

Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Centro de Biotecnologia

Bacharelado em Biotecnologia

Carol da Costa Schulze

**Verificação do potencial biodegradador de herbicidas em duas linhagens de *Bacillus safensis* isoladas de solo de canavial**

João Pessoa, Paraíba

2019

Carol da Costa Schulze

**Verificação do potencial biodegradador de herbicidas em  
duas linhagens de *Bacillus safensis* isoladas de solo de  
canavial**

Trabalho de conclusão de curso apresentado  
como requisito parcial para a obtenção do  
grau de bacharel em biotecnologia

Orientador: Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes

Coorientador: Thiago Gonçalves Cavalcanti

João Pessoa, Paraíba

2019

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

S391v Schulze, Carol da Costa.

Verificação do potencial biodegradador de herbicidas em duas linhagens de *Bacillus safensis* isoladas de solo de canavial / Carol da Costa Schulze. - João Pessoa, 2019.  
41 f.

Orientação: Ulrich Vasconcelos.

Coorientação: Thiago G Cavalcanti.

Monografia (Graduação) - UFPB/Biotecnologia.

1. biorremediação. 2. ametrina. 3. hexazinona. 4. respiração induzida por substrato. I. Vasconcelos, Ulrich. II. Título.

UFPB/BC

Carol da Costa Schulze

**VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL BIORREMEDIADOR DE  
HERBICIDAS POR LINHAGENS DE *Bacