertezas associadas com a degradação das amostras durante a transferência para o laboratório de análise. Novos sensores teriam de ser desenvolvidos para avaliar a distribuição de poluentes entre as fases sólida, líquida e gasosa. Há necessidade de aprimorar os procedimentos de coleta de amostras a fim de melhorar a representatividade do processo de amostragem e ao mesmo tempo reduzir seu custo. A coleta e a análise de um número maior de amostras em um dado terreno melhoraria o detalhamento da distribuição de poluentes. A maioria das tecnologias de campo disponíveis no mercado para determinar poluentes permite a análise de grupos de substâncias com propriedades físico-químicas comuns, mas não o detalhamento e a quantificação dos componentes das misturas, possibilidades que serão oferecidas por várias das tecnologias emergentes. A discussão nas próximas seções se limitará à sensores para detecção de poluentes orgânicos. Novas tecnologias para o monitoramento de gases como CO₂, NO_x, SO₂, O₃ e metano foram revistas por Yamazoe e Miura (1994).

2.1. Tecnologias de campo disponíveis no mercado

Há uma variedade de tecnologias de campo para medição de poluentes. A mais cara e mais sofisticada são laboratórios de campo montados em plataformas ambulantes. Estas unidades contêm os mesmos equipamentos de laboratórios fixos, mas sua operação em pontos remotos é mais cara. Estes sistemas são utilizados quase que exclusivamente em programas de pesquisa, sendo rara sua utilização em contratos comerciais. Sensores portáteis para medição de poluentes foram introduzidos no mercado há vários anos. As vendas totais destes equipamentos na indústria de remediação dos EUA em 1996 foram avaliadas em U\$ 140 milhões. Os sistemas mais importantes são:

2.1.1. Cromatógrafos a gás portáteis

Estes instrumentos são variantes de equipamentos desenvolvidos para utilização em laboratórios fixos adaptados às necessidades de uso em campo. Cromatografia gasosa é uma tecnologia na qual uma amostra líquida ou gasosa é volatilizada, e injetada em uma coluna revestida com material adsorvente (coluna capilar) ou empacotada com uma resina. Estes materiais definem a capacidade de fracionamento da coluna. A interação dos componentes da amostra com a película retarda a passagem da substância pela coluna causando a sua separação dos outros componentes da mistura. Depois de separada, a substância é detectada com um dos vários detetores disponíveis para cromatografia gasosa. Os detetores mais comumente utilizados são o detetor de ionização de chama e detetores de estado sólido. O preço de um cromatógrafo a gás portátil varia entre U\$ 20,000 e U\$ 40,000. O preço médio é de U\$ 27,500.

2.1.2. Detetores de fotoionização ou ionização de chama

Estes dois sistemas são usados para analisar vapores de matéria orgânica. A informação obtida não discrimina substâncias individuais, mas somente grupos de substâncias com propriedades físicoquímicas semelhantes. Por exemplo, os equipamentos fornecem dados sobre a quantidade de hidrocarbonetos em uma amostra de ar, mas não sobre a composição química destes hidrocarbonetos. O preço de um destes detetores varia entre US\$ 4,000 a US\$ 25,000, sendo que o preço de um detetor portátil para uso de campo se situa na faixa dos US\$ 4,000 a US\$ 8,000.

2.1.3. Fluorescência de raios X

Esta tecnologia permite a análise de metais em solos e outros sólidos (Driscoll *et al.*, 1995). Variantes em desenvolvimento ampliarão o leque de aplicação destes detetores para amostras líquidas. Um instrumento de campo custa entre US\$ 30,000 e US\$ 50,000.

2.1.4. Kits imunológicos

Nestes kits, anticorpos para as substâncias-alvo são imobilizados em um substrato e expostos a uma amostra (van Emon e Gerlach, 1995). As moléculas da substância-alvo presentes na amostra se combinam com sítios específicos no anticorpo em competição com uma quantidade conhecida de moléculas da substância-alvo acopladas a uma enzima presentes no ensaio. A reação desta enzima com um substrato específico produz um produto detectável com um espectrofotômetro. A intensidade da cor será proporcional à quantidade de

poluente na amostra. Estes testes são específicos para a substância-alvo e permitem determinar a sua quantidade na água e, indiretamente, em solos e no ar. Os testes disponíveis no mercado permitem analisar uma larga variedade de poluentes orgânicos incluindo pesticidas (Meulenberg *et al.*, 1995), PAHs, BTEX e metais pesados. A gama de substâncias detectáveis por este processo está se expandindo rapidamente. O preço de uma análise varia entre U\$10 e U\$ 60. O preço médio é de U\$10 a U\$ 20.

O volume de vendas de equipamentos para análise de campo está em franca expansão nos EUA. A fatia de mercado ocupada por cada tipo de tecnologia está indicada na Tabela 2.

Tabela 2. Mercado estimado de várias tecnologias de análise de campo nos EUA em 1996.

Tecnologia	Unidade	Custo médio	Mercado total (em milhões de US\$)
Cromatografia à gás/ espectrometria de massa	1936	27,500	53,240
Fotoionização	4,339	4,000	17,356
Ionização por chama	2,942	7,000	20,594
Testes imunológicos	682,750	20	13,655
Fluorescência de raios X	339	35,000	11,865
Outros (medidores de pH, testes colorimétricos, medidores de oxigênio dissolvido)			20,000

2.2. Tecnologias emergentes

A pesquisa de novas tecnologias para detectar e quantificar substâncias de interesse ambiental ou farmacológico é uma área de intensa atividade, o que se reflete nas várias centenas ou mesmo milhares de artigos publicados por ano. Esta seção foi estruturada segundo o princípio de funcionamento do sensor e foram incluídas somente tecnologias que estão sendo desenvolvidas com fins comerciais. Deve-se considerar que o mesmo princípio de detecção pode freqüentemente permitir a construção de muitas variantes de sensores. Uma perspectiva científica dos problemas relacionados ao desenvolvimento de novos sensores foi apresentada por Göpel (1994).

2.2.1. Sensores de fibras óticas

O emprego de fibras óticas para a transmissão de sinais de telecomunicação vem aumentando vertiginosamente nos últimos anos. Esta tecnologia pode também ser empregada para o monitoramento remoto de poluentes utilizando-se procedimentos baseados em métodos espectroscópicos para detecção destas substâncias (Seitz, 1988). Poluentes normalmente não emitem luz e a maioria também não pode ser detectada por fluorescência. A visualização destes compostos deverá portanto ser feita de maneira indireta por via de reação que produza um sinal que possa ser detectado e transmitido por fibra ótica. Há várias maneiras de classificar estes sensores, mas o esquema mais simples considera a função da fibra ótica na geração do sinal (Moore *et al.*, 1989). Em sensores **extrínsecos**, a fibra ótica serve somente como condutor de feixe de radiação. Em sensores **intrínsecos**, a parte externa da fibra ótica, que consiste de um material de índice de reflexão menor do que a guia de onda

que forma o núcleo da fibra é removida permitindo às ondas evanescentes oriundas da reflexão total do feixe de radiação na interface da guia penetrar no ambiente que circunda a fibra. A energia destas ondas evanescentes diminui exponencialmente com a distância em direção perpendicular à fibra. Este método, portanto, permite analisar a composição química da área em contato imediato com a fibra. A detecção do poluente ocorre por via direta (fluorescência, Schade & Bublit, 1996 ou absorção, Barber *et al.*, 1995) ou por via indireta por intermédio de uma substância indicadora imobilizada por uma das seguintes maneiras:

- a) diretamente na fibra por meio de acoplamento químico (White *et al.*, 1996);
- b) dentro de uma matriz porosa (Browne *et al.*, 1996) ou polimérica (Barnard e Walt, 1991);
- c) dentro de uma zona de reação separada do meio por uma membrana ou outro tipo de barreira semipermeável (optrodos, Seitz, 1988).

2.2.2. Sensores de ondas acústicas de superfície

Estes sensores funcionam, em princípio, como balanças piezoelétricas (Grate *et al.*, 1993). A adsorção de moléculas na superfície de cristais piezoelétricos altera as propriedades de propagação de ondas acústicas de frequência ultrasônica induzidas por transdutores de metal. Mudanças da amplitude e da velocidade de propagação das ondas são detectadas pela alteração da frequência de oscilação do cristal. As áreas de detecção destes sensores são da ordem de 1cm^2 ou menos. Sua classificação é baseada no formato da onda, cujas propriedades dependem da orientação do cristal, de sua

espessura e da geometria dos transdutores. Se as ondas atravessarem a espessura do material, obtém-se um sensor do tipo TSM (thickness shear-mode, frequências de ressonância entre 5 e 10 MHz) cujo representante mais conhecido é a microbalança de cristal de quartzo (QCM, quartz crystal microbalance). Em sensores de ondas acústicas de superfície (SAW, surface acoustic wave, frequências de ressonância entre 30 e 300 MHz), a energia das ondas permanece restrita à superfície do sensor onde ocorrerá a formação de ondas do tipo Rayleigh com movimento elíptico de partículas. Um subgrupo destes sensores é constituído de sensores SAW onde as propriedades do cristal permitem induzir ondas de cisalhamento horizontal com todos os componentes de vibração restritos ao plano do cristal (sensores STW - surface transverse wave, frequências de ressonância entre 30 e 300 MHz). Em sensores APM (acoustic plate mode, frequências de ressonância entre 25 e 200 MHz), as ondas de cisalhamento horizontal avançam pelo interior do cristal por reflexão múltipla, de maneira análoga à propagação da luz pelo interior de fibras óticas. A espessura dos cristais destes sensores, onde também ocorrem ondas de Rayleigh, varia entre um e poucos múltiplos do comprimento da onda acústica. A espessura do cristal piezoelétrico é reduzida a poucos % do comprimento de onda em sensores FPW (flexural plate wave, frequências de ressonância entre 2 e 7 MHz), onde a vibração da membrana piezoelétrica é causada por ondas de Lamb, que são semelhantes às ondas de Rayleigh mas que se propagam pelo interior do cristal.

Todas estas variantes de sensores acústicos são aplicáveis à determinação de poluentes orgânicos voláteis na fase gasosa. Seu emprego em líquidos é limitado devido à perda de energia causada pela propagação de ondas de compressão do sensor para o líquido. Este fenómeno ocorre em casos onde a

onda acústica tem um componente perpendicular à superfície e quando sua velocidade é maior do que a velocidade de som no líquido. As variantes que podem ser utilizadas em fases líquidas são TSM, STW e SH-APM. A aplicação de camadas de polímeros na superfície do cristal piezoelétrico permite ajustar a seletividade da superfície do sensor para detectar compostos orgânicos específicos (Grate & Abraham, 1991; Grate *et al.*, 1996). A detecção é rápida e reversível. Um sistema completo contém dois sensores (um de referência e o outro para análise da amostra), um oscilador eletrônico para ativar o sistema, e interfaces eletrônicas digitais para medir a intensidade do sinal, controlar as funções do equipamento e formar a interface com o usuário.

2.2.3. Polímeros condutores

Polímeros condutores são uma classe de materiais orgânicos descoberta há cerca de quinze anos cuja versatilidade permite seu emprego em uma variedade enorme de aplicações industriais (Kanatzidis, 1990). Estes polímeros são condutores de eletricidade, o que permite sua eletrodeposição na superfície de eletrodos. Estes polímeros podem ser empregados como componentes de sensores, pois a adsorção de uma substância modifica as propriedades de condução de eletricidade (Gardner e Bartlett, 1995). A produção destes materiais é simples e barata. Os polímeros mais utilizados nestas aplicações são os polipirróis, os politiofenóis e as polianilinas. Os polipirróis podem ser eletropolimerizados de soluções aquosas em pH neutro o que facilita a incorporação de moléculas biológicas sensoras (anticorpos, células ou enzimas) no polímero condutor (Adeloju & Wallace, 1996).

2.2.4. Biosensores

2.2.4.1. Novas tecnologias imunológicas

Várias tecnologias recentemente introduzidas no mercado para análises clínicas têm grande potencial de miniaturização e que, também, poderiam ser adaptadas para análise de amostras em laboratório a custos mais baixos do que os atualmente associados aos métodos tradicionais de análise. A maioria destes sistemas são sensores óticos intrínsecos, onde o sinal é produzido pela interferência da substância com a onda evanescente do feixe de radiação eletromagnética injetado em um condutor ótico. As guias de onda são cristais planos, que são mais simples de serem produzidos em massa com os altos padrões de qualidade, essenciais para aplicações de química analítica do que fibras óticas cilíndricas (Robinson, 1995).

O sistema BIAcore™ da Pharmacia Biosensor utiliza o efeito de ressonância de plasmon (SPR). Plasmons são ondas de densidade de carga excitáveis por ondas eletromagnéticas que se propagam em superfícies (Liedberg *et al.*, 1983). Nestes sensores, um feixe de radiação eletromagnética polarizada é injetado num prisma coberto por uma fina camada de metal a um ângulo que causa sua reflexão total. A onda evanescente produzida neste processo atravessa a camada de metal e excita ondas de plasmon na sua superfície do lado oposto ao prisma. Este processo só ocorre quando o ângulo de reflexão atinge um valor bem definido correspondente ao ângulo de ressonância, que depende das propriedades da superfície propagadora das ondas de plasmon. A adsorção de anticorpos ou de outros materiais orgânicos ou inorgânicos nesta superfície altera as propriedades de propagação da onda de plasmon, o que muda o ângulo de ressonância. Neste ângulo a intensidade do

feixe de luz refletida diminui abruptamente porque parte da energia é absorvida no processo de excitação de ondas de plasmon. O equipamento portanto mede a alteração do ângulo de ressonância causada pela adsorção de antígenos aos anticorpos imobilizados na superfície do metal.

O sistema IAsysTM da Fisons explora o efeito de espelhos ressonantes. Uma guia de onda é estabelecida na superfície de chapas de vidro planas por deposição de filmes finos de metal transparente (phosphato de índio). Se esta guia for iluminada por um feixe de radiação eletromagnética incidente no ângulo crítico, o feixe se propagará por inteiro pelo interior da guia, produzindo uma onda evanescente que pode ser utilizada para excitar a fluorescência de anticorpos imobilizados na superfície (Sloper *et al.*, 1990). O acoplamento entre a guia de onda e o feixe de radiação também pode ser obtido por meio de "grating couplers". Estas guias óticas comercializadas pela firma Suíça ASI (Bios-ITM) contém uma mistura de SiO₂ e TiO₂, cuja superfície gradeada é iluminada por um feixe de raio laser. A guia ótica é mantida em um movimento rotatório contínuo e sensores incorporados à guia de onda medem o ângulo no qual o feixe é inteiramente acoplado para dentro da guia. Este ângulo varia dependendo do tipo e da quantidade de material adsorvido na superfície da guia de onda (Nellen e Lukosz, 1990; Ramsden, 1992).

O fenômeno de acoplamento da onda evanescente com o guia de ondas é explorado de modo inverso no sistema FCFD (fluorescent capillary fill device) (Badley *et al.*, 1987). Este sensor consiste de duas placas de guia de onda planas separadas por um espaço capilar. Anticorpos contra a substância a ser medida são imobilizados na superfície da placa sensora. A segunda placa é coberta com uma camada de antígeno ligado a um cromóforo fluorescente, que se dissolve na amostra quando esta é sugada para dentro do sensor por forças

capilares. Este antígeno compete pelos anticorpos imobilizados na placa sensora com o antígeno contido na amostra. A iluminação do aparelho com luz de comprimento de onda apropriado induz fluorescência no antígeno. A luz fluorescente penetra no guia de onda e é propagada por este mas seu ângulo de entrada dependerá da posição da molécula fluorescente em relação à superfície do sensor. Fluorescência produzida pelas substâncias adsorvidas aos anticorpos imobilizados, portanto, penetrará no guia a um ângulo diferente daquele oriundo de moléculas dissolvidas na solução. Estes dois feixes de luz sairão do guia em ângulos completamente diferentes, o que permite sua detecção e quantificação em separado, sendo possível utilizar o sinal oriundo do líquido como referência interna.

Um princípio diferente é utilizado pela firma BioStar para detectar microrganismos patogênicos (Harbeck *et al.*, 1993). Anticorpos contra o microrganismo-alvo são acoplados à superfície de uma camada de material ótico depositado na superfície de um espelho de silício. A cor da luz refletida pelo espelho de silício muda de ouro para púrpura quando a espessura do material depositado aumenta devido à adsorção de microorganismos aos anticorpos. Esta tecnologia provavelmente não poderá produzir a sensibilidade necessária para detectar poluentes, mas poderá certamente ser empregada para análise rápida dos microrganismos de uma área contaminada. Este método é essencialmente qualitativo.

2.2.4.2. Sensores baseados em “Reporter Gene Technology”

Biosensores baseados na quantificação da reação genética de microrganismos à mudança das condições de meio-ambiente representam uma tecnologia emergente que oferece o potencial de propiciar análises químicas de solos, água e ar contaminados, a um custo menor do que técnicas tradicionais. Nestes biosensores, “reporters genes” são acoplados a promotores ativados pelo poluente ou pelo sinal de interesse, que pode ser uma reação que indique toxicidade ou o estado fisiológico do organismo. O “reporter gene” codifica a informação genética de uma enzima indicadora, cuja atividade pode ser analisada a baixo custo. O sinal medido portanto corresponde à atividade da enzima indicadora e é proporcional à concentração do poluente ou à intensidade do sinal que induz o promotor. A utilização de um mesmo “reporter gene” em todos os sensores construídos por este procedimento permite medir uma infinidade de parâmetros com um único detetor. Vários “genes reporter” estão descritos na literatura, mas o sistema mais indicado para aplicações ambientais é a luciferase bacteriana, que emite luz durante a reação enzimática (Meighen, 1994). O sistema genético que codifica esta enzima contém a informação para a síntese de uma segunda enzima, a redutase de ácidos graxos, cuja presença permite fechar o ciclo reativo do sistema (Meighen, 1994). Um sensor que contém os genes de luciferase, por exemplo, somente necessitaria da adição de nutrientes para sua ativação, que podem ser fornecidos como componentes da solução tampão. Estes sistemas, que funcionam em soluções aquosas, podem ser utilizados para medir a quantidade de poluentes em solução, adsorvidos às superfícies de solo ou outros materiais e, indiretamente, na fase gasosa (Heitzer *et al.*, 1994). Potencialmente, qualquer substância ou condição ambiental que

produza uma resposta genética em um organismo (procarioto ou eucarioto) pode ser medida com este sensor.

2.2.5. Outros aparelhos

2.2.5.1. Cromatógrafo a gás miniaturizado para inserção em penetrômetro de cone

Versão miniaturizada de cromatógrafo à gas, com diâmetro inferior a 2.5cm e comprimento aproximado de 75cm, necessita somente de ar comprimido e eletricidade para operar. O instrumento contém uma coluna empacotada para análise de gases, com duas opções de detetores: para medir hidrocarbonetos ou halogênios a níveis sub-ppm. O preço é estimado em U\$ 10,000, sendo que o cromatógrafo custaria ao redor de U\$ 4,000.

2.2.5.2. Monitor portátil para organoclorados

Instrumento portátil movido à pilha para detecção específica de compostos organoclorados voláteis. O sensor de estado sólido opera a uma temperatura de 800°C e é específico para cloro, não reagindo com compostos que contenham oxigênio ou hidrocarbonetos. O aparelho não é capaz de distinguir entre diferentes tipos de organoclorados. Um ciclo de medição dura 90 segundos e é intercalado por um período de regeneração de 1 a 10 minutos. Os sensores têm de ser trocados após 350 a 1.000 análises. O sistema completo custa U\$ 8.300, sensores individuais U\$ 200 e gases de calibração cerca de U\$200/ano.

2.2.5.3. Monitor portátil para hidrocarbonetos poliaromáticos (PAH)

Um espectrofluorímetro portátil desenvolvido por um grupo do Oak Ridge National Laboratory nos EUA permite determinar compostos poliaromáticos capazes de emitir fluorescência quando excitados por luz de comprimento de onda específico em amostras de solo contaminado. A análise de PAH, creosotos e PCBs com este instrumento requer porém um processo elaborado de preparo de amostras (Gerlach, 1996).

2.3. Feixes de sensores

Apesar do considerável avanço no entendimento dos fatores responsáveis pela seletividade das camadas de polímeros utilizadas em sensores não-biológicos (Grate & Abraham, 1991), a maioria dos sensores físico-químicos apresentados nos parágrafos anteriores não permite detectar compostos individuais em misturas que contenham substâncias semelhantes. A seletividade destes sistemas pode ser melhorada com o emprego de feixes de sensores, onde cada elemento tem uma característica de resposta diferente. A análise simultânea da amostra através de um feixe de sensores, em conjunto com o processamento do sinal por métodos de inteligência artificial, estão sendo estudados para se obter a identificação dos componentes individuais. Estes sistemas são comumente denominados de "nariz eletrônico" (White *et al.*, 1996).

2.4. Células de difusão

Este equipamento não é um sensor propriamente dito, mas um sistema para amostragem *in situ* de compostos orgânicos voláteis. A sonda que é inserida num poço de observação consiste de um tubo de polímero permeável para as moléculas de poluentes mas não para água. Estes poluentes permeiam para dentro do tubo, do qual são removidos com um fluxo de gás inerte. O material pode ser injetado diretamente em um cromatógrafo à gás portátil, ou em outro equipamento de análise química.

3. Monitoramento biológico

O monitoramento microbiológico de áreas contaminadas visa avaliar a capacidade de biodegradação da microbiota natural (Heitzer & Sayler, 1993). Estes dados são obtidos tradicionalmente com técnicas que incluem o enriquecimento de culturas de biodegradadores, sua contagem por plaqueamento em meios seletivos ou por determinação do número mais provável de biodegradadores (MPN). Estas análises são demoradas e requerem mão de obra especializada. Um monitoramento microbiológico completo deveria fornecer informação sobre os seguintes parâmetros:

3.1. Potencial de biodegradação na área contaminada

Este potencial é definido pela presença de genes que codificam enzimas capazes de detoxificar poluentes. Esta informação pode ser obtida diretamente utilizando-se técnicas de PCR (reação em cadeia de polimerase) ou, em menor grau, indiretamente por metodologias de hibridização *in situ* com sondas

genéticas fluorescentes para bactérias portadoras destes genes (FISH, Sayler *et al.*, 1995).

3.2. Potencial biocatalítico da área

Este parâmetro é determinado pela quantidade de enzimas capazes de reagir com o poluente. Uma maneira indireta de avaliá-lo consiste em conduzir ensaios de biodegradação usando microcosmos com material obtido do sítio contaminado. Alternativamente, as enzimas poderiam ser extraídas do solo e sua quantidade analisada por ensaios enzimáticos ou por testes imunológicos específicos. Uma maneira indireta de verificar se uma enzima está sendo produzida pelos microrganismos consiste na extração e análise do mRNA correspondente a esta proteína (Sayler *et al.*, 1995).

3.3. Taxa de biodegradação de poluentes pela microbiota *in situ*

A opção mais barata de remediação é a detoxificação de uma área contaminada por processos de autoremediação. O conhecimento da taxa natural de biodegradação de poluentes nas condições prevalescentes na área contaminada é o parâmetro-chave para definir a viabilidade desta opção. É importante também determinar o espectro de metabólitos gerados no processo para evitar que um tipo de composto tóxico seja substituído por outro pior. O meio mais simples e mais barato de determinar a taxa de degradação natural é a instalação de poços de monitoramento contínuo em pontos críticos da área contaminada. A alternativa de obter os mesmos dados em microcosmos especiais instalados *in situ* é viável para fins de pesquisa (Acton & Barker, 1992) mas não em escala comercial. Nenhuma das tecnologias emergentes de

monitoramento químico foi desenvolvida especificamente para detectar metabólitos. Na maioria dos casos, estas substâncias estarão presentes em quantidades muito pequenas e serão mais solúveis do que o material original devido ao seu maior grau de oxidação. Variantes de biosensores de luciferase ou testes imunológicos são as tecnologias de maior potencial para detecção de metabólitos no campo a custos compatíveis com as necessidades do mercado.

Apesar do rápido desenvolvimento de técnicas de biologia molecular e de imunologia, na última década, a análise microbiológica ainda está distante de se tornar uma etapa-padrão na indústria de caracterização e monitoramento de áreas contaminadas, com exceção dos testes de toxicidade. A razão principal para o uso limitado de estudos microbiológicos reside em seu alto custo unitário (com custos entre U\$ 100 e U\$ 500 por amostra) e no fato de a informação crítica para julgar a qualidade de um sítio contaminado ser o conteúdo de produtos químicos tóxicos. Análises microbiológicas são mais comuns quando há necessidade de se averiguar a possibilidade de bioremediação de uma área, sendo que nestes casos métodos tradicionais de análise ainda predominam largamente sobre tecnologias emergentes.

4. Considerações finais

Nos EUA, uma pesquisa recente conduzida entre profissionais do setor de remediação indicou que a maior demanda de novos sensores é para a medição de poluentes orgânicos (55%), seguidos de metais (30%), poluentes inorgânicos (10%) e materiais radioativos (5%) nos meios solo (39%), na fase líquida (29%), na fase gasosa (23%) e para outras aplicações (9%). A análise comparativa das várias tecnologias de campo disponíveis no mercado e das

várias tecnologias emergentes indica que a maioria dos sistemas está direcionada à análise de poluentes orgânicos na fase gasosa. Alguns sistemas permitem a determinação direta de poluentes na fase aquosa, mas somente biosensores de “genes reporter” seriam aplicáveis diretamente à fase sólida. A introdução de uma tecnologia emergente num mercado é um processo complexo e demorado. No contexto do monitoramento de áreas contaminadas deve-se considerar duas questões importantes: quais são as barreiras enfrentadas por novas tecnologias no mercado? E segundo, qual será a contribuição destas novas tecnologias para a redução dos custos de monitoramento?

Considerações econômicas à parte, um fator de importância fundamental que condiciona a aceitação de novas tecnologias para o monitoramento de áreas contaminadas está relacionado à sua aceitação pelos órgãos de controle ambiental e pelos profissionais da área habituados a lidar com técnicas tradicionais de análise laboratorial como cromatografia gasosa ou HPLC. O processo de convencimento destes profissionais de que as novas tecnologias produzem resultados equivalentes às tecnologias tradicionais depende de dados obtidos em estudos comparativos de alto nível conduzidos por diferentes grupos de profissionais em laboratórios distintos com amostras de solos representativas das diversas matrizes representativas de solos contaminados. Estes estudos são caros e muitas vezes as companhias que fabricam e comercializam os sensores não têm condição financeira de bancá-los. Uma barreira adicional considerável é muitas vezes imposta pela prescrição de metodologias por órgãos de controle ambiental. A falta de endosso por parte destas autoridades pode dificultar muito a aceitação de novas tecnologias. O processo de homologação de novas tecnologias poderia ser acelerado se o governo financiasse estudos

comparativos feitos em universidades ou outras instituições de pesquisa independentes. Estes estudos deveriam incluir representantes de autoridades ambientais e da indústria para que os testes abrangessem o maior número de situações relevantes para a prática. Os dados deveriam ser publicados, de preferência em revistas especializadas onde os artigos são sujeitos à revisão por especialistas da área. O processo de homologação da tecnologia pelas autoridades competentes deveria ser feito em etapas, liberando-se primeiro seu uso para screening seguido da aplicação para monitoramento contínuo e, se os resultados obtidos durante vários anos de uso de campo por muitos operadores diferentes permitirem, sancionar seu emprego como método-padrão de análise. Este procedimento permitiria averiguar o grau de confiança na aparelhagem sem comprometer a saúde pública ou a qualidade do meio-ambiente, pois os métodos tradicionais continuariam sendo utilizados em paralelo à metodologia nova.

A estimativa do impacto das tecnologias emergentes no custo de monitoramento químico de áreas contaminadas é uma tarefa arriscada. O lançamento no mercado de um sistema baseado em tecnologias emergentes que esteja em competição direta com tecnologias estabelecidas só terá sucesso se o novo sistema permitir uma considerável redução do custo de análise da substância (60% no mínimo). A alternativa é de direcionar a aplicação da nova tecnologia para um nicho do mercado que não é ainda servido por outras técnicas como, por exemplo, o monitoramento *in situ* de poluentes. Neste caso o preço unitário poderá ser maior. O mercado de análise química para caracterização e monitoramento de áreas contaminadas porém apresenta várias características que dificultam atingir as economias de escala necessárias para reduzir significativamente o custo de sensores:

- A variedade de substâncias a ser analisada é grande e muito diversa no que tange suas propriedades físico-químicas. É praticamente impossível desenvolver um sensor que possa medir todos os compostos com um mesmo princípio de detecção, com exceção, talvez, de testes imunológicos ou de biosensores baseados em “reporter gene technology”

- O mercado também é muito fragmentado do ponto de vista da matriz do poluente. A maioria das tecnologias emergentes está sendo desenvolvida para análise de poluentes em fase gasosa, mas o que mais interessa é sua concentração na água ou no solo. Um sensor que tenha bom desempenho em meio gasoso, como por exemplo os sistemas de ondas acústicas de superfície, talvez não funcione em meio líquido.

- O setor é dominado por pequenos e médios fabricantes sem a capacidade financeira para servir o mercado em escala mundial e assim obter as economias de escala na produção necessárias para reduzir o custo unitário do produto (Middelhoek, 1994). Grande parte das tecnologias emergentes foi desenvolvida em laboratórios de universidades ou em centros de pesquisa governamentais onde iniciativas de projetos são norteadas mais pelo anseio de produzir inovação tecnológica (technology push) do que de satisfazer uma necessidade de mercado (market pull; Collins, 1992).

O impacto das tecnologias emergentes nos custos de monitoramento pode ser estimado para os diferentes setores de aplicação da seguinte maneira:

Screening

As tecnologias que provavelmente terão um impacto significativo nesta área são os testes imunológicos, biosensores baseados em “reporter gene technology” e sensores contendo polímeros condutores. O custo médio de análise com testes imunológicos se situa entre U\$10 e U\$ 20. Biosensores bacterianos ou sistemas de polímeros condutores poderiam reduzir estes custos em aproximadamente 50%.

Determinação de poluentes *in situ*

As tecnologias mais indicadas para esta aplicação são sensores de fibras óticas, sistemas miniaturizados de cromatografia gasosa ou feixes de sensores. A maioria destes sistemas terá um componente externo com os sistemas eletrônicos para medir e interpretar o sinal do sensor e a unidade sensora propriamente dita que é introduzida no poço de observação. O preço da unidade externa, que tipicamente poderá controlar vários sensores simultaneamente, provavelmente permanecerá ao redor de U\$ 5,000, enquanto que as unidades com os sensores custarão entre U\$ 500 e U\$ 2,000.

Análise de poluentes em laboratório

Os testes imunológicos mais aprimorados permitem detectar poluentes com especificidade absoluta diretamente em amostras aquosas e com sensibilidade melhor do que a dos sensores comumente utilizados em cromatografia gasosa. Sistemas emergentes baseados em tecnologias óticas discutidos no item 2.2.4.1 estão sendo introduzidos paulatinamente no mercado de análises clínicas. A adaptação destes sistemas para análise de poluentes poderia simplificar muito a detecção e quantificação destas substâncias em laboratórios, o que poderia contribuir para uma redução significativa do custo de análise laboratorial.

5. Conclusão

O setor de monitoramento de poluentes em áreas contaminadas está passando por uma revolução tecnológica. Novas tecnologias permitirão medir a concentração de poluentes *in situ* e efetuar screening de amostras no campo a custos relativamente baixos. O desafio agora se transfere para a indústria de remediação onde o melhor controle dos processos pelo emprego racional das novas possibilidades de medição de poluentes permitirá reduzir consideravelmente o custo da recuperação de áreas contaminadas.

6. Referências bibliográficas

- ACTON, D.W.; BARKER, J.F. *In situ* biodegradation potential of aromatic hydrocarbons in anaerobic groundwaters. *Journal of Contaminant Hydrology*, v.9, p. 325-352, 1992.
- ADELOJU, S.B.; WALLACE, G.G. Conducting polymers and the bioanalytical sciences: new tools for biomolecular communications. *Analyst*, v.121, p.699-703, 1996.
- BADLEY, R.A.; DRAKE, R.A.L.; SHANKS, I.A.; SMITH, A.M.; STEPHENSON, P.R. Optical biosensors for immunoassays: the fluorescence capillary-fill device. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B*, v.316, p.143-160, 1987.
- BARBER, T.E.; FISHER, W.G.; WACHTER, E.A. On-line monitoring of aromatic hydrocarbons using a near-ultraviolet fiber-optic absorption sensor. *Environmental Science & Technology*, v.29, p.1576-1580, 1995.

- BARNARD, S.M.; WALT, D.R. Fiber-optic organic vapor sensor. *Environmental Science & Technology*, v.25, p.1301-1304, 1991.
- BROWNE, C.A.; TARRANT, D.H.; OLTENAU, M. S.; MULLENS, J.W.; CHRONISTER, E.L. Intrinsic sol-gel clad fiber-optic sensors with time-resolved detection. *Analytical Chemistry*, v.68, p.2289-2295, 1996.
- COLLINS, A.J. Problems associated with bringing a sensor technology to the market place. *Sensors and Actuators A*, v.31, p.77-80, 1992.
- DRISCOLL, J.N.; LALIBERTE, R.; WOOD, C. Field detection of lead in paint and soil by high-resolution XRF. *American Laboratory*, 34H-34M, mar. 1995.
- GARDNER, J.W.; BARTLETT, P.N. Application of conducting polymer technology in microsystems. *Sensors and Actuators A*, v.51, p.57-66, 1995.
- GERLACH, C.L. New instrument brings PAH analysis to the field. *Environmental Science & Technology*, v.30, p.252-254, 1996.
- GÖPEL, W. New materials and transducers for chemical sensors. *Sensors and Actuators B*, v.18-19, p.1-21, 1994.
- GRATE, J.W.; ABRAHAM, M.H. Solubility interactions and the design of chemically selective sorbent coatings for chemical sensors and arrays. *Sensors and Actuators B*, v.3, p.85-111, 1991.
- GRATE, J.W.; PATRASH, S.J.; ABRAHAM, M.H.; DU, C.M. Selective vapor sorption by polymers and cavitants on acoustic wave sensors: is this molecular recognition? *Analytical Chemistry*, v.68, p.913-917, 1996.

- HARBECK, R.J.; TEAGUE, J.; CROSSEN, G.R.; MAUL, D.M.; CHILDERS, P.L. Novel, rapid optical immunoassay technique for detection of group A *Streptococci* from pharyngeal specimens: comparison with standard culture methods. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, p.839-844, 1993.
- HEITZER, A.; SAYLER, G.S. Monitoring the efficacy of bioremediation. *TIBTECH*, v.11, p.334-343, 1993.
- HEITZER, A.; MALACHOWSKY, K.; THONNARD, J.E.; BIENKOWSKI, P.R.; WHITE, D.C.; SAYLER, G.S. Optical biosensor for environmental on-line measurement of naphthalene and salicylate bioavailability with an immobilized bioluminescent catabolic reporter bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, v.60, p.1487-1494, 1994.
- KANATZIDIS, M.G. Conductive polymers. *Chemical Engineering News*, v.36, p.54, 1990.
- MEIGHEN, E.A. Genetics of bacterial bioluminescence. *Annual Review of Genetics*, v.28, p.117-139, 1994.
- MEULENBERG, E.P.; MULDER, W.H.; STOKS, P.G. Immunoassays for pesticides. *Environmental Science & Technology*, v.29, p.553-561, 1995.
- MIDDLEHOEK, S. Quo vadis silicon sensors? *Sensors and Actuators A*, v.41-42, p.1-8, 1994.
- MOORE, E.L.; DE PAULA, R.P. Optical fibers and integrated optics. In: GOPEL, W.; HESSE, J.; ZEMEL, J.N., ed. *Sensors - A comprehensive survey*. Weinheim: Springer-Verlag, 1989. v.1, p.217-245.

- NELLEN, P.M.; LUKOSZ, W. Integrated optical input grating couplers as chemo - and immunosensors. *Sensors and Actuators B*, v.1, p.592-596, 1990.
- RAMSDEN, J.J. Observation of anomalous diffusion of proteins near surfaces. *Journal of Physical Chemistry*, v.96, p.3388-3391, 1992.
- ROBINSON, G. The commercial development of planar optical sensors. *Sensors and Actuators B*, v.29, p.31-36, 1995.
- SAYLER, G.S.; LAYTON, A.; LAJOIE, C.; BOWMAN, J.; TSCHANTZ, M.; FLEMING, J.T. Molecular site assessment and process monitoring in bioremediation and natural attenuation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.54, p.277-290, 1995.
- SCHADE, W.; BUBLIUTZ, J. On-site laser probe for the detection of petroleum products in water and soil. *Environmental Science & Technology*, v.30, p.1451-1458, 1996.
- SEITZ, W.R. Chemical sensors based on immobilised indicators and fiber optics. *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v.19, p.135-173, 1988.
- SLOPER, A.N.; DEACON, J.K.; FLANAGAN, M.T. A planar indium phosphate monomode waveguide evanescent field immunosensor. *Sensors and Actuators B*, v.1, p.589-591, 1990.
- VAN EMON, J.M.; GERLACH, C.L. A status report in field-portable immunoassay. *Environmental Science & Technology*, v.29, p.312-317, 1995.

WHITE, J.; KAUER, J.S.; DICKINSON, T.A.; WALT, D.R. Rapid analyte recognition in a device based on optical sensors and the olfactory system. *Analytical Chemistry*, v.68, p.2191-2202, 1996.

YAMAZOE, N.; MIURA, N. Environmental gas sensing. *Sensors and Actuators B*, v.20, p.95-102, 1994.

GENERATION AND USE OF ENVIRONMENTAL FATE DATA TO DETERMINE ECOLOGICAL SAFETY OF CROP PROTECTION PRODUCTS

Joseph J. Dulka, Ph.D., DuPont Agricultural Products
Wilmington, Delaware 19880-0402

Introduction

In order for a crop protection product (CPP) to be registered, it must meet three key criteria. It must be demonstrated that it works (i.e., be efficacious), is safe to man, both workers and consumers, and can be used in a way that will provide an adequate margin of safety to the environment, before it can be sold. To meet these three criteria, CPP manufacturers continue to evaluate future product candidates, not just on efficacy, but include in that evaluation, a critical assessment of the human and ecological safety of that candidate before committing to its development.

The focus of this paper is on the last subject, ecological safety, and how biodegradation and abiotic degradation data on a product generated by the CPP industry are typically used to evaluate fate and behavior of their products in soil. And, how these data, when combined with product use information and ecotoxicological end-points, can be used to determine whether soil residues are of any significance to the safety of terrestrial (soil microflora, invertebrates, pollinators, and birds) and aquatic (fish, invertebrates and plants) systems.

Some discussion will also be given to several on-going efforts to harmonize, where possible, testing methods globally.

BACKGROUND INFORMATION ON REGULATORY REQUIREMENTS FOR THE REGISTRATION OF CROP PROTECTION PRODUCTS

When a CPP is first discovered in a laboratory, it will take the efforts of a multi-disciplinary team of experts in the areas of biology, environmental sciences, toxicology, ecotoxicology, analytical chemistry, metabolism, formulation chemistry and many others to generate and develop the required technical data and studies at a cost of over \$80,000,000 to obtain a registration. Part of that cost will be attributed to costs associated with development of efficacy data and data to address human safety, but an increasingly higher amount is being invested to address environmental safety and to ensure the proper stewardship of the CPP. That is, making sure, through labeling, grower education and other educational tools, the manufacturer works with the growers to ensure the customer is equipped with the necessary information to use the product in a responsible manner.

The data package developed for environmental safety includes three areas. These are physical-chemical properties, environmental fate and ecotoxicological data. Table 1, summarizes some of the key pieces of information typically generated as part of the environmental and physical-chemical properties data base for a crop protection product.

Table 1

Key Data Developed to Determine Environmental Safety

Physical-chemical properties

- * water solubility,
- * octanol-water partition coefficient (K_{ow}),
- * acid/base dissociation constant (pK_a),
- * vapor pressure (V_p),
- * Henry's law constant.

Environmental fate

- * hydrolysis half-life at various pH,
- * aqueous photolysis half-life at a stable pH,
- * soil photolysis half-life,
- * soil sorption/desorption (K_d , K_{oc} , or K_{om}),
- * degradation half-life in soil under aerobic (anaerobic) conditions,
- * plant metabolism half-life, and
- * in some cases, bioaccumulation potential.

Ecotoxicological data on:

- * aquatic plants,
- * invertebrates,
- * fish,
- * soil microorganisms,
- * earthworms,
- * birds, and
- * bees.

Ecotoxicology data will be generated to address acute toxicity, as well as, chronic toxicity when necessary.

In the US, guidelines for these tests are covered under the Federal Insecticide and Rodenticide Act (FIFRA) 40 CFR 158 Subdivision D for

physical-chemical properties, E for ecological effects, and N for environmental fate (US EPA, 1995).

In the EU, detailed methods on testing guidance are covered in the SETAC document, *Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides* (Lynch, 1995) and OECD testing guidance Section 1 (blue pages) for physical/chemical properties and Section 2 (green pages) for effects on biotic systems (OECD, 1993).

And, in Brazil, testing requirements are covered under *Portaria Normativa*, Nº 139, reference 21/12/94 from IBAMA, for physical-chemical properties, ecological effects and environmental fate.

It should be noted that the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) has actively led the effort to harmonize methods among countries and regions, and it is these methods which are most widely accepted globally. A summary of test methods and regulatory guidance are provided in Table 2.

Table 2
Testing Methods and Guidance

	US EPA	EU	OECD
Physical-Chemical Methods	Subdivision D	OECD	Section 1
Environmental Fate	Subdivision N	SETAC	---
Ecotoxicology	Subdivision E	OECD	Section 2

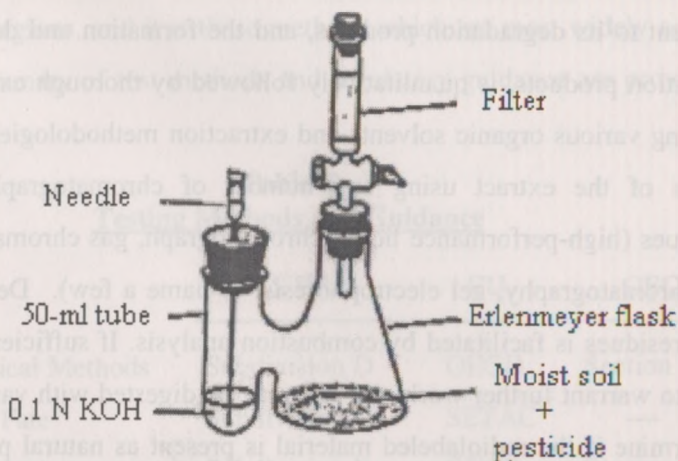
METHODS FOR CONDUCTING ENVIRONMENTAL FATE TESTING

For CPP's environmental fate testing conducted in the laboratory is usually done using radiolabeled material. This allows material balance for not only the active ingredient, but also degradates through time and accounting for volatile products and conversion of the product to carbon dioxide, if labeled with carbon-14. The radiolabel is generally placed in a portion of the molecule which is believed to be somewhat recalcitrant to biotic degradation. Total material balance of active ingredient and degradates can be followed through time by combustion analysis of the soil. An understanding of the biodegradation pathway and products, rate of transformation of the active ingredient to its degradation products, and the formation and decline of these degradation products, is quantitatively followed by thorough extraction of the soil using various organic solvents and extraction methodologies, followed by analysis of the extract using any number of chromatographic separation techniques (high-performance liquid chromatograph, gas chromatography, thin layer chromatography, gel electrophoresis, to name a few). Determination of bound residues is facilitated by combustion analysis. If sufficient residues are bound to warrant further work, the soil may be digested with various enzymes, to determine if the radiolabeled material is present as natural products and/or the soil may be fractionated into its humic and fulvic acid components to determine if the remaining materials have been incorporated into the soil structure.

The soils used in these experiments are freshly gathered from the field with minimal storage and are representative of the areas where the product is

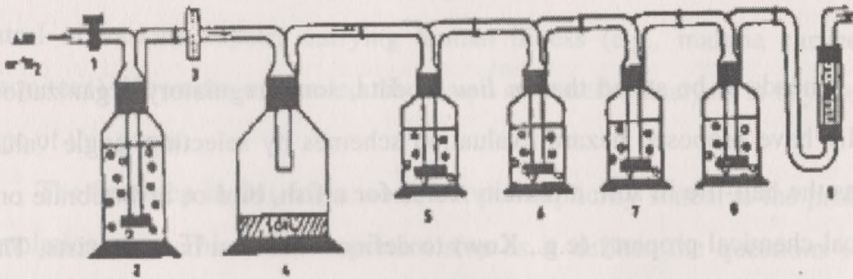
intended for use. The studies are usually conducted in the dark at 20-25° C and between 50 and 70% of moisture holding capacity using the methods and techniques described by Bartha and Pramer, 1965 and Hance, 1980 using the equipment in Figures 1 and 2. The soils are also characterized for texture, percent organic matter or organic carbon and pH, to determine if predictive correlations can be obtained among these soil properties and rate of degradation.

Biometer Flash According to Bartha and Pramer (1965) for Measuring the Degradation of Pesticides in Soil



(Figure by courtesy of the Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA)

Flow-Through Soil Metabolism System as Used in Hance's Laboratory



1. Needle valve
2. Gas washing bottle with water saturate the incoming gas
3. Ultramembrane (sterile conditions only), pore size 0-1 μm
4. Soil metabolism flask (for anaerobic conditions water-logged and N_2 ventilated)
5. Ethylene glycol trap
6. H_2SO_4 trap
- 7,8. NaOH traps
9. Flow meter

Additionally, the data, as previously noted in Table 1, are used to also determine if predictive correlation can be found between the product's binding capacity to soil, as determined by a soil K_d/K_{om} , and the physical-chemical properties of the product and the soil's characteristics. Methods for performing this type of assessment have been summarized by Lyman et al. (1982).

While the focus of this workshop is on biodegradation, it is also important to understand what the data mean. Therefore, we will shift attention

to discuss how data from these types of studies are used to evaluate potential exposure to wildlife and to determine whether sufficient protection is afforded.

THE ECOLOGICAL ASSESSMENT PROCESS

It needs to be stated that *in lieu* of data, some regulatory organizations globally have proposed hazard evaluation schemes by selecting single values such as the half-life in soil, a toxicity value for a fish, bird or invertebrate or a physical-chemical property (e.g., Kow) to define whether a hazard exists. This may be appropriate in defining whether a concern could potentially exist, based upon a very limited data set, indicating more work may be necessary, but it should not be used to make a regulatory decision.

To define what questions may be associated with ecological systems and what data may be necessary to properly assess the situation, a process called ecological assessment has evolved and been applied to meet this need.

While a number of frameworks have been proposed (United States Environmental Protection Agency (US EPA, 1992), European Union (EU, 1996), United Nations-Food and Agriculture Organization (UN-FAO, 1989), all use the common principle that safety (or risk) is a function of the level of exposure which might occur in the environment in various compartments and the inherent toxicity associated with the product to those organisms associated with these compartments. This is termed the toxicity-to-exposure ratio or TER. That is:

$$\text{SAFETY} = \text{function (TOXICITY/EXPOSURE)}$$

The greater the TER, the higher the margin of safety is anticipated.

A summary of the UN-FAO framework is given in Figure 3.

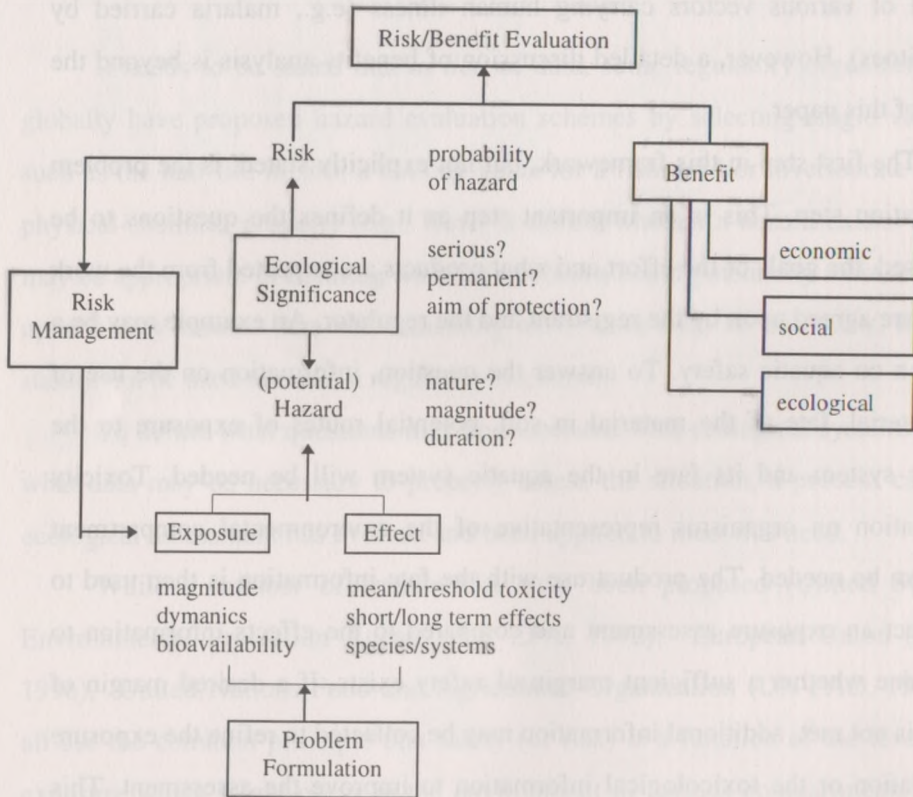
Included in this framework is also an assessment of the benefits the product brings to society. Benefits would include improvements in yield, reduction in losses due to crop disease/pests, etc. Benefits could also include control of various vectors carrying human illness (e.g., malaria carried by mosquitoes). However, a detailed discussion of benefits analysis is beyond the scope of this paper.

The first step in this framework, but not explicitly stated, is the problem formulation step. This is an important step as it defines the questions to be addressed, the goals of the effort and what products are expected from the work which are agreed upon by the registrant and the regulator. An example may be a question on aquatic safety. To answer the question, information on the use of the material, fate of the material in soil, potential routes of exposure to the aquatic system and its fate in the aquatic system will be needed. Toxicity information on organisms representative of the environmental compartment will also be needed. The product use with the fate information is then used to construct an exposure assessment and compared to the effects information to determine whether a sufficient margin of safety exists. If a desired margin of safety is not met, additional information may be collected to refine the exposure information or the toxicological information to improve the assessment. This process is generally referred to as a tiered approach and will be discussed further under the exposure assessment section.

Figure 3

UN-FAR Framework For The Environmental Safetu/Risk Assessment Of Crop Protection Products

Ecological Assessment



APPLICATION OF BIODEGRADATION INFORMATION TO ECOLOGICAL ASSESSMENT SAFETY TO THE TERRESTRIAL SYSTEM

One of the first questions to be addressed is what happens to the product after application and what species may be exposed during or following an application. From an ecological perspective, if a crop is in the field, exposure can occur to organisms associated with the crop, as well as the soil. These could include; honeybees which may be present to pollinate the crop; birds which might enter the field to consume the crop, insects or weeds associated with the crop; and earthworms and soil microflora associated with the soil.

Tests are routinely conducted to determine the contact toxicity to honeybees to ensure protection. This value is expressed as the LD50 (lethal dose to 50% of the population) in ug a.i./bee and this is compared to the exposure level based on the application rate. The conversion factor from application rate to exposure is 1 kg a.i./ha ~ 1 ug/bee. An estimate of safety is then determined by comparing the exposure to the bee contact toxicity which defines the contact hazard quotient (Q_{HC}) (EU Commission, 1996).

Immediately following application, exposure levels associated with the crop and avian food items which might be associated with the crop, are generally predicted using information which was assembled by Hoerger and Kenaga, 1972 as a first tier approach. The levels of exposure are based on empirical information from crop residue studies conducted on various crops. Estimates of potential exposure levels associated with insects and seeds are based on analogies of plant parts of approximately the same size, (i.e., seed and

pod producing crops). These predictions for each food type are summarized below in Table 3. The predicted environmental exposure (PEC) is based on these empirical data and the product application rate.

Table 3
Predicted Maximum Environmental
Concentrations in Avian Feed Items

<u>Feed Type</u>	<u>Exposure Factor*</u>
Leaves	31.3
Insects	small 29.5
	large 3.0
Seeds (grain)	2.9

*PEC = Exposure Factor X Application rate (Kg a.i./ha) = parts-per-million

These exposure values are compared to appropriate acute avian dietary information (LC₅₀, lethal concentration in the diet to 50% of the population) to determine the toxicity-to-exposure ratio (TER) and whether there is a sufficient margin of safety.

These assessments might also be performed in a tiered fashion if these simple assumptions indicate that a larger safety margin is warranted. Factors to consider would involve the degradation of the product on the crop, palatability of the treated wildlife food items and whether wildlife might avoid the field, completely. Assessments based on acute, short-term exposures, as well as long-term, chronic, exposures are performed if warranted. The need for the latter

assessment is based on the life-time of the product in the various environmental compartments.

Safety to the soil microflora is evaluated using a worst case soil (one low in organic matter content, e.g., sand or sandy loam) which will limit sorption of the product and maximize availability of the product to the soil microflora. Two tests are performed, one to evaluate potential effects on carbon cycle processes, the other on nitrogen. Both methods are described in further detail by OECD, 1996.

For the nitrogen mineralization test, lucerne meal (primarily alfalfa, *Medicago sativa*) having a carbon-nitrogen ratio (C/N) of between 12/1 and 16/1, is mixed with the soil in a ratio of 5 grams lucerne meal to 1 kilogram of soil. The soil is then treated with the test product at a rate commensurate with the anticipated soil exposure level in the field (e.g., the application rate, or some fraction or multiple of the application rate). After 14 days and 28 days of incubation, samples of treated and control soils are extracted with extraction solvent (e.g., 0.1M potassium chloride solution), and the quantities of nitrate in the extracts are determined. The rate of nitrate formed in treated soils is compared with that in control(s), and the percentage of deviation from the control group is calculated. The test runs for 28 days unless significant differences between treated and untreated soils are observed. In that case, measurements are continued to a maximum of 100 days. While this test also provides information on carbon mineralisation, as carbon-nitrogen bonds are broken in the biochemical processes, a second test is normally performed to look at the carbon mineralization process in further detail.

In the carbon mineralization test, sieved soil is either treated with test substance or left untreated (control). One test concentration is normally used

and chosen in relation with the application rate of the test substance in the field. After 14 and 28 days incubation, samples of treated and control soils are mixed with glucose, and the glucose induced respiration rates are measured for 12 consecutive hours. Respiration rates are expressed as carbon dioxide released (mg carbon dioxide/kg dry soil/hr) or oxygen consumed (mg oxygen/kg soil/hr). The respiration rate in treated soil is compared with that in control(s) and the percentage of deviation from the control is calculated. The test runs for 28 days unless significant differences between treated and untreated soils are observed. As with the nitrogen mineralization test, the measurements are repeated at various times, out to 100 days.

Combined these tests provide information which can also be used in understanding the overall biodegradation of the product in soil.

Lastly, earthworms are used as an indicator of safety to soil invertebrates. They are also used to assess bioaccumulation for products which may degrade slowly or materials with a high soil sorption or octanol-water partition coefficient. If the application is made to bare soil, 100% of the application is assumed to reach the soil. If a crop is present, it is assumed that 10% of the application reaches the soil. In both cases, a 5 cm depth is assumed to estimate the exposure with a soil density of 1.5 g/cc. Other factors considered in higher tier assessments would include the rate of degradation by the soil microflora, cultural activities which might limit earthworm presence (e.g., use of nitrogen fertilizers, tillage practices) etc.

APPLICATION OF BIODEGRADATION TO ECOLOGICAL

ASSESSMENT

MOBILITY AND SAFETY TO AQUATIC SYSTEMS

Mobility is sometimes estimated by an octanol-water coefficient, soil sorption/desorption coefficient or soil mobility ranking determined from soil column or soil thin-layer chromatographic (TLC) plate studies. From these studies classifications of mobility are sometimes assigned using the convention proposed by Helling, ranking materials as immobile, mobile, very mobile, etc. While, this information serves a purpose as a first tier approach to assess whether a material might move off-target due to storm events producing runoff, they alone do not provide a definitive answer but should prompt one to consider other factors. Factors to consider (Table 4) include the bodies of water associated with the intended agronomic use area, the application rate of the product, the method of application (spray application versus a seed treatment versus an in-furrow granular application), the fraction of material actually reaching the soil if applications are made to a plant canopy, the influence of degradation by the plant or soil microorganisms on the material and the likelihood of a storm event of sufficient size to allow runoff. These types of questions require additional information which is typically available as part of the environmental fate data package.

Table 4
Factors to Consider when Evaluating Safety to Aquatic Systems

- * Will the product be used in or near aquatic systems,
- * Product use information (application rate, cultivation practices, application method)
- * Use area (soil texture, organic matter content, pH, soil moisture holding capacity),
- * Crop (canopy coverage, affect on compound degradation, uptake from soil water),
- * Weather (historical information on typical, daily temperature, precipitation, etc.),
- * Product distribution (soil versus foliage),
- * Physical-chemical properties (water solubility, pKa, octanol-water partition coefficient),
- * Environmental fate properties (soil sorption, degradation by soil, plants, sunlight),
- * Weather conditions (rainfall, temperature, sunlight intensity).

Combined with information of the product's intended use pattern, weather data and the use of an appropriate model, an exposure assessment to predict the likelihood of product runoff can be done.

Over the past 2 decades a number of exposure models have been developed to address these questions in a regulatory framework (Table 5).

These include Plant Root Zone Model, Version 2, (PRZM), GLEAMS and SWRRBWQ (Resolve, 1992).

Table 5
Models Commonly Used by Regulatory

Agencies to Characterize Potential Aquatic Exposure

Runoff:	Plant Root Zone Model, Version 2 (PRZM2), GLEAMS, SWRRBWQ
Fate in Aquatic Systems:	EXAMS WASP

Additionally, even if some of the material should enter an aquatic system, other issues like its availability to organisms in the water column, and its residence time in the water need to be considered. This type of information is also generally available and can be used to predict the levels of potential exposure using aquatic fate models such as EXAMS and WASP. These models take into account both the distribution of the material in the water column and sediment using the soil sorption coefficient, and the fate of the material in both compartments using hydrolysis, photolysis and microbial data gather from laboratory studies (Resolve, 1992).

These two model types, a runoff model combined with an aquatic fate model, can then provide potential aquatic exposure levels (PEC's) based upon the model assumptions. It should also be noted that these predictions are performed following a tiered approach, starting with simple estimates based on

limited site data, to specific crop scenarios for a specific site, to probabilistic models which consider multiple sites, weather patterns, soil types, etc. The level of sophistication increases as one proceeds through the tiers and is only performed if issues regarding safety are not addressed at the lower tiers.

However, this is not where the assessment stops, what also needs to be considered is whether the level of predicted exposure is of consequence to those organisms associated with the aquatic system, and what exposure durations may occur. To do this evaluation, information is generated on the acute toxicity to fish, invertebrates and aquatic plants (OECD, 1993).

Typical species tested and end-points measured are summarized in Table 6.

Table 6
Aquatic Species Used for Acute Aquatic Testing

<u>Group</u>	<u>End-point</u>
Plant (green algae)	EC ₅₀
Invertebrate	EC ₅₀
Fish	LC ₅₀

These levels of toxicity are then compared to the predicted exposure levels to determine if an adequate margin of safety exists based on the TER.

Additionally, if repetitive use of the product exists, or its residence time in the environment is considered long, additional questions associated with chronic toxicity may be warranted and toxicity data associated with chronic

exposure would be generated using one of the fish and/or invertebrate species discussed above.

Other factors which would need to be considered include factors affecting the time weighted average of exposure, partitioning of material between sediment and water, ecological significance of a potential effect, and likely biological recovery time of the system.

Products which are applied directly to water, have an high octanol-water partition coefficient, and a long residence time in water, are reviewed for bioaccumulation potential. While a fish bioconcentration factor can be estimated from the octanol-water partition coefficient (Lyman *et al.*, 1982), as a first tier assessment, conclusions should not be drawn if bioconcentration is predicted to likely occur based on this approach alone. Rather, if this is indicated, a fish bioaccumulation study might be performed, as a higher tier study, to determine if uptake occurs, if the fish metabolizes the product and whether depuration occurs at a sufficient rate to address the question.

To be thorough, one other route of potential exposure associated with aquatic systems needs to be considered, that is exposure due to off-target movement at application, also called drift. In most countries, this type of exposure is estimated from empirical data and is dependent upon application method and crop. A commonly used source of information to make this estimate of exposure is summarized in Table 7 (Ganzelmeier, 1993a e 1993b). These data are used to estimate potential exposures which could occur to various off-field compartments (soil, water, etc.) to estimate whether this route of exposure is of significance. The same methods of assessment would be applied as those previously described above.

By combining the three key data bases, (product use information, environmental fate/physical-chemical and ecotoxicological data), an evaluation of the safety of the product in the environment can be performed.

Table 7
Off-target Exposure Values for Various

Crops/Cultures at Different Distances from the Treated Area [13, 14]

Distance (m)	Arable/Field Crops	Vineyards		Orchards		Hops
		With Leaves	Without Leaves	With Leaves	Without Leaves	
1	4.0	-	-	-	-	-
2	1.6	-	-	-	-	-
3	1.0	7.5	4.9	15.5	29.6	-
5	0.6	4.0	1.6	10	20	11
10	0.3	1.5	0.4	4	11	7.5
15	0.2	0.7	0.2	2.5	6	4.5
20	0.1	0.4	0.1	1.5	4	3.5
30	0.1	0.2	0.1	0.6	2	2
40	-	0.2	0.1	0.4	0.4	0.6
50	-	0.2	0.1	0.2	0.2	0.3

Conclusions

In conclusion, CPP manufacturers continue to search for low use rate products, that are specific, of low toxicity to non-target organisms, and readily degrade. The biodegradation and abiotic degradation data developed as part of the registration package for CPP products are developed early in the data development process towards the registration of a product to address a myriad of questions regarding the safe use of product in the environment. Safety assessments are accomplished by developing exposure scenarios, based on modeling when necessary and comparing those predicted environmental exposures (PEC's) against ecotoxicology end-points developed for species representative of the environmental compartments which might come in contact with the product. By doing this in a tiered process, the ecological assessment process can address the levels of safety afforded wildlife and identify those areas for potential improvement in the stewardship of the product.

References

- BARTHA, R.; D. PRAMER. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. *Soil Science*, v.100, p.68-70, 1965.
- EUROPEAN UNION COMMISSION. Commission Directive 96/12/EC; 8 March 1996, Ecotoxicology Data Requirements - Annexes II and III 91/414/EEC. *Official Journal of the European Communities*, n.L 65/20, Brussels, 1996.

- FAO. *Revised Guidelines on environmental criteria for the registration of pesticides*. Rome, 1989.
- GANZELMEIER, H. *Bewertung der Abtrift Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft*, v.292, p.174-183, 1993a.
- GANZELMEIER, H. Drift of plant protection products in field crops, vineyards, orchards and hops. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PESTICIDE APPLICATION TECHNIQUES, 2., 1993, Strasbourg. *Proceedings*. Strasbourg, 1993b. v.1, p.125-132.
- HANCE, R.J. ed. *Interactions between herbicides and the soil*. New York: Academic Press, 1980.
- HOERGER, F.D.; KENAGA; E.E. *Pesticides residues on plants - Correlation of representative data as a basis for estimation of their magnitude in the environment*. New York: Academic Press, 1972. p.9-28.
- LYMAN, W.J.; REEHL, W.E.; ROSENBLATT, D.H. ed. *Handbook of chemical property estimation methods*. New York: McGraw-Hill, 1982.
- LYNCH, M.R. *Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides*. Brussels: Society of Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC-Europe, 1995.
- OECD. *Draft proposal for a new guideline, soil microorganisms: nitrogen mineralisation test and carbon mineralisation test*. (TG9651.DOC. OECD), Paris, 1996.

RESOLVE. *Improving aquatic risk assessment under FIFRA*. Wildlife Fund/RESOLVE, Washington, D.C.: World Wildlife Foundation/RESOLVE, 1992.

US EPA. *Framework for ecological risk assessment*: EPA Risk Assessment Forum. Washington, D.C: EPA, 1992. (EPA/630/R-92/001).

US EPA. *Code of Federal Regulations*, Protection of Environment, 40, Parts 150 to 189, revised as of July 1, 1995. Washington: EPA, 1995.

REGULAMENTAÇÃO DE AGENTES BIOLÓGICOS PARA FINS DE BIOREMEDIAÇÃO: SITUAÇÃO BRASILEIRA

Mário Cesar B. de Oliveira. Engº Agrônomo - Consultor Técnico -
IBAMA/DIRCOF/DEAMB

O processo de registro de agrotóxicos, seus componentes e afins é regido pela Lei nº 7.802 de 11.07.89, Decreto nº 98.816 de 11.01.90 e Portarias complementares.

A Lei nº 7.802 de 11.07.89 - "Lei dos Agrotóxicos", dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Cabe aqui salientar que somente após a publicação dessa Lei, o órgão do meio ambiente passou a ter atribuições no processo de registro de agrotóxicos e afins, antes somente de competência do Ministério da Agricultura e do Abastecimento - MAA e Ministério da Saúde - MS.

O Decreto nº 98.816, de 11.01.90 regulamenta a Lei nº 7.802, de 11.07.89, e dá outras providências.

De acordo com o Artigo 2º da Lei nº 7.802, de 11.07.89, considerando-se:

I - AGROTÓXICOS E AFINS

a) 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 ou da fauna a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos;

b) Substâncias e produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento;

II - COMPONENTES: os princípios ativos, os produtos técnicos, suas matérias-primas, os ingredientes inertes e aditivos usados na fabricação de agrotóxicos e afins.

De acordo com o Decreto nº 98.816, há uma distinção entre as definições de agrotóxicos e afins, sendo os agrotóxicos considerados apenas os produtos químicos (inciso XX do Art. 2º), enquanto que os afins (inciso XXII do Art. 2º) são os produtos e os agentes de processos físicos e biológicos que tenham a mesma finalidade dos agrotóxicos, bem como produtos químicos, físicos e biológicos utilizados na defesa fitossanitária, domissanitária e ambiental, não enquadrados no inciso XX. Já o inciso XXIII define agente biológico de controle como organismo vivo, de ocorrência natural ou obtido através de manipulação genética, introduzido no ambiente para o controle de uma população ou de atividades biológicas de outro organismo vivo considerado nocivo.

Frente às disposições do artigo 2º, do Decreto nº 98.816, que regulamenta a Lei nº 7.802, relativa a agrotóxicos, seus componentes e afins, os produtos biotecnológicos - BIORREMEDIADORES, enquadram-se na definição do inciso XXII, ou seja, como **afins**, por se tratarem de produtos utilizados na defesa domissanitária e ambiental.

Consequentemente, de acordo com o estabelecido no *caput* do artigo 3º, da Lei nº 7.802, tais produtos “só poderão ser produzidos, exportados, importados, comercializados, e utilizados, se previamente registrados em órgão federal de acordo com as diretrizes e exigências dos órgãos federais responsáveis pelos setores de saúde, do meio ambiente e agricultura”.

Já no capítulo II - DAS COMPETÊNCIAS, do Decreto nº 98.816, têm-se:

- no inciso V, do artigo 4º, como atribuição do Ministério da Saúde: “conceder o registro a agrotóxicos, seus componentes e afins, destinados à higienização, desinfecção ou desinfestação de ambientes domiciliares, públicos ou coletivos, ao tratamento de água e ao uso em campanhas de saúde pública, atendidas as exigências do Ministério do Interior” (atualmente Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal - MMA);

- no inciso IV, do artigo 5º, que compete ao MMA “conceder o registro de agrotóxicos, seus componentes e afins destinados ao uso na proteção de florestas, de ambientes hídricos e outros ecossistemas, atendidas as diretrizes e exigências do Ministério da Saúde”.

Portanto, os biorremediadores são abrangidos pelas disposições da legislação referente a agrotóxicos, sendo o MMA e o Ministério da Saúde incumbidos da concessão de registro de acordo com a finalidade de uso dos mesmos.

Salientamos que produtos contendo agentes biológicos manipulados geneticamente estão sujeitos às disposições da Lei nº 8.974, de 05.01.95, regulamentada pelo Decreto nº 1.752, de 20.12.95.

Para uma empresa obter registro do seu produto fitossanitário, deverá encaminhar requerimento de registro, acompanhado de toda a documentação necessário ao:

IBAMA: (produtos para uso na proteção de florestas, em ambientes hídricos e outros ecossistemas). Neste caso, o órgão avaliará, primeiro, a eficiência e, ao mesmo tempo em que envia o Relatório Técnico II para o Ministério da Saúde para sua avaliação toxicológica, realiza a avaliação ambiental do produto. Ao receber o resultado da avaliação toxicológica do Ministério da Saúde, e tendo finalizado a sua avaliação ambiental, o IBAMA concluirá a apreciação do pedido de registro.

MINISTÉRIO DA SAÚDE: (produtos de uso em ambientes domiciliares, públicos ou coletivos). O órgão avaliará a eficiência e o risco à saúde humana do produto, enviando, posteriormente, o Relatório Técnico III para o IBAMA, para sua avaliação ambiental. O IBAMA enviará o resultado da avaliação ambiental do produto ao Ministério da Saúde, que por sua vez concluirá a apreciação do pedido de registro do produto.

INFORMAÇÕES E TESTES NECESSÁRIOS PARA AVALIAÇÃO AMBIENTAL DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS

1. Composição quali-quantitativa, identificando e quantificando todos os componentes do produto, incluindo possíveis contaminantes. Informar a(s) função(ões) específica(s) de cada componente.

2. Caracterização do(s) microrganismo(s) utilizado(s) na obtenção do produto, incluindo: classificação taxonômica, procedência, informações sobre o ciclo biológico, características específicas e método de identificação, com os respectivos limites de detecção.
3. Efeitos adversos - toxicidade, sobre organismos não-visados (mamíferos, aves, organismos de solo, água doce, marinhos e de estuário).
4. Propriedades físico-químicas: cor, estado físico, odor miscibilidade, pH, densidade específica, estabilidade (à luz, em diferentes pHs e temperaturas e ao ar), viscosidade e solubilidade em água.
5. Controle de qualidade do produto: O fabricante deve atestar a composição química e/ou microbiológica do produto a ser registrado e garantir a ausência de substâncias ou microrganismos indesejados (patogênicos e/ou geneticamente modificado). Descrição básica do processo de produção, material inicial e intermediário. Procedimento adotado para limitar contaminações e procedimentos para uniformidade e padronização.
6. Informações sobre as metodologias aplicáveis para monitoramento e controle ambiental.
7. Informações sobre registro e autorização de uso em outros países, inclusive o de origem, ou razões do contrário.
8. Forma de apresentação (pó molhável, pó seco, concentrado emulsionável, ...)
9. Tipo e características da embalagem.
10. Modalidade de emprego (usos indicados).

11. Instruções detalhadas de uso, incluindo para cada indicação: dose utilizada, forma de preparação de diluição (se cabível), número e intervalo de aplicações, técnica de aplicação, medidas/advertências, e restrições de uso.
12. Estudos de comprovação de eficiência do produto de acordo com a finalidade de uso. Mecanismo de ação frente aos diferentes substratos, indicando possíveis subprodutos da degradação. Informações sobre os possíveis efeitos toxicológicos dos subprodutos ou produtos intermediários, sobre organismos não-visados. Persistência dos subprodutos.
13. Método detalhado de desativação e instruções técnicas sobre a destinação final de resíduos do produto e de suas embalagens.
14. Informações detalhadas quanto às ações emergenciais a serem adotadas em caso de acidentes ambientais envolvendo o produto.
15. Forma de venda (direta, revenda,...) e de assistência técnica ao usuário.
16. Apresentar em português ou inglês os laudos técnicos completos dos testes já executados.
17. A empresa deverá encaminhar a este Instituto um requerimento de solicitação de registro do produto, anexando cópia do DUA (Documento Único de Arrecadação) comprovando o recolhimento da taxa de 1.000 UFIR's e certificado de análise físico-química.
18. Comprovante de registro da empresa em órgão competente estadual.
19. Declaração que o produto não contém agentes biológicos manipulados geneticamente.

DEGRADAÇÃO DE ^{14}C -ATRAZINA EM CONDIÇÕES DE
AMPO. BRIGIDA FIMMENTE VILLAR DE QUEIROZ¹, REGINA
IRESA ROSIM MONTEIRO², PETER BURANEL², ANDREAS
AIS² (CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA,
V. Centenario, C.P. 96, CEP 13400-970 Piracicaba, SP; ²INSTITUT
JR. RADIAGRONOMIE - KFA - JOSEPH ALFELDIA,
egradation the ^{14}C -atrazine in field conditions.

enzima radiomarcada uniformemente em seus carbonos do anel 13, aplicada
a 200g de solo, na dose de 500 ou 0,5ml/m². O $^{14}\text{CO}_2$ desprendido a cada
hora das, durante 150 dias foi captado através de armadilhas no qual sodado.
As quais foram submetidas ao ataque ácido para liberação do $^{14}\text{CO}_2$, e
posteriormente analisadas através de cintilometria líquida. O sistema foi
colocado e inserido na altura do solo em uma plantação de milho na Estação
Experimental de Litoro do **RESUMOS** dos resíduos, que
foram frações do solo apresentaram cerca de 12% de descoloração, 86% de
oxidação e 24% de resíduos não oxidados, sendo que destes a maior
oxidação observada foi na fração dos ácidos solúveis. Houve aumento no
aprendimento de $^{14}\text{CO}_2$ após 45 dias de incubação, diminuindo em seguida
alcançando 36% em relação ao aplicado no final do período. Os resultados
da degradação de atrazina na literatura, realizados a temperaturas próximas
20-25°C em laboratório, mostra que o desprendimento de CO_2 do solo de
0 dias são inferiores a 1%.

DEGRADAÇÃO DE ^{14}C -ATRAZINA EM CONDIÇÕES DE CAMPO. BRIGIDA PIMENTEL VILLAR DE QUEIROZ¹; REGINA TERESA ROSIM MONTEIRO¹, PETER BURANEL², ANDREAS WAIS² (¹CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA, Av Centenário, C.P. 96, CEP 13400-970 Piracicaba, SP; ²INSTITUT FÜR RADIAGRONOMIE - KFA - JÜLICH, ALEMANHA).
Degradation the ^{14}C -atrazine in field conditions.

Atrazina radiomarcada uniformemente em seus carbonos do anel foi aplicada em 200g de solo, na dose de 5l/ha ou 0,5ml/m². O $^{14}\text{CO}_2$ desprendido a cada quinze dias, durante 150 dias foi captado através de armadilhas de cal sodada, as quais foram submetidas ao ataque ácido para liberação do $^{14}\text{CO}_2$ e posteriormente analisados através de cintilometria líquida. O sistema foi incubado e enterrado até altura do solo em uma plantação de milho na Estação Experimental de Lisímetro do CENA. O fracionamento dos resíduos nas diferentes frações do solo apresentou cerca de 12% de dessorvido, 46% de extraído e 24% de resíduos não-extraído, sendo que destes a maior concentração observada foi na fração dos ácidos fúlvicos. Houve aumento no desprendimento de $^{14}\text{CO}_2$ até os 45 dias de incubação, diminuindo em seguida e alcançando 36% em relação ao aplicado no final do período. Os resultados sobre degradação de atrazina na literatura, realizados a temperatura constante à 20-25°C em laboratório, mostra que o desprendimento de CO_2 ao redor de 30 dias são inferiores à 1%.

MINERALIZAÇÃO DE ATRAZINA EM MEIO DE CULTURA DE MICROORGANISMOS OBTIDOS POR CULTURA DE ENRIQUECIMENTO DO SOLO. M. A. ALBUQUERQUE¹, A. C. JOHNSON² & M. WOOD³ (¹Dept. Solos, Universidade Federal de Viçosa, 36 571-000, Viçosa, MG; ²Institute of Hydrology, Wallingford, England; ³Dept. of Soil Science, University of Reading, England). Mineralization of atrazine in nutrient medium by soil enrichment microorganisms.

Culturas mistas de bactérias do solo que mineralizam o anel de triazina da atrazina foram obtidas através da técnica de cultura de enriquecimento do solo. O meio nutritivo (BCSA) utilizado conteve atrazina como única fonte de Nitrogênio, e sacarose e citrato como fontes de Carbono. O inóculo utilizado para o enriquecimento foi uma amostra de 5 g de solo fresco em 20 ml de meio nutritivo. Repicagens de 0.5 ml em 20 ml de meio nutritivo fresco foram feitas a cada 2 semanas por 2 meses. Os resultados da análise do desaparecimento da atrazina por HPLC na segunda e terceira repicagens, após 15 dias de incubação, foram, respectivamente, 36% e 38%. Na quarta repicagem, o desaparecimento foi de 42% após 7 dias de incubação. No controle (sem microorganismos) o desaparecimento da atrazina foi menor que 10%. A cultura mista obtida demonstrou metabolismo do anel de triazina-¹⁴C com evolução de ¹⁴CO₂. O meio nutritivo sem inóculo não mostrou evolução de ¹⁴CO₂ do anel aromático. A presença de NH₄NO₃ no meio nutritivo inibiu a mineralização do anel aromático a CO₂. Isto sugeriu que o anel de triazina serviu como fonte de Nitrogênio para os microorganismos na ausência de Nitrogênio inorgânico. A radioatividade no meio de cultura, filtrado em millipore 0.2 µm, após 2 semanas de incubação, foi de 59%, mostrando que, além da radioatividade perdida pelo ¹⁴CO₂, aproximadamente 40% da radioatividade tinha sido incorporada pelas células microbianas.

DEGRADAÇÃO DO FUNGICIDA CARBENDAZIM E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MUTANTES DE *Trichoderma harzianum*. I.S. MELO¹; C.M.M.S. SILVA¹; A.C.F. SILVA²; J.L.FAULL³ (¹EMBRAPA-CNPMA, Jaguariúna, SP.; ²CENA/USP, Piracicaba, SP; ³Birkbeck College, Universidade de Londres, UK.)

Dentre os fungicidas com ação sistêmica, os benzimidazóis são os mais conhecidos devido às suas propriedades e eficácia no controle de doenças de plantas. O benomil (metil-1 (1-(butilcarmaboil) 1H-benzimidazol-2-ilcarbamato) é extensivamente usado na agricultura e o carbendazim (MBC), produto de hidrólise do benomil, é um composto estável, insolúvel em água e um fungicida menos sistêmico que o benomil. Estes produtos, imóveis no solo, interferem na mitose dos fungos, agindo principalmente nos microtúbulos. Através de irradiação com luz ultra-violeta foram obtidos mutantes resistentes a benomil, a partir de uma linhagem sensível de *T. harzianum*. Um mutante 2B₂, quando crescido em meio de cultura líquido contendo carbendazim como fonte de carbono, apresentou uma taxa de degradação do fungicida da ordem de 41% e 61% aos 5 e 10 dias, respectivamente. Os mutantes resistentes a benomil, quando caracterizados por RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA- polymerase chain reaction) usando *primers* específicos, geraram RAPDs que permitiram diferenciá-los das linhagens sensíveis. Citologicamente, as linhagens mutantes apresentaram conídios maiores quando comparadas à linhagem selvagem (LS) enquanto que o mutante 2B₆ apresentou conídios binucleados diferindo da linhagem LS uninucleada.

INFLUÊNCIA DO TEOR DE CARBONO NA DEGRADAÇÃO DE ^{14}C -TRIFLURALINA EM SOLOS. CELLA, A. C.¹; STORINO M.² & MONTEIRO, R. T. R.¹ (¹Seção de Ecologia, CENA/USP, C.Postal 96, 13400-970 Piracicaba, SP; ²Seção de Projetos e Materiais, Div. Engenharia Agrícola, C.Postal 26, 13200-970. Jundiaí, SP). Effect of carbon content on the biodegradation of ^{14}C -trifluralin in soils.

Biodegradação de ^{14}C -trifluralina, estudada em seis diferentes tipos de solos da região de Piracicaba/SP, mostrou meia vida de 90 a 180 dias . O desprendimento de $^{14}\text{CO}_2$ mostrou uma correlação direta com o teor de carbono dos solos, ocorrendo maior desprendimento no solo com baixo teor de carbono. A mobilidade do herbicida determinada por cromatografia de camada delgada de solo e por colunas mostrou ser imóvel em todos os tratamentos, não havendo efeito do pH, tipo de solo e concentração do produto. A distribuição dos resíduos nas frações granulométricas mostrou grande afinidade para os constituintes da fração < 0,053mm, onde predomina silte, argila e compostos orgânicos em estado adiantado de decomposição.

BIOACUMULAÇÃO E COTRANSPORTE DO ACARICIDA DICOFOL PELA *Pseudomonas fluorescens*. B. BRUNNINGER,¹ B. C. VASCONCELLOS,² S.J. MACIEL, T. LANGENBACH; Instituto de Microbiologia, UFRJ, CCS Bl I, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, CEP 21944, Rio de Janeiro; E-mail: IMMGLAG@microbio.ufrj.br.

O uso de xenobiontes no ambiente pode implicar em problemas ambientais decorrentes da contaminação do solo, ar e dos lençóis d'água. A questão de como xenobiontes hidrofóbicos podem atingir lençóis d'água ainda não é bem conhecida. Embora os xenobiontes hidrofóbicos possam ser biodegradados pelos microrganismos, também são intensamente adsorvidos na matéria orgânica do solo ou podem ser bioacumulados por microrganismos, e neste caso sua persistência no ambiente é aumentada. Quando os xenobiontes estão bioacumulados nos microrganismos e estes por sua vez podem se movimentar por força de arraste da água ou por movimentos próprios, ocorre o cotransporte destas substâncias. Desta forma os microrganismos podem funcionar como uma partícula coloidal capaz de transportar xenobiontes a ela adsorvidos como já foi observado em aquífero arenosos. O objetivo deste trabalho é observar se há cotransporte do Dicofol - acaricida organoclorado - por um determinado microrganismo introduzido em colunas de solo superficial ricas em matéria orgânica, pelos quais os xenobiontes precisam passar para alcançar as camadas mais profundas sobretudo os lençóis d'água. As condições experimentais incluem a simulação de chuvas torrenciais, características de nosso clima, sobre as colunas de solo para a observação do cotransporte do Dicofol pelo microrganismo no processo de lixiviação. Para evitar alterações na matéria orgânica do solo, introduzidas por técnicas de esterilização como a autoclave, utilizou-se a *Pseudomonas fluorescens* (Br 12), geneticamente engenheirada resistente aos antibióticos Canamicina e Rifampicina, que permite o rastreamento deste microrganismo sem esterilidade. Os resultados mostram pequeno cotransporte do Dicofol pelas bactérias mas uma importante perda desta substância da célula para o solo. Como não há alteração devido a pressão

osmótica, sugerimos que a perda do ^{14}C -Dicofol da célula para o solo ocorre por partição preferencial. Conclui-se por isto, que o solo superficial funciona como filtro reduzindo muito o cotransporte de xenobiontes por microrganismos quando comparado a aquíferos arenosos desprovidos de matéria orgânica. A partição preferencial dos xenobiontes dos microrganismos para o solo, pode explicar porque estes produtos tem pequeno efeito sobre a atividade microbiana como já é amplamente registrado na literatura.

Apoio Financeiro: CNPq, IBAMA, DLR.

ISOLAMENTO E COMPORTAMENTO DE RHIZOBACTÉRIAS RESISTENTES AO HERBICIDA DIURON. M.R.A., ROQUE¹; I.S., MELO¹; D.M.Y., YANO², R.T.S., FRIGUETTO¹, V., ALVES¹. (¹EMBRAPA-CNPMA-UNESP, Cx.Postal 69, 13820-000, Jaguariúna, SP, Brasil; ²Instituto de Biologia - UNICAMP).

O herbicida 3-(3,4-diclorofenil) 1,1-dimetiluréia (diuron), é utilizado em várias culturas, e aplicado em extensas áreas no Estado de São Paulo, principalmente em cana-de-açúcar. Apresenta alta persistência, fitotoxicidade e adsorção no solo. Devido a baixa degradação química, uma das principais alternativas para a degradação do produto no solo é através do metabolismo microbiano. Este trabalho teve como objetivos, o isolamento de rhizobactérias da rizosfera de cana-de-açúcar onde o herbicida tem sido aplicado por um longo período, e estudos de comportamento destas linhagens em meio mineral + diuron. Foi utilizado o método de diluição seriada e plaqueamento em meio mineral + diuron (200 µg/ml) para isolamento. Entre as várias linhagens obtidas, D1-9, D2-5, D5-6, D11-9, D12-12, D12-14, D12-18, D13-3, D16-2, D16-13 foram selecionadas para testes de metabolismo do diuron. Após seleção primária, em meio mineral + diuron 20, 50 e 100 µg/ml, a linhagem D12-12, gram negativa, aeróbia, citrato positiva, na forma de bastonetes curtos e grossos, apresentando colônia circular, superfície lisa e coloração creme claro, foi utilizada para testes com o diuron como fonte de carbono, nitrogênio, ou dos dois nutrientes. Para isto a linhagem foi cultivada nos seguintes meios de cultura: 1. Meio Mineral (K_2HPO_4 - 2g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ - 0,1g; NaCl - 0,1g; $FeCl_3$ - 0,01g; NH_4NO_3 - 0,5g; H_2O

destilada - 1000 ml.) + 20, 50 e 100 mg/l de diuron, **2. Meio Mineral** (- NH_4NO_3) + diuron (0, 20, 50 e 100 mg/l) + glicose (0,5%) e **3. Meio mineral + diuron** (0, 20, 50, 100 mg/ml) + glicose (0,5%). Os resultados obtidos demonstraram que a linhagem apresenta uma fase de adaptação de 120 horas a partir da qual há aceleração do crescimento independente da concentração do diuron. O melhor crescimento foi obtido no meio suplementado com diuron e NH_4NO_3 , demonstrando que houve influência da fonte de nitrogênio. A glicose como fonte de carbono e energia, diminuiu o período de adaptação, mas não manteve a fase de crescimento logarítmico, decrescendo após 120 horas, resultando a morte da colônia. O meio mineral + diuron, apesar de ter mostrado uma fase de adaptação prolongada, foi o tratamento que apresentou um crescimento mais homogêneo nas dosagens de 20, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$.

BIODEGRADAÇÃO DO HERBICIDA ATRAZINA POR LINHAGENS DE *Penicillium* e *Eupenicillium*. I.S. MELO¹; C.M.M.S. SILVA¹; E. FAY¹; A.M.R. CASSIOLATO² & A.C. ROSAMIGLIA¹ (¹EMBRAPA-CNPMA) Jaguariúna, SP.; ²UNESP, Ilha Solteira, SP).

O herbicida atrazina [2-cloro-4-(etilamino)-6-isopropilamina]-5-triazina] é usado em várias culturas agrícolas em todo mundo e, devido a sua detecção em águas superficiais e subterrâneas, sua degradação e metabolismo são objetos de estudo por parte de muitos laboratórios. O objetivo do presente estudo foi identificar e caracterizar microrganismos degradadores de atrazina, isolados de solos. Dentre os microrganismos isolados, vinte e nove fungos filamentosos, pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Eupenicillium*, foram capazes de degradar o herbicida, quando crescidos em meio de cultura contendo atrazina como única fonte de carbono. Uma linhagem de *P. crustaceum* foi capaz de degradar mais de 90% em apenas 7 dias. A extração foi feita com acetato de etila e o consumo da atrazina avaliado através de Cromatografia Gasosa com Detecção Termiônica específica a nitrogênio e fósforo. Uma formulação a base de alginato, caulim e esporos de *Penicillium crustaceum* foi desenvolvida; cuja viabilidade alcançou um período de seis meses, a temperatura ambiente. Estudos sobre biodegradação no solo com o produto granulado estão sendo acompanhados, assim como dados sobre caracterização citológica e genética do fungo degradador serão discutidos.

maior parte dos produtos são eliminados rapidamente, mas há uma transformação mas não a eliminação do problema, já que observa-se a formação de grande número de organoclorados contaminando o ar e os lençóis d'água, tornando quase impossível uma avaliação dos riscos toxicológicos. Métodos de respiração de microrganismos mostraram uma redução da atividade microbiana ao longo do tempo nas amostras com HCl e mais ainda nos solos com HCl e cal, o que torna a bioremediação mais difícil. Apoio financeiro: Projeto CIAMB - PADCT/PNEP - CNPq, FUB.

DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA MICROBIANA EM SOLO TROPICAL ATRAVÉS DA TÉCNICA DE FOSFOLIPÍDEOS.

JANETE BRIGANTE & SIONI MALUF BARBIERI (Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, CCBS, UFSCar; pjan@iris.ufscar.br; Departamento de Genética e Evolução, CCBS, UFSCar, São Carlos, SP; sioni@power.ufscar.br). Microbial Biomass Determination in Tropical Soil by Phospholipids Method.

Neste trabalho avaliou-se os efeitos da atrazina sobre os microrganismos do solo, comparando a eficiência de duas técnicas de enumeração. A biomassa microbiana através dos fosfolipídios foi comparada com o número mais provável de microrganismos. Amostras de solo (campo) pelo NMP, mostraram valores populacionais de $13,7 \times 10^4$ e $2,4 \times 10^4$ enquanto que a biomassa, $2,46 \times 10^9$ e $1,83 \times 10^9$ células/g de solo, para 10 e 20 dias de incubação, respectivamente. Em laboratório, o NMP mostrou valores de $1,85 \times 10^5$ e $4,05 \times 10^5$ enquanto que, a biomassa celular registrou valores de $1,63 \times 10^9$ e $1,03 \times 10^9$ células/g de solo. Pode-se notar, então, uma maior precisão do número populacional pela técnica dos fosfolipídios.

Suporte Financeiro: FAPESP

POLUIÇÃO DE VOLÁTEIS E LIXIVIADOS EM SOLO CONTAMINADO COM BHC. P. Österreicher-Cunha¹, J.P.M. Torres², A. R. Wagner³, T. Langenbach¹. ¹Inst. Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ; ²Inst. Biofísica Prof. Carlos Chagas, UFRJ; ³Depto. Química, PUC. RJ, Brazil.

Uma grande quantidade de hexaclorociclohexano (HCH), cobrindo uma grande área e deixado a céu aberto, permaneceu no local onde foi desativada e mais tarde demolida uma fábrica de lindane. Passados mais de 40 anos, o problema foi recentemente retomado pelas autoridades devido a uma crescente conscientização dos altos riscos de contaminação da população, dos animais e dos produtos agrícolas da região. Com o intuito de descontaminar a área, o Ministério da Saúde fez um tratamento com cal (CaO e MgO) adicionado ao HCH, em mistura grosseira com o solo, usando um trator. O presente trabalho visa avaliar as condições atuais no local, identificando, em um primeiro tempo, os produtos dessas reações que volatilizam e lixiviam, contaminando o ar e os lençóis de águas profundas. Devido à grande heterogeneidade das amostras colhidas diretamente no local, a situação *in situ* foi simulada no laboratório. Para isto foram usados microcosmos com uma mistura controlada de 4% de HCH em solo não contaminado colhido na mesma área e 4% de cal; estes microcosmos são sistemas nos quais as condições de ventilação, quantidade de água (200 mm/mês) e temperatura (20°C) podem ser controladas. Regularmente, colhe-se o lixiviado com vácuo de 100 mBahr e os produtos voláteis em armadilhas químicas, para serem em seguida extraídos com hexano e analisados por cromatografia gasosa (CG) e espectrometria de massa (GC-MS). As análises mostraram que o HCH desaparece progressivamente a medida que outros produtos, com menor número de átomos de cloro, vão surgindo, tais como o pentaclorohexeno, o tetraclorociclohexadieno, o triclorobenzeno e o diclorofenol; muitos destes produtos são fenóis cuja solubilidade mais alta permite uma maior difusão até os lençóis d'água. Podemos concluir então que há uma transformação mas não a eliminação do problema, já que observa-se a formação de grande número de organoclorados contaminando o ar e os lençóis d'água, tornando quase impossível uma avaliação dos riscos toxicológicos. Medidas de respiração de microrganismos mostraram uma redução da atividade microbiana ao longo do tempo nas amostras com HCH e mais ainda nos solos com HCH e cal, o que torna a bioremediação mais difícil. Apoio financeiro: Projeto CIAMB - PADCT/FINEP; CNPq; FUJB.

UTILIZAÇÃO DE BENOMIL COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO POR BIÓTIPOS DE *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride*, OBTIDOS POR RADIAÇÃO γ . SILVA, A. C. F.¹; MONTEIRO, R. T. R.² & MENTEN, J. O. M.³ (^{1,2} Seção de Ecologia, CENA/USP, Piracicaba, SP; ³Depto de Fitopatologia, ESALQ/USP, Piracicaba, SP). The use of benomyl as carbon source by biotypes of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride*, obtained by γ radiation.

Catorze biótipos de *T. harzianum* e um de *T. viride* resistentes a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do fungicida benomil e apresentando diferenças em relação as características de antibiose e a resistência a alguns fungicidas, obtidos por radiação γ , foram ensaiados para crescerem em meio mínimo utilizando benomil como única fonte de carbono. Suspensões de conídios e micélios de cada um dos biótipos foram colocadas para incubar por 7 dias, em meio mínimo e meio mínimo (na ausência de dextrose) suplementado com 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do fungicida benomil. A cada 7 dias foram transferidas aliquotas das suspensões de micélio e conídios dos tratamentos com meio mínimo suplementado com benomil para novos tubos de ensaio contendo benomil como fonte de carbono e para tubos com meio mínimo com dextrose (controle). Este procedimento foi repetido 5 vezes. Após 5 transferências sucessivas de suspensões de micélio e conídios para meio mínimo com benomil como fonte de carbono, suspensões de esporos ($\pm 10^7$ esporos/ml) de cada biótipo foram transferidas para 100 ml de meio mínimo com benomil como única fonte de carbono. A avaliação consistiu do peso seco micelial após 14 dias de incubação a 25 °C em B.O.D. Os resultados mostram que os biótipos de *T. harzianum* e *T. viride* resistentes ao benomil são capazes de utilizar o benomil como fonte de carbono, não sendo observado diferenças estatísticas em relação ao peso seco micelial dos mesmos. Portanto esta resistência é dada pela transformação do produto para compostos não tóxicos.

REQUISITOS NUTRICIONAIS PARA O FUNGO *Alternaria alternata*. C.M.M. S. SILVA & I.S.MELO. (EMBRAPA-CNPMA, C.P. 69, 13820-000, Jaguariúna, SP).

Uma linhagem de *Alternaria alternata*, isolada como degradadora de carbendazim, foi avaliada quanto ao crescimento e esporulação, visando encontrar um meio sintético adequado para seu cultivo em larga escala. As espécies de *Alternaria*, em geral, são exigentes do ponto de vista nutricional. O fungo foi cultivado em meio sintético com diferentes fontes de carbono, nitrogênio e vitaminas. O crescimento radial foi avaliado durante sete dias após a semeadura e a avaliação da esporulação foi efetuada no décimo dia de incubação. O meio sintético básico suplementado com biotina, NH_4Cl e os carboidratos glicose e maltose suportaram bom crescimento micelial de *Alternaria alternata* (em média 0,75 cm/dia). Outros substratos como galactose e arabinose produziram pequenas quantidades de micélio, enquanto as fontes de carbono restantes apresentaram taxas de crescimento semelhantes, indicando que não houve efeito significativo na utilização dos substratos pela linhagem fúngica. A produção de conídios apresentou comportamento diferenciado dependendo da fonte de carbono. Na presença de galactose ($0,50 \times 10^{-4}$ conídios/ml) e arabinose ($0,41 \times 10^{-4}$ conídios/ml) observou-se maior número de conídios, enquanto na presença de sacarose não houve desenvolvimento dos mesmos. No entanto, não houve diferenças significativas quanto ao efeito das fontes de vitamina e fontes de nitrogênio no crescimento e esporulação.

COMPOSTAGEM NATURAL DO LIXO DOMICILIAR URBANO ATRAVÉS DE LEIRAS ESTÁTICAS E REVOLVIDAS. P. FORTES NETO¹ & P.A.SELBACH² (¹Dept. Ciências Agrárias, Univ. Taubaté, R. Quatro de Março, nº 432, 12020-270, Taubaté, SP; ²Faculdade de Agronomia., Univ. Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS). Natural composting of urban solid wastes in mixed and static piles.

Visando avaliar a eficiência do revolvimento de leiras através da monitoração do processo de compostagem natural do lixo urbano e de algumas características químicas, físicas e biológicas do composto produzido, foi desenvolvido o presente estudo com leiras de compostagem a céu aberto com aplicação dos seguintes tratamentos: sem revolvimento, com revolvimento quinzenal e com revolvimento semanal. Os resultados mostraram que as variações das temperaturas no tratamento sem revolvimento, foram semelhantes aos tratamentos com revolvimento e suficientes para reduzir a população de coliformes totais e fecais em todos os tratamentos. O tratamento sem revolvimento foi mais eficiente na conservação dos nutrientes (N, P, K, Ca e Mg), entretanto, necessitou 15 dias mais para atingir o ponto de maturação. A população microbiana (bactérias e fungos) foi maior nos tratamentos com revolvimento, e a densidade do material apresentou uma evolução uniforme para os três tratamentos com uma alta correlação em relação ao tempo. Pelos resultados obtidos o não revolvimento proporcionou a obtenção de um composto com melhores características químicas e condições sanitárias adequadas para o uso no solo.

DEGRADAÇÃO E INFLUÊNCIA DO PENTACLOROFENOL (PCP) NO DESEMPENHO DE REATORES ANAERÓBIOS ALIMENTADOS SEMI-CONTINUAMENTE, INOCULADOS COM LODOS DE DIVERSAS PROCEDÊNCIAS. DAMIANOVIC, M.H.R.Z.; BOLAÑOS, R.M.L.; FORESTI, E. (Departamento de Hidráulica e Saneamento - Escola de Engenharia de São Carlos - USP, Avenida Dr Carlos Botelho, 1465 - CEP 13560-970 - São Carlos, SP). Degradation and influence of PCP on the performance of semi-continuous anaerobic reactors with inoculated with sludge from different sources.

Estudou-se a degradação de PCP e sua influência no desempenho de reatores anaeróbios alimentados semanalmente, através da determinação cromatográfica do PCP e metabólitos e de parâmetros físico-químicos como pH, ácidos voláteis e DQO, respectivamente. A concentração de PCP variou de 0,05 a 10,0 mg/L. Foram utilizados 5 reatores em borosilicato com volume de 2,5 L, mantidos sob agitação. Os reatores foram inoculados com R_1 : Lodo aeróbio e sedimento próximo ao lançamento de indústria de papel e celulose; R_2 : lodo de reator UASB de indústria de reciclagem de papel; R_3 : lodo de biodigestor anaeróbio de estação de tratamento de esgotos sanitários e industriais; R_4 : mistura dos lodos anteriores; R_5 : mistura dos demais, omitindo-se PCP. O reator R_5 foi utilizado como controle. Os resultados das determinações físico-químicas indicaram que o PCP não interferiu nos parâmetros de desempenho estudados. Na concentração de 0,2 mg/L de PCP, no reator R_1 foram detectados os metabólitos DCP, TCP, TeCP, além do PCP, enquanto nos demais detectou-se apenas TeCP e PCP. A partir da concentração de 1,5 mg/L não foram detectados metabólitos no reator R_2 . Na concentração de 1,5 mg/L detectou-se CP no reator R_4 , enquanto nos demais, o metabólito menos clorado foi TCP. Na concentração de 3,0 mg/L foram detectados CP e PCP no reator R_1 e, nos demais, TeCP e PCP. Quando foi mantida a concentração de 10,0 mg/L, detectou-se TeCP apenas no reator R_1 , enquanto que nenhum metabólito foi detectado nos demais. Os resultados indicaram que o lodo do reator R_1 apresentou melhor capacidade de degradar PCP devido à formação de metabólitos menos clorados, mesmo em concentrações mais elevadas.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBIANA EM FUNÇÃO DA ADIÇÃO DE LODO INDUSTRIAL AO SOLO. F.S.FADIGAS, D.M.F.OLIVEIRA, J.T.TAVARES, J.A.COSTA & J.A G. SANTOS (UFBA/Escola de Agronomia,C.P.082, 44380-000,Cruz das Almas, BA).
Evaluation of microbial activity as result of addition of industrial sewage in the soil.

Devido a importância da ação biodegradadora dos microorganismos, este trabalho foi desenvolvido na EAUFBFA para avaliar o comportamento da população microbiana de um solo da classe textural areia-franca, com baixos teores de Ca e Mg, da região de Camaçari-BA em função da adição de resíduo de esgoto industrial (lodo), processado pela CETREL S/A. Foram avaliadas duas doses de lodo sólido e líquido (0,6 e 1,8 e 10 e 20 mL/200 g de solo, respectivamente), na ausência e presença de calcário dolomítico (o suficiente para elevar a saturação por bases a 50 %), incubadas durante 45 dias sob fluxo contínuo de ar isento de CO₂, com uma umidade de 40 % da capacidade de saturação. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Frascos de vidro de 500 mL contendo 200 g de solo, foram conectados a tubos de ensaio, contendo 25 mL de NaOH 0,1 mol.L⁻¹, para capturar o CO₂ liberado. A dosagem do C-CO₂ evoluído (µg.g⁻¹ solo) foi feita por titulação do NaOH dos tubos com HCl 0,1 mol.L⁻¹. As análises foram realizadas diariamente até o 11º dia e em intervalos de 4 dias até o final da incubação. Analisou-se também o teor de carbono residual no solo. Com base nos resultados observou-se diferença entre os teores iniciais e finais de carbono no solo para todos os tratamentos. Maior atividade microbiana no solo foi verificada nos tratamentos com adição de lodo, não havendo diferença significativa entre tratamentos com lodo líquido e lodo sólido. O aumento na quantidade de lodo aplicado ao solo resultou em aumento da atividade microbiana, medida pelo CO₂ evoluído.

CONTAMINAÇÃO POR METAIS PESADOS EM SOLO E CANA-DE-AÇÚCAR PELA APLICAÇÃO DE LODO DE ESGOTO. I.EFEITO IMEDIATO.

F.C.da SILVA¹, A.E. BOARETTO², R.S. BERTON³, C.A. PEXE⁴ & H.B. ZOTELLI⁴

(¹EMBRAPA/CNPSolos, R. Jardim Botânico - 1024, CEP 22.460-000, Rio de Janeiro, RJ; ²USP/CENA, CP 96, Piracicaba, SP; ³IAC, CP 28, Campinas, SP; ⁴Usina Costa Pinto S.A., Piracicaba, SP). Contamination of heavy metals in the soil and Sugar Cane by application of sewage sludge. I.effect immediate.

Com o objetivo de avaliar o efeito imediato do 'lodo de esgoto'-Le, gerado na E.R.Q. de Barueri-SP da SABESP, em contaminação por metais pesados no sistema solo-planta pela sua aplicação em soqueira e no plantio da cana de açúcar (var.RB 72-454), instalou-se dois experimentos em solo PVa e TE, respectivamente, em Piracicaba, SP. No primeiro ensaio, aplicou-se 0, 20 e 40 t/ha de Le com combinação NPK, localizando-o no fundo do sulco de plantio e no outro, nas entrelinhas da soqueira à 40 cm da linha, profundidade de 15 cm e já nas doses de 0, 15 e 30 t/ha. O Le utilizado continha um teor de Ni acima do limite máximo definido pela EPA (420 mg.kg⁻¹). Entretanto, o Le foi um corretivo da acidez do PVa e apresentou em ambos os solos um pequeno aumento nos teores máximos extraídos em DTPA de Zn(9,0 e 3,0), Cd(0,2), Cr(0,2), Cu(4,2 e 3,0), Pb(2,5 e 1,4) e Ni(2,5 e 1,2), expresso em mg.kg⁻¹ de TFSA. Os pequenos aumentos de concentração de metais pesados no solo não foram acumulados nos colmos de cana e se destinaram preferencialmente as raízes. A carga orgânica prontamente oxidável do Le foi degradada em torno de 300 dias após a adição ao solo. Portanto, o efeito imediato da aplicação do Le não ofereceu risco de passagem de metais pesados à cadeia trófica animal.

CONTAMINAÇÃO POR METAIS PESADOS EM SOLO E CANA-DE-AÇÚCAR PELA APLICAÇÃO DE LODO DE ESGOTO. II.EFEITOS RESIDUAL E DE REAPLICAÇÃO. F.C.da SILVA¹, A.E. BOARETTO², R.S. BERTON³, C.A. PEXE⁴ & H.B. ZOTELLI⁴ (¹EMBRAPA-CNPSolos, R. Jardim Botânico-1024, CEP 22.460-000, Rio de Janeiro, RJ; ²USP/CENA, CP 96, Piracicaba, SP; ³IAC, CP 28, Campinas, SP; ⁴Usina Costa Pinto S.A., Piracicaba, SP). Contamination of heavy metals in the soil and Sugar Cane by application of sewage sludge. II.effect residual and reapplication.

Com o objetivo de avaliar os efeitos residual e de reaplicação do 'lodo de esgoto'-Le, gerado na E.R.Q. de Barueri-SP da SABESP, em contaminação por metais pesados no sistema solo-planta pela sua aplicação no plantio e reaplicação nas entrelinhas da soqueira de cana de açúcar (var.RB 72-454), utilizou-se de um experimento em solo PVa, em Piracicaba, SP. Na segunda metade de cada parcela, reaplicou-se 0, 20 e 40 t/ha de Le com combinação NPK, localizando-o nas entrelinhas da soqueira à 40 cm da linha, profundidade de 15 cm e na outra parte, deixou-se para quantificar o efeito residual daquele disposto no sulco de plantio. Houveram efeitos da adição de Le que foram aplicados no sulco de plantio e aqueles reaplicados na entrelinha após o corte da cana-planta nos teores de Cu e Zn no solo, mas não teve qualquer efeito em Ni, Cr, Pb, Fe e Mn. Verificou-se o efeito residual do Le nos teores de Cu, Cd e Zn no solo, mas o teor máximo de Cd no solo encontra-se ainda bastante baixo. A reaplicação de Le causou o aumento nos teores de Zn e de Cu na camada de 0-20 cm. Não houve qualquer enriquecimento nos teores de metais pesados nas amostras em subsuperfície, indicando que houve pouca mobilidade destes metais no perfil do solo. Houveram efeitos de reaplicado e residual apenas nos teores de Cu, Zn e Se na folha +3 da cana-soca.

BIOTRANSFORMAÇÃO DE FILMES DE PVC POR TRATAMENTO COM CHORUME. S. M. M. FRANCHETTI, E. R. SILVA & M. L. B. O. RODRIGUES (Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, UNESP, 13506-900, Rio Claro, SP). PVC films biotransformation by chorume treatment.

Alguns polímeros sintéticos, como o polietileno (PE), o poliestireno (PS) e o poli (cloreto de vinila) (PVC) são muito utilizados pela indústria e comércio e são materiais bastante persistentes, quando descartados no meio ambiente. O período máximo que estes plásticos levam para se degradar oxidativamente, sob solo ativo, é cerca de 30 a 40 anos. O PVC é um polímero muito importante tecnologicamente, e muito utilizado na obtenção de canos de tubulações de brinquedos, de conduítes, de recipientes para embalagens e de filmes plásticos. Geralmente, ele contém um plastificante para melhorar sua flexibilidade. O plastificante empregado pode sofrer o ataque microbiano, invés da matriz polimérica, propriamente dita. Além disso, a morfologia do filme de PVC é bastante complexa e discutida na literatura e, em alguns casos, o ataque microbiano depende da morfologia do material. Estudos nesta área são relevantes para esclarecer o mecanismo da biotransformação de filmes de PVC, mesmo que não ocorra um biodegradação completa. Utilizando-se do chorume, resíduo líquido do lixão municipal e meio rico em microorganismos, procedeu-se a um tratamento de amostras de filmes finos de PVC, obtidos por "casting" e de PVC comercial (filme de Rolopac), em estufa a 32°C, durante 20 dias. Apesar da curta duração do biotratamento, foram verificadas grandes mudanças morfológicas na matriz polimérica, através da microscopia óptica (primeira fase do trabalho). Estas alterações morfológicas refletem mudanças estruturais da matriz polimérica, devido a interações entre a microflora presente no chorume e o polímero.

Agradecimentos: FAPESP.

DESCOLORAÇÃO DE INDIGOTINA AZUL POR BASIDIOMICETOS LIGNINOLÍTICOS. D.S.L.BALAN¹ & R.T.R.MONTEIRO² (¹FATEC-AM, Dept.Ens.Geral/CEETEPS, Av.N.S. Fátima 567- 13465-000 Americana,SP; ²CENA/USP, Seç.Ecologia, C.P 96, 13400-970 Piracicaba, SP) DECOLORIZATION OF INDIGO-BLUE BY LIGNIN-DEGRADING BASIDIOMYCETES.

Os corantes sintéticos são extensivamente empregados pelas indústrias, especialmente têxteis. Por serem recalcitrantes têm recebido considerável atenção. A descoloração em meio líquido, contendo uma concentração final 0.02% do corante indigotina azul, foi monitorada por espectrofotometria. (Platt, 1983) Foram testados os basidiomicetos *Phellinus gilvus* (CCB 254), *Phanerochaete chrysosporium* (CCB 539), *Picnoporus sanguineus* (CCB 458) e *Pleurotus ostreatus* (IB 440), inoculados em frascos com 60 ml de M.M.E através de discos de ágar. A razão de absorbância 580nm : 480 nm foi calculada e seu decréscimo indica a descoloração e remoção do corante do meio de cultura. Os resultados dos experimentos em triplicata, indicam a que a descoloração inicia-se em poucas horas, sendo que em 4 dias *P.gilvus*, *P. chrysosporium*, *P. sanguineus* e *P.ostreatus*, removem respectivamente 96%, 73%, 79% e 83% do corante do meio de cultura. Nenhum decréscimo de absorbância, foi observado na cultura controle estéril. O corante é adsorvido ao micélio, sendo conhecida a correlação entre degradação de xenobióticos e a descoloração de corantes (FIELD,1993). Já estabelecido como modelo, *P. chrysosporium*, realiza a transformação de xenobióticos por um complexo sistema ligninolítico de enzimas extra e intracelulares. Dentre elas estão peroxidases (LiPs), oxidases e peroxidases dependentes de manganês (MnPs). A descoloração de corantes, tem sido um bom indicador da transformação de xenobióticos mediada pela atividade enzimática de fungos. Esse fato, torna os basidiomicetos um grupo promissor para a aplicação em bioremediação.

✓ **PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR LEVEDURAS ISOLADAS DE ÓLEO DIESEL.** D.F. CARVALHO, D.D. MARCHI & L.R. DURRANT (DCA-FEA-UNICAMP, C.P.6121, 13081-970, Campinas, SP) Production of biosurfactants by yeasts isolated from diesel oil.

A aplicação da microbiologia para resolver problemas de poluição ambiental por derivados do petróleo tem recebido muita atenção, pois vários microrganismos podem oxidar hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. O crescimento microbiano em fontes de carbono insolúveis em água como os hidrocarbonetos é acompanhado por alterações estruturais e metabólicas da célula. Compostos de superfície ativa de origem biológica (biosurfactantes) são fundamentais para as interações iniciais entre a célula microbiana e os hidrocarbonetos porque reduzem a tensão interfacial entre o óleo e a fase aquosa, diminuindo o diâmetro médio das gotas de óleo e propiciando o aumento da área interfacial. Onze linhagens de leveduras foram isoladas de tanques de caminhões transportadores de óleo diesel em oficinas de lavagem à vapor, na Estrada Campinas-Paulínia. Todas as cepas foram crescidas em meio líquido contendo separadamente 1,5% de óleo de oliva, querosene, tolueno ou vaselina. A produção de biosurfactantes foi verificada nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas, utilizando-se 2,0 ml dos substratos: óleo de oliva, tolueno e xileno e 3,5 ml dos caldos de cultura centrifugados. O aumento da absorbância das emulsões óleo em água foi determinado a 610 nm e as emulsões água em óleo foram expressas através da altura (cm) do halo formado. As melhores atividades de bioemulsificação foram obtidas com as culturas LevP, L3C, L5A, L7A e L9A utilizando-se tolueno como substrato. LevP e L7A mostraram bons resultados em termos de absorbância quando crescidas em óleo de oliva e vaselina; L3C, L5A e L9A apresentaram halos maiores ou iguais a 2,0 cm quando crescidas em óleo de oliva, querosene e vaselina.

ADAPTATION OF *Acinetobacter calcoaceticus* ON ARTIFICIAL CERAMIC PLANT EFFLUENT. MARA L. BEDIN¹, MOISÉS E. PEREZ-BARINOTTO², TEREZA C. P. BARBOSA² & NELSON H. GABILAN. ¹Lab. Proteínas (Depto. Bioquímica) & ²Lab. Microbiologia Aquática e Ambiental (Depto. Ecologia-Zoologia). CCB. Univ. Fed. Santa Catarina. Florianópolis. SC. E-mail: gabilan@mbox1.ufsc.br

O fenol e seus derivados são poluentes ambientais, produzidos e eliminados nos efluentes da indústria de cerâmica, coque e siderúrgicas. A remoção de fenóis pode ser realizada por microorganismos adaptados e com capacidade de degradar estes compostos. O objetivo deste trabalho foi verificar o crescimento e a degradação de fenol por *Acinetobacter calcoaceticus* cultivada em efluente “natural” da indústria de cerâmica (EIC-N) e em efluente “artificial” (EIC-A). *A. calcoaceticus* foi inoculada em 4 meios de cultura: I. Caldo trypticase de soja (TSB) 2,5 g/l + EIC-N (fenol 0,38 g/l; amônia 0,40 g/l; cianeto 3 mg/l; tiocianato 0,12 g/l; alcatrão + BTX (benzeno, tolueno, xileno) 0,11 g/l; traços de outros componentes; II. TSB + EIC-A (fenol, amônia, cianeto e tiocianato, nas mesmas concentrações de EIC-N); III. TSB + fenol 0,38 g/l; IV. TSB + fenol 0,38 g/l + amônia 0,3 g/l. As maiores taxas de crescimento específico foram observadas entre 4 e 8 hs, nos meios com fenol + amônia ($\mu=0,38 \text{ h}^{-1}$), EIC-A ($\mu=0,35 \text{ h}^{-1}$) e fenol ($\mu=0,32 \text{ h}^{-1}$). Nestes meios, o fenol foi totalmente degradado em 8 hs. A taxa de crescimento específico máxima em meio EIC-N ($\mu=0,17 \text{ h}^{-1}$) ocorreu entre 0 e 12 hs. Depois de 24 hs, o fenol foi parcialmente (50%) degradado por uma biomassa de $1,5 \cdot 10^8$ UFC/ml. Os componentes do efluente artificial (fenol, amônia, cianeto e tiocianato) não inibiram o crescimento e degradação de fenol. Os resultados sugerem que outros compostos presentes no efluente natural afetaram a degradação de fenol por *Acinetobacter calcoaceticus*.

Apoio: FBB & RHAECNPq-PIBIO-(MLB e MEPB)

INFLUENCE OF NITROGEN SOURCE ON PHENOL DEGRADATION BY *Pseudomonas* sp. MOISÉS E. PÉREZ-BARINOTTO¹; TEREZA C. P. BARBOSA¹; JACSON GUIMARAES¹ & NELSON H. GABILAN² (¹Lab. Microbiologia Aquática e Ambiental - Depto. Ecologia-Zoologia and ²Depto. Bioquímica. CCB. Univ. Fed. Santa Catarina. Florianópolis. SC. 88040-900. E-mail: tereza@mbox1.ufsc.br).

Phenol and other organic compounds are present in the environment as a contaminant in wastewater of a great number of industries such as coal gasification, petrochemical plants, resin and plastics. Polluted soil and water can be decontaminated by the inoculation with degrading microorganisms. *Pseudomonas* sp. isolated from activated sludge of ceramic plant effluent (Ceramica Eliane S. A.), able to degrade phenol, was investigated. The strain was cultured on four different media, containing minimal salts medium, ammonium chloride (inorganic nitrogen) and phenol (0,5 g/l) as basic medium (MSP). The tryptone was tested as the organic nitrogen source (TRYPTONE) and glucose as the alternative carbon source (GLUCOSE). The TEF medium (TSB + phenol 0,5 g/l) was utilized as control. On TRYPTONE medium *Pseudomonas* sp. degraded total phenol within 48 h and biomass was higher ($2,2 \times 10^9$ cells/ml.) than on the MSP ($6,4 \times 10^8$ cells/ml) and GLUCOSE medium ($6,0 \times 10^8$ cells/ml). Only 36 and 10% of phenol was degraded after thirteen days of incubation on the MSP and GLUCOSE medium. The maximum specific growth rates in TRYPTONE medium ($\mu = 0,06 \text{ h}^{-1}$) was lower when comparated with the TEF medium ($0,15 \text{ h}^{-1}$). The glucose consumption on TEF medium was total after 48 h, whereas in GLUCOSE medium did was not consumed. The results suggests that the phenol degradation by *Pseudomonas* sp. was dependent of the organic nitrogen and carbon sources. Moreover, under these conditions, the phenol can not be degraded as sole carbon source.

Apoio: FBB and RHAECNPq-PIBIO-UFSC.

BIODEGRADAÇÃO BACTERIANA DE PCBS EM SEDIMENTOS DO ESTUÁRIO DE SANTOS, SP. P.V.BERTACINI¹; R.C.MONTONE²; R.R.WEBER²; V.H.PELLIZARI¹. (¹.ICB/USP II, Av. Prof.Lineu Prestes 1374, C.P. 05508-900; ²IO/USP Pça do Oceanográfico 191, CEP.05508-900- São Paulo-SP). "PCB - degrading bacteria in sediment samples from Santos estuary, SP".

A problemática da contaminação ambiental causada pelos PCBs é mundial. Vários estudos envolvendo a descrição das vias metabólicas e dos genes envolvidos no processo de degradação vêm sendo desenvolvidos principalmente nas áreas temperadas. No Brasil, pudemos relatar a presença de bactérias degradadoras de PCBs e a presença dos genes *bph* em amostras de São Paulo e Cubatão. A obtenção de cepas degradadoras poderá contribuir para a aplicação em processos de bioremediação para eliminação de resíduos de PCBs em solo e águas contaminados. Neste estudo pretendemos averiguar a presença de PCBs no estuário de Santos-SP, região que sofre o impacto da contaminação do polo industrial de Cubatão, assim como a presença de bactérias aeróbias com capacidade de degradar PCB nos sedimentos deste estuário. Para este fim foram selecionados 6 pontos de coleta no estuário e na baía de Santos. As amostras de sedimentos coletadas foram inoculadas em meio de enriquecimento segundo Bedard *et al* (1986) e foram obtidos inicialmente 6 culturas bacterianas. A capacidade de degradação destas culturas frente ao AROCLOR 1242, na concentração de 10 ppm foram verificadas. As análises cromatográficas quantitativas para a verificação da presença de PCB nas amostras de sedimentos e nas culturas obtidas foram realizadas de acordo com Montone (1995). Os níveis de PCB s detectados nos sedimentos variaram de nd a 10.9 ng.g⁻¹, não indicando contaminação significativa. Os resultados demonstraram a presença de consórcios bacterianos capazes de degradar de 51.4% até 78,3% do Aroclor 1242. Será realizado o isolamento e caracterização das cepas envolvidas na biodegradação.

ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE CRISENO. G. BRUCHA, C. R. NAKAYAMA, S. M. BARBIERI. (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, Via Washington Luis, Km 235, 13565-905 - São Carlos, SP, Brasil). Isolation of Chrysene Microorganism Degrading Strains.

O criseno, objeto de estudo deste trabalho, é um PAH composto por quatro anéis benzênicos, sendo um agente carcinogênico e iniciador de mutações. Não há registro da utilização deste composto como fonte única de carbono e energia, por microrganismos. Bactérias, previamente isoladas de um solo contaminado por creosoto, foram inoculadas em meio JE mineral 0,1% creosoto + 2mM criseno e incubadas a temperatura ambiente sob agitação constante (150 rpm) por 5 dias. Em seguida, aliquotas foram transferidas para o mesmo meio com 0,01%, seguindo as mesmas condições de incubação. Subamostras foram repicadas em meio sólido LB e incubadas a temperatura ambiente por 24 horas. Microrganismos que mostraram crescimento foram devidamente isolados e plaqueados em meio JE +criseno (0,25mM)-agarose e incubados por 4 dias. As bactérias foram identificadas de acordo com o descrito pelo Manual de Sistemática Bacteriológica do Bergey. O meio de enriquecimento mostrou crescimento de 3 linhagens bacterianas e um fungo. Tais linhagens foram capazes de crescer em meio contendo criseno como única fonte de carbono. Tais linhagens são bastonetes móveis, gram negativas, catalase e oxidase positivas, capazes de utilizar citrato, glicose, lactose, benzoato, piruvato, succinato, adipato e catecol. No entanto, as mesmas não foram capazes de crescer em meio contendo ácido gentísico e produziram pigmento somente em meio King B. Estas bactérias foram capazes de crescer a 41°C mas não a 4°C. Baseado nestes resultados estas linhagens foram classificadas como *Pseudomonas putida*. A linhagem de fungo foi previamente identificada como *Penicilium sp.*

EVIDÊNCIAS DA VIA METACLIVAGEM DO CATECOL EM *P. PUTIDA* CRIM₃C₁C. E. K. YONAMINE, J. B. MOLFETTA & S. M. BARBIERI (Departamento de Genética e Evolução, UFSCar, 13565-905 - São Carlos, SP). Evidence of the catechol *metacleavage* pathway in *P. putida* CRIM₃C₁C.

Compostos aromáticos são geralmente convertidos durante o processo de degradação através da incorporação de grupos hidroxila, por mono ou dioxigenases no substrato aromático, produzindo compostos dihidroxiaromáticos. As dioxigenases atuam ainda na clivagem de intermediários tais como catecóis, protocatecóis e ácido gentísico. O tipo de clivagem (*meta* e/ou *orto*clivagem) do intermediário catecol realizado pela linhagem *P. putida*, foi primeiramente avaliado pela metodologia descrita por Gerhardt *et al.* (1981). Para isto, colônias previamente crescidas por 3 dias em J+E ágar + 0,1% de creosoto foram ressuspensas em tampão Tris (33mM pH8,0), seguida da adição de tolueno e de catecol (0,2 mM). Amostras que apresentaram resultado negativo foram submetidas à reação de Rothera após serem incubadas por 1h a 30°C. Como controles positivo e negativo utilizou-se *E. coli* DH5α pIU (*metacleavage*) e *E. coli* DH5α, respectivamente. Num segundo experimento foi avaliado a capacidade da linhagem de produzir pigmento amarelo, quando crescendo em creosoto agar, após ser burrifada com uma solução de catecol 100mM. A coloração amarela indica a formação do produto da reação, o ácido 2-hidroxi-3-metil-2,3-dioximucônico semialdeído. A fim de se verificar quais enzimas envolvidas na clivagem do catecol eram expressas nesta linhagem realizou-se ensaios para a catecol 1,2 (*orto*) e 2,3-dioxigenase (*meta*). Culturas previamente crescidas em creosoto foram transferidas para meio J+E agarose-creosoto, naftaleno, 2-metilnaftaleno, succinato, piruvato, catecol, salicilato e ácido protocateicóico. Como controle negativo utilizou-se o crescimento bacteriano em meio LB. As amostras lavadas previamente em tampão Tris e tratadas com inibidores de proteases, foram sonicadas e centrifugadas a 4°C por 20 min. A concentração das proteínas totais foi

determinada de acordo com Warburg & Christian (1941). As atividades das enzimas catecol 1,2 e 2,3-dioxigenase foram de acordo com Hegeman (1966) e Feist & Hegeman (1969), respectivamente. A análise dos resultados provenientes de todos os experimentos acima citados demonstrou a presença do ácido 2-hidroxi-mucônico e atividade da enzima catecol 2,3-dioxigenase em todos os meios utilizados. Isto evidencia, portanto, a abertura do catecol através de *meta*clivagem.

Suporte Financeiro e bolsa de iniciação científica: FAPESP

TOLERÂNCIA DE BASIDIOMICETOS NATIVOS A ALTAS CONCENTRAÇÕES DE HEXACLOROBENZENO (HCB), EM SOLO CONTAMINADO POR ORGANOCLORADOS. D.R. MATHEUS¹, D. SANTOS¹, V.L.R. BONONI². (¹CEPEL/UNESP, Pça.Inf. D.Henrique,s/n, 11330-205, São Vicente,SP; ²IBt/SMA, C.P. Av.Miguel Stéfano, 3687, 04301-902, São Paulo,SP). Tolerance of basidiomycetes fungi to high hexachlorobenzene concentration in organochlorine-contaminated soil.

Avaliou-se a tolerância de 37 fungos basidiomicetos nativos a altas concentrações de HCB presentes em solo contaminado por uma mistura de organoclorados, como um dos critérios utilizados na seleção destes para a aplicação em processo de bioremediação de solos da Baixada Santista, S.P. Observou-se a capacidade dos fungos crescerem em 4 concentrações dos poluentes. Os fungos foram inoculados, em quadruplicatas, em tubos de ensaio contendo Agar Extrato Malte (2%), não inclinado, e ,após 10 dias de crescimento a 30°C foram cobertos por uma coluna, de aproximadamente 4 cm, de solo arenoso esterilizado, contendo 0,51; 2,56 e 5,12 % de HCB. Como controle utilizou-se solo não contaminado. O crescimento foi avaliado, aos 15 e 30 dias de incubação, pela capacidade do fungo em colonizar a coluna de solo. Cinco fungos cresceram apenas no solo controle, onze em solo com concentração de até 2,56% de HCB, destacando-se *Trametes villosa* CCB 176 e *Psilocybe castanella* var. *castanella* CCB 444 que cresceram à 5,12% de HCB. *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 28326, utilizado como amostra referência também tolerou tal concentração. (CNPq, FUNDUNESP)

BIOCONVERSÃO DE NITRILAS E AMIDAS POR UM ISOLADO DE *Candida guilliermondii*. J.C.T. DIAS, C. A. ROSA & V. R. LINARDI (Depto. Microbiologia, ICB/UFMG, C.P. 31. 270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais) Bioconversion of nitriles e amides by *Candida guilliermondii* strain.

As nitrilas e seus derivados são amplamente utilizadas nas indústrias. Por serem altamente tóxicas (carcinogênica, mutagênica e teratogênica) devem ser removidas quando presentes nos efluentes. Diversos estudos envolvendo a biotransformação destes compostos por fungos filamentosos e bactérias tem sido descrito na literatura. Entretanto, em relação às leveduras, os estudos se limitam a poucas publicações. O objetivo do trabalho, foi isolar e identificar leveduras presentes nos efluentes contendo cianeto da Mineração Morro Velho (Nova Lima-MG), capazes de utilizarem nitrilas e suas amidas correspondentes como fonte de nitrogênio. Um isolado, identificado como *Candida guilliermondii*, destacou-se dos demais pela capacidade de metabolizar uma ampla variedade destas substâncias em concentrações de 120 mM - 2000 mM. O extrato livre de células obtido de um crescimento celular em meio (YCB) acrescido de 500 mM de acetonitrila foi utilizado para o estudo da nitrila hidratase (E.C. 4.2.1.84) e amidase (E.C. 3.5.1.4). Ambas envolvidas no processo de degradação destas substâncias. A faixa de melhor pH e temperatura para as atividades enzimáticas mostrou-se entre 25-35°C e 7,0 - 8,0 respectivamente. Para determinação das atividades específicas utilizou-se os seguintes substratos em ordem crescente de atividade: succinamida, isobutiroamida, acrilonitrila, butironitrila, valeronitrila, propionitrila, acrilamida, metacrilonitrila, isobutironitrila, acetonitrila, succinonitrila e acetamida. O ensaio enzimático com extrato livres de células obtido através do cultivo celular em meio (YCB) acrescido de 0,1% de sulfato de amônia, não foi capaz de degradar as nitrilas e amidas testadas sugerindo que ambas são indutivas. Os dados obtidos sugerem a utilização da *Candida guilliermondii* nos processos de bioremediação de nitrilas e/ou bioprodução de amidas e ácidos orgânicos.

Apoio financeiro: CNPq, FAPEMIG, PRPq/UFMG.

METABOLISMO DE CAFEÍNA EM *Pseudomonas putida* ISOLADA DE SOLO: CARACTERIZAÇÃO DA VIA DE DEGRADAÇÃO E DE ENZIMAS ENVOLVIDAS. D.M.Y. YANO & P. MAZZAFERA (Deptº Fisiologia Vegetal, Instituto Biologia, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil).

A importância de grupos de bactérias isolados da rizosfera, principalmente grupos fluorescentes de *Pseudomonas* têm merecido atenção por apresentarem capacidade de degradar uma variedade de compostos aromáticos (BURR, 1985). Bactérias degradadoras de cafeína foram isoladas de três tipos de solos de composição e textura diferentes, coletados debaixo de plantas de café. O isolamento foi feito sem enriquecimento prévio em meio mineral contendo somente cafeína como fonte de carbono e nitrogênio. Colônias isoladas identificadas como *Pseudomonas putida* apresentaram capacidade de crescimento em meio mineral contendo diferentes concentrações de cafeína (2,0; 20,0 e 50,0g/L). Com esses resultados, foi feita uma seleção nos isolados e as linhagens Le 21 foram escolhidas para os ensaios. Compostos produzidos na degradação de ^{14}C -cafeína foram analisadas e identificadas. A presença de teobromina foi detectada na fração sobrenadante após 8 horas de cultivo. Extratos livres de células da linhagem L foram analisadas com vários substratos para detecção de atividade da xantina oxidase na presença ou não do cofator NAD. Observou-se atividade contra xantina, hipoxantina, teofilina e 3-metilxantina. A enzima não é dependente do NAD, sendo uma oxigenase. A enzima mostrou-se bastante estável com atividade semelhante à inicial após 36 horas a 4°C e 90 minutos à temperatura ambiente. A inibição da enzima foi observada na presença de 1 e 10mM de CoCl_2 . Melhor atividade da enzima xantina foi observada nos ensaios 100µl de xantina (0,15mM), 30,0µg de proteína, temperatura de incubação 30°C tempo de incubação 30 minutos com a produção de 12,35ng de ácido úrico/µg de proteína/hora. Nessas condições os valores de K_m e V_{max} foram 5,25nM e 4,13 nmol ml⁻¹ h⁻¹ ng⁻¹.

EFEITO DA ADIÇÃO DE SUBSTRATO LIGNOCELULÓSICO NO CRESCIMENTO DE FUNGOS BASIDIOMICETOS EM SOLO COM BAIXO TEOR DE MATÉRIA ORGÂNICA. K.M.G. MACHADO ¹; D. R. MATHEUS ²; C. FABRIS ² & V. L. R. BÖNONI ³ (¹CETEC/ SECTMA, Av. José Candido da Silveira, 2000, 30170-000, Belo Horizonte, MG; ²CEPEL/UNESP, São Vicente, SP.; ³IBT/SMA, SP). Effect of lignocellulosic substrate addition on White-rot fungi growth in soil with low organic matter content.

A utilização de fungos basidiomicetos nativos do Brasil foi proposta para a remediação de solos contaminados com despejos de resíduos industriais e situados na Baixada Santista, SP. Solo não contaminado da mesma região (98 % de areia, 0,13 % de matéria orgânica) foi usado para padronizar as condições de crescimento dos fungos. Avaliou-se o efeito da adição de bagaço de cana-de-açúcar no crescimento de 9 fungos, usando-se, como inóculo, o crescimento de cada fungo em grãos de trigo ou em bagaço. Os frascos foram incubados a 28°C, agitados manualmente entre o 14º e o 21º dias e o crescimento avaliado 14 e 21 dias depois. O crescimento em grãos de trigo mostrou-se mais adequado como inóculo. A adição de bagaço não interferiu no crescimento de *Psilocybe castanella* var. *castanella* CCB 444 e estimulou o crescimento de *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 28326, *Lentinus zeyheri* CCB 274, *Peniophora cinerea* CCB 204, *Agrocybe perfecta* CCB 161 e *Trametes villosa* CCB 176. Nenhum estímulo foi observado para *T. villosa* CCB 291. Após agitação, observou-se crescimento reduzido para *Trichaptum byssogenum* CCB 203 e *T. villosa* CCB 213, em ambas condições.

(FAPEMIG, FUNDUNESP, CNPq)

BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE CELULOSE A PARTIR DE CULTURA BACTERIANA MISTA PRESENTE NO CHORUME DE DEPÓSITO DE LIXO URBANO À CÉU ABERTO. L.P. GOMES¹, J. POVINELLI² e R. F. VAZOLLER². ¹Univ. do Vale do Rio dos Sinos. Av. UNISINOS, 950. São Leopoldo - RS 93022-000. e-mail: lugomes@dgeo.unisinos.tche.br, ²EESC/USP. Anaerobic biodegradation of cellulose from mixed bacterial culture of leachate originated from urban solid wastes deposited in open dump.

Este trabalho apresenta resultados obtidos sobre a atividade de uma cultura mista bacteriana celulolítica anaeróbia. A cultura bacteriana foi obtida a partir do enriquecimento de uma amostra de chorume, originada da degradação de resíduos sólidos urbanos, do depósito de lixo à céu aberto, do município de São Carlos- SP. Esta cultura foi enriquecida e purificada em meios de cultivo líquido e sólido contendo celulose em pó CC 41 Whatmann, e mantida à temperatura de 37 ± 2 °C. A habilidade da cultura bacteriana em degradar a celulose foi avaliada através de ensaios de acompanhamento do crescimento celular e produção de metabólitos. As contagens iniciais de bactérias anaeróbias celulolíticas e metanogênicas no chorume estudado revelaram a ordem de grandeza de 10^4 bactérias/mL para ambos os grupos. Variando-se a concentração da celulose no meio de cultivo líquido, foram determinadas as velocidades de crescimento da cultura anaeróbia celulolítica na faixa de 0,06 a 0,20 mg S.A.B./L h, através de medidas de proteínas totais. Foi verificada a produção de açúcares redutores totais e ácidos orgânicos voláteis, após períodos de incubação de aproximadamente 100 horas. No substrato glicose, testado em meio líquido sob diferentes concentrações, a cultura anaeróbia celulolítica apresentou velocidades de crescimento entre 0,37 a 1,01 mg S.A.B. / L h, através de medidas turbidimétricas. O consumo do carboidrato foi acentuado nas primeiras 100 horas de ensaio, avaliado através da determinação dos açúcares redutores totais. Ensaios com glicose (3g/L) revelaram a produção aproximada de 1100 mg/L de ácidos orgânicos voláteis, após 360 horas de incubação. Os experimentos realizados forneceram dados originais sobre a microbiologia e a atividade celulolítica do chorume, revelando alguns aspectos do metabolismo, que podem auxiliar na avaliação do potencial real do líquido gerado pela degradação de resíduos sólidos, na inoculação de biodigestores anaeróbios, ou na aceleração de aterros sanitários.

ISOLAMENTO DE LINHAGENS MELHORADAS DE *Trichoderma harzianum* PARA DEGRADAÇÃO DE CELULOSE. I.S. MELO¹; J.L. FAULL² & K.A. GRAEME-COOK²
(¹EMBRAPA-CNPMA, Cx. Postal 69, 13820-000, Jaguariúna, SP, Brasil; ²Birkbeck College, Universidade de Londres).

As β -glucosidases e celulasas de fungos têm sido estudadas intensivamente devido ao seu papel na degradação da celulose e β -glucosídeo. O fungo *Trichoderma* é bem estudado como celulolítico. No entanto, produz baixos níveis de β -glucosidase. O objetivo deste trabalho foi obter linhagens melhoradas de *T. harzianum* produtoras de β -glucosidase através de uma técnica simples e rápida, onde utilizou-se meio sólido suplementado com o substrato esculina (6,7-dihidroxycoumarina-6-glucosídeo). Conídios mutagenizados com luz ultra-violeta foram cultivados no meio de esculina e, colônias com halo de degradação foram cultivadas em meio líquido suplementado com farelo de trigo e carboximetilcelulose. Dois mutantes (5⁺ e 15⁺), com morfologia alterada e de crescimento lento, foram selecionados por produzirem quantidades expressivas de β -glucosidase e endoglucanase. Estes mutantes apresentam potencial de sacarificação total do farelo de trigo e parasitam a parede de células do fungo *Sclerotinia*, cuja composição é formada por glucana e quitina.

ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS PRODUZIDAS POR FUNGOS CULTIVADOS SOB CONDIÇÃO MICROAERÓBICA. L. D. SETTE E L. R. DURRANT. (Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP C.P.6121 - 13081-970, Campinas, SP). Ligninolytic Enzymes Produced by Fungi Grown Under Microaerobic Condition.

A degradação da lignina desempenha um papel central no ciclo do carbono. A grande quantidade de lignina que é produzida anualmente em nosso planeta é balanceada pela quantidade de lignina que é decomposta por microorganismos. Os fungos de decomposição branca são únicos na habilidade de degradar a lignina com eficiência, através de um processo oxidativo, envolvendo enzimas como a lignina-peroxidase (Li-P), manganês-peroxidase (Mn-P), lacase e enzimas produtoras de H_2O_2 . Foram utilizadas nesse trabalho duas linhagens de fungos filamentosos (H_2 e 20) e uma de levedura (LD) mantidas em meio GYP (glicose, extrato de levedura e peptona). As linhagens foram crescidas em meios líquidos enriquecidos com sais minerais, vitaminas e cisteína como agente redutor. Como fonte de carbono foram usados: álcool veratrílico (0,4 mM), ácido lignossulfônico dialisado (0,5 %) e ácido lignossulfônico não dialisado (0,5 %). Após a inoculação (50 mL de meio/100 mL erlemeyer) os frascos foram colocados em jarras fechadas hermeticamente contendo placas Microaerobac (PROBAC), para a manutenção da baixa oxigenação. As atividades de Li-P, Mn-P, lacase, peroxidase e AVO (álcool veratrílico oxidase) foram determinadas espectrofotometricamente após 20 e 35 dias de crescimento a 30°C. De uma maneira geral, as linhagens produziram quantidades razoáveis de Li-P e AVO, sendo a máxima atividade dessas enzimas produzida pela linhagem 20 quando crescida em meio contendo ácido lignossulfônico dialisado: Li-P (~5,0 UI/L) e AVO (~12,0 UI/L). A máxima atividade de lacase (~0,55 UI/L) e de Mn-P (~13,5 UI/L) foi produzida pela linhagem LD crescida em meio contendo álcool veratrílico. A linhagem H_2 produziu a máxima atividade de peroxidase (~0,4 UI/L) quando crescida em meio contendo ácido lignossulfônico e em meio contendo álcool veratrílico.

SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS LIGNINOLÍTICOS E ESTUDO DA PRODUÇÃO DAS ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS. A.H. AOKI & L.R. DURRANT (DCA - FEA - UNICAMP, C.P.6121, 13081-970, Campinas, SP)
Lignocellulolytic enzymes produced by selected ligninolytic microorganisms.

O aproveitamento da lignina em processos industriais a partir de resíduos lignocelulósicos para a produção de ração animal, enzimas e produtos químicos pode ser economicamente viável e de grande interesse, por isso, nos propusemos a realizar um trabalho para selecionar microrganismos capazes de degradar material lignocelulósico. A degradação da lignina é feita principalmente por fungos superiores, mas a sua degradação extensiva é atribuída à ação de poucos fungos, entre os quais os mais efetivos são os fungos de decomposição branca ("white-rot-fungi"), os fungos de decomposição marrom ("brown-rot-fungi") e os fungos de decomposição branda ("soft-rot-fungi"). Os fungos basidiomicetos do tipo "white-rot" são capazes de degradar os três componentes mais importantes da madeira: a celulose, a hemicelulose e a lignina. Com o objetivo de se determinar a capacidade lignocelulolítica de microrganismos não pertencentes ao grupo dos fungos basideomicetos foram realizados vários testes para selecionar-se alguns microrganismos lignolíticos. Trabalhamos com 113 linhagens diferentes, entre fungos, bactérias e leveduras, provenientes de diferentes fontes e inicialmente realizamos testes para verificar a capacidade de crescimento destes microrganismos utilizando-se compostos derivados de lignina como fonte de carbono (ácido lignosulfônico ou lignina organosolv). Verificamos que alguns destes microrganismos possuem grande capacidade de degradar estes materiais, tendo em vista que o crescimento destes microrganismos nestes meios foi muito significativo. Em alguns casos, houve uma total descoloração do meio, inicialmente escuro e turvo, o que indica uma ótima ação do microrganismo. A partir dos resultados obtidos nestes testes selecionamos 24 linhagens de microrganismos para realizarmos os testes de produção de enzimas lignolíticas: peroxidase, lacase, lignina-peroxidase (Li-P) e manganês-peroxidase (Mn-P). Todas as linhagens estão sendo investigadas quanto às suas atividades celulolíticas.

SELEÇÃO DE FUNGOS CAPAZES DE DEGRADAR MATERIAL LIGNOCELULÓSICO SOB CONDIÇÕES AERÓBICA E MICROAERÓBICA. E.C.PAVARINA & L.R.DURRANT.(Lab. Sistem. Fisiologia Microbiana/DCA-F.E.A. - UNICAMP C.P.6121 - 13081-970, Campinas, SP). Selection of Fungi Capable of Degrading Lignocellulosic Biomass under Aerobic and Microaerobic Conditions.

O ciclo de matéria orgânica é de muita importância para os seres vivos e consequentemente para a vida na terra. O processo fotossintético produz anualmente 1.5×10^{11} toneladas de material orgânico o qual é composto basicamente por celulose, hemicelulose e lignina. Este material lignocelulósico proporciona um meio de aproveitar e estocar energia solar representando uma fonte importante e renovável de energia. O sistema enzimático que desintegra a celulose cristalina compreende, as endoglucanases (CMCase), exoglucanases e β -glicosidases. Foram utilizadas dez linhagens de fungos mantidas em meio GYP (glicose, extrato de levedura e peptona) e crescidas em meio específico contendo papel de filtro (como fonte de celulose), sais minerais, vitaminas e como agente redutor cisteína. As linhagens foram cultivadas em diferentes condições: aeróbica sem agitação (tubo de ensaio e erlenmeyer); aeróbica com agitação (erlenmeyer) e microaeróbica (tubo de ensaio, colocado em jarras hermeticamente fechadas com placas Microaerobac). As atividades enzimáticas de CMCase, Avicelase, Xilanase e β -glicosidase foram determinadas após 7, 15, 22 e 30 dias de crescimento a 30°C. As melhores atividades de CMCase foram obtidas com as linhagens 20 e H₂ (~200 UI/L), para atividade de avicelase os melhores resultados foram apresentados pelas linhagens 20, H₂ e *Trichocladium canadense* (~100, 120 e 80 UI/L, respectivamente). As maiores atividades de xilanase foram obtidas com as linhagens 20, 30 e LH₅ (~220 UI/L). Os melhores resultados para β -glicosidase foram obtidos com as linhagens 20 (~350 UI/L), LH₅, 30 e *Trichocladium canadense* (~280 UI/L).

SELEÇÃO DE FUNGOS LIGNINOLÍTICOS E ESTUDO DO SISTEMA ENZIMÁTICO E DA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICICLÍCOS. A.R. CLEMENTE & L.R. DURRANT (Lab. Sist. Fisiol. Microb. / DCA-FEA, UNICAMP C.P. 6121 Campinas, SP, 13081-970). Screening of ligninolytic fungi and study of enzymatic system and PAHs degradation.

O potencial biotecnológico de fungos que degradam lignina é vasto. Uma das aplicações é o seu uso no pré tratamento de madeiras, onde este pode remover seletivamente a lignina para a produção de polpa e papel. Outra importante aplicação destes fungos é quanto ao seu uso na bioremediação, devido à sua habilidade em degradar diversos poluentes tóxicos e recalcitrantes do meio ambiente, pela ação de enzimas ligninolíticas, como: lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase. Foram utilizadas treze linhagens de fungos, provenientes de amostras coletadas às margens do Rio Una do Prelado (Estação Ecológica de Juréia-Itatins). Estudou-se a produção das enzimas do sistema ligninolítico e a degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), durante o crescimento destes fungos em meio líquido contendo naftaleno e fenantreno como fonte de carbono. Após seis dias de crescimento em naftaleno todas as linhagens apresentaram lacase com siringaldequina como substrato (0.3-1.2 U/L), seis linhagens apresentaram MnP (2.6-67.4 U/L), e apenas duas linhagens apresentaram LiP (0.12 U/L). Após dez dias de crescimento em fenantreno com exceção de uma linhagem, as demais apresentaram lacase (0.12-0.45 U/L), a atividade de MnP foi apresentada por sete linhagens (0.81-8.3 U/L) e somente cinco linhagens apresentaram LiP (0.02-0.6 U/L). Quando estas amostras foram analisadas por HPLC utilizando-se coluna ZORBAX C18 fase reversa, fase móvel acetonitrila/H₂O (70:30), fluxo contínuo de 0,8 ml/min., e detector UV, verificou-se que ocorreram modificações dos cromatogramas dos PAHs quando comparados com o cromatograma de amostras controle, indicando que estes compostos foram degradados e que as enzimas ligninolíticas produzidas pelos fungos devem estar envolvidas nesta biodegradação.

VANILINA COMO PRODUTO DA BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS AROMÁTICOS DERIVADOS DA LIGNINA. H.R.F.BAVUTTI E L.R.DURRANT. (Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, CP 6121, 13081-970, Campinas SP). Vanillin as a Product of the Biodegradation of Phenolic Aromatic Lignin-Related Compounds.

Nos últimos anos o interesse comercial pela produção de vanilina a partir de compostos naturais tem aumentado significativamente, uma vez que sua produção a partir de algumas espécies de orquídeas é muito cara e sujeita às condições climáticas favoráveis. A vanilina é um metabólito intermediário na biodegradação de uma variedade de compostos, como o ácido ferúlico, lignina, eugenol, e estilbenos. O ácido ferúlico ocorre livremente ou em forma esterificada a polissacarídeos da parede celular, como xilana e manana, e aparece após oxidações ocorridas durante a formação da lignina.

Neste trabalho foram estudadas 37 linhagens de fungos isoladas do Rio Una do Prelado, (Estação Ecológica Juréia-Itatins). Os fungos foram inoculados em meio líquido contendo ácido ferúlico como fonte de carbono e sais minerais. Após 7 dias de crescimento os caldos foram filtrados e o sobrenadante submetido a HPLC. 7 linhagens escolhidas foram inoculadas em Erlenmeyers contendo meio de cultura composto por sais minerais, extrato de levedura e glicose em três condições: Teste 1; junto ao meio foi adicionado o ácido ferúlico, na concentração final de 0,001M, a 30°C sem agitação, Teste 2; o ácido ferúlico foi adicionado após três dias de crescimento, na mesma concentração final, sem agitação, a 30°C, e finalmente, Teste 3; onde o ácido ferúlico foi adicionado após três dias, na mesma concentração final, com agitação de 200 rpm/min. a 30°C. Foram tomadas alíquotas diárias e feita a monitoração da produção de vanilina através de HPLC, utilizando-se coluna ZORBAX C18 fase reversa, fase móvel metanol/H₂O (30:70) fluxo contínuo de 1,0 ml/min., e detector UV. As linhagens 755 e 1051 apresentaram melhores resultados de produção de vanilina (26mg/L e 31mg/L respectivamente). Os resultados foram confirmados por cromatografia em camada delgada e espectro de absorção.

ESTUDO DO SISTEMA LIGNINOLÍTICO DO FUNGO LINHAGEM H2 E UTILIZAÇÃO DE "INDUTORES" NO AUMENTO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS. E. B. NEVES & L. R. DURRANT. (Dep. Ciências de Alimentos/Unicamp. C.P. 6121 Campinas, S.P. 1381-970). Ligninolytic system of the fungus strain H2 and use of inductores to increase enzymatic activities.

A lignina-peroxidase, manganês-peroxidase e lacase são três famílias de enzimas que tem sido aplicadas na degradação biológica da lignina, bem como na biopolpação, branqueamento de polpa, degradação de poluentes orgânicos, etc. Atualmente tem se dado ênfase em selecionar enzimas e microrganismos que possam degradar a lignina. Em nosso trabalho estudamos o sistema enzimático do fungo basidiomiceto linhagem H2 e a possível indução pelo álcool veratrílico e melaço de cana no aumento das atividades enzimáticas. Foi adicionado ao meio de produção enzimática (glicose, sais minerais e vitaminas), álcool veratrílico (0,4 mM) ou melaço de cana (integral ou dialisado - 0,6%). Quando adicionamos melaço de cana integral, todas as atividades enzimáticas (lacase, peroxidase, MnP, LiP e AVO) apresentaram um aumento; a adição de melaço de cana (integral e dialisado), foi de forma significativa para a atividade de LiP, bem como de MnP. Os resultados obtidos com o fungo linhagem H2 foram comparados com o fungo *P. chrysosporium* - ATCC 24725 - o qual foi utilizado como padrão. Observou-se um aumento da atividade de LiP quando adicionamos melaço de cana dialisado de baixo peso molecular, registrou-se também um aumento da atividade de AVO, no entanto, com adição de melaço de cana integral. As atividades de lacase e peroxidase não apresentaram um aumento significativo com adição dos "indutores" e a atividade de MnP apresentou um aumento com a adição de melaço de cana integral e dialisado. De acordo com os resultados obtidos, concluímos que o melaço de cana (integral ou dialisado) possa estar agindo como indutor aumentando as atividades enzimáticas, quando comparados com as atividades em meio sem indutores, e que esta indução se realiza de forma diferente para cada enzima do sistema ligninolítico.

DESCOLORAÇÃO DE INDIGOTINA AZUL POR BASIDIOMICETOS LIGNINOLÍTICOS. D.S.L.BALAN¹ & R.T.R.MONTEIRO²

(¹FATEC-AM, Dept.Ens.Geral/CEETEPS, Av.N. S. Fátima 567- 13465-000 Americana,SP; ²CENA/USP, Seç.Ecologia, C.P 96, 13400-970 Piracicaba, SP) Decolorization of Indigo-Blue by Lignin-Degrading Basidiomycetes.

Os corantes sintéticos são extensivamente empregados pelas indústrias, especialmente têxteis. Por serem recalcitrantes têm recebido considerável atenção. A descoloração em meio líquido, contendo uma concentração final 0.02% do corante indigotina azul, foi monitorada por espectrofotometria. (PLATT, 1983) Foram testados os basidiomicetos *Phellinus gilvus* (CCB 254), *Phanerochaete chrysosporium* (CCB 539), *Picnoporus sanguineus* (CCB 458) e *Pleurotus ostreatus* (IB 440), inoculados em frascos com 60 ml de M.M.E através de discos de ágar. A razão de absorbância 580nm : 480 nm foi calculada e seu decréscimo indica a descoloração e remoção do corante do meio de cultura. Os resultados dos experimentos em triplicata, indicam a que a descoloração inicia-se em poucas horas, sendo que em 4 dias *P.gilvus*, *P. chrysosporium*, *P. sanguineus* e *P.ostreatus*, removem respectivamente 96%, 73%, 79% e 83% do corante do meio de cultura. Nenhum decréscimo de absorbância, foi observado na cultura controle estéril. O corante é adsorvido ao micélio, sendo conhecida a correlação entre degradação de xenobióticos e a descoloração de corantes (FIELD,1993). Já estabelecido como modelo, *P. chrysosporium*, realiza a transformação de xenobióticos por um complexo sistema ligninolítico de enzimas extra e intracelulares. Dentre elas estão peroxidases (LiPs), oxidases e peroxidases dependentes de manganês (MnPs). A descoloração de corantes, tem sido um bom indicador da transformação de xenobióticos mediada pela atividade enzimática de fungos.Esse fato, torna os basidiomicetos um grupo promissor para a aplicação em bioremediação.

DIVERSIDADE LIGNOCELULOLÍTICA DE FUNGOS MANCHADORES E APODRECEDORES DE MADEIRAS AMAZÔNICAS. M.A. JESUS. Centro de Pesquisas de Produtos Florestais/INPA. C.P. 478/CPPF/INPA, 69011-970, Manaus, AM.
Lignocelulolitic diversity of muold fungi and wood-rotting fungi from Amazon wood.

Alguns aspectos da biodegradação da madeira, vem sendo estudada no Centro de Pesquisas de Produtos Florestais visando a durabilidade natural das madeiras, o nível de degradação ocasionado por fungos apodrecedores, a diversidade e a distribuição destes em diferentes produtos de madeira. Paralelamente, o levantamento de fungos manchadores de madeira e o controle destes fungos vem também sendo realizado em madeiras serradas. Uma coleção composta de aproximadamente 200 espécies de fungos apodrecedores (Ascomycetes e Basidiomycetes) e 50 espécies de fungos manchadores (Deuteromycetes) resultou destas pesquisas. Algumas espécies dos seguintes gêneros; *Auricularia*, *Ceriporia*, *Hymenochaete*, *Leucogyrophana*, *Peniophora*, *Pleurotus*, *Phanerochaete*, *Pycnoporus*, *Schizopora*, *Tinctoporelus* apresentaram alta potencialidade degradativa da madeira em condições naturais (ecossistema floresta) e urbana, como também capacidade de degradar preservativos e hidroasfalto aplicados nas toras. De modo que alguns destes fungos podem ter aplicabilidades em processos de bioconversão lignocelulolítica ou de detoxificação de substâncias tóxicas.

ÍNDICE DE AUTORES

- | | |
|------------------------------|------------------------------|
| ALBUQUERQUE, M.A. 214 | COSTA, J.A. 228 |
| ALVES, V. 219 | DAMIANOVIC, M.H.R.Z. 227 |
| ANDRÉA, M.M. de 77 | DIAS, J.C.T. 241 |
| AOKI, A.H. 247 | DULKA, J.J. 183 |
| BALAN, D.S.L. 232, 252 | DURRANT, L.R. 233, 246, 247, |
| BARBIERI, S.M. 222, 237, 238 | 248, 249, 250, 251 |
| BARBOSA, T.C.P. 234, 235 | FABRIS, C. 243 |
| BAVUTTI, H.R.F. 250 | FADIGAS, F.S. 228 |
| BEDIN, M.L. 234 | FAULL, J.L. 215, 245 |
| BERTACINI, P.V. 236 | FAY, E. 221 |
| BERTON, R.S. 229, 230 | FORESTI, E. 227 |
| BOARETTO, A.E. 229, 230 | FORTES NETO, P. 226 |
| BOLAÑOS, R.M.L. 227 | FRANCHETTI, S.M.M. 231 |
| BOLLAG, J.M. 40 | FRIGHETTO, R.T.S. 219 |
| BONONI, V.L.R. 240, 243 | GABILAN, N.H. 234, 235 |
| BRIGANTE, J. 222 | GARCIA JÚNIOR, O. 54 |
| BRUCHA, G. 237 | GAYLARDE, C.C. 52 |
| BRUNNINGER, B. 217 | GOMES, L.P. 244 |
| BUENO NETO, C.L. 141 | GRAEME-COOK, K.A. 245 |
| BURANEL, P. 213 | GUIMARÃES, J. 235 |
| CARVALHO, D.F. 233 | JESUS, M.A. 253 |
| CASARINI, D.C.P. 21 | JOHNSON, A.C. 214 |
| CASSIOLATO, A.M.R. 221 | LANGENBACH, T. 129, 217, 223 |
| CELLA, A.C. 216 | LAVORENTI, A. 81 |
| CLEMENTE, A.R. 249 | LINARDI, V.R. 241 |



- MACHADO, K.M.G. 243
MACIEL, S.J. 217
MARCHI, D.D. 233
MARTIN NETO, L. 116
MATHEUS, D.R. 240, 243
MAZZAFERA, P. 131, 242
MELO, I.S. 215, 219, 221, 225, 245
MENTEN, J.O.M. 224
MOLFETTA, J.B. 238
MONTEIRO, R.T.R. 120, 213,
216, 224, 232, 252
MONTONE, R.C. 236
NAKAYAMA, C.R. 237
NEVES, E.B. 251
OLIVEIRA, D.M.F. 228
OLIVEIRA, M.C.B. de 206
ÖSTERREICHER-CUNHA, P. 223
PAVARINA, E.C. 248
PELLIZARI, V.H. 236
PEREZ-BARINOTTO, M.E. 234,
235
PEXE, C.A. 229, 230
PIRES, L.T.de A. 39
POVINELLI, J. 244
QUEIROZ, B.P.V. de 213
RODRIGUES, M.L.B.O. 231
ROQUE, M.R.A. 219
ROSA, C.A. 241
ROSAMIGLIA, A.C. 221
RUBIO, M.A. 74
SANTOS, D. 240
SANTOS, J.A.G. 228
SCHNEIDER, R.P. 152
SELBACH, P.A. 226
SETTE, L.D. 246
SILVA, A.C.F. 215, 224
SILVA, C.M.M.S. 215, 221, 225
SILVA, E.R. 231
SILVA, F.C. da 229, 230
STORINO, M. 216
TAVARES, J.T. 228
TORRES, J.P.M. 223
VASCONCELOS, B.C. de 217
VAZOLLER, R.F. 244
WAGNER, A.R. 223
WAIS, A. 213
WEBBER, R.R. 236
WOOD, M. 214
YANO, D.M.Y. 219, 242
YONAMINE, E.K. 238
ZOTELLI, H.B. 229, 230
ZUCCHI, T.M.A.D. 39

EMBRAPA

506

FICHA DO LIVRO

e.1

AUTOR

TÍTULO: Workshop sobre biodegradação, 1996, Campinas, SP. Anais.

DEVOLVER EM

NOME DO LEITOR

13/10/97

Carla Mazon Soares

28/05/99

Gisele Domingos Pereira

Alex T.



EMBRAPA

— BIBLIOTECA —

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente: Fernando Henrique Cardoso

Ministro da Agricultura e do Abastecimento:
Arlindo Porto

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Presidente: Alberto Duque Portugal
Diretores: Dante Daniel Giacomeli Scolari
José Roberto Rodrigues Peres
Elza Angela Battaglia Brito da Cunha

Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental - CNPMA

Chefe Geral: Clayton Campanhola
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento: Ariovaldo Luchiari Júnior
Chefe Adjunto Administrativo: Rosangela Blotta Abakerli



050
199
v. 1
PC-F

FOR THE OFFICE OF THE
DIRECTOR OF THE
BUREAU OF THE
CENSUS
WASHINGTON, D.C.
20540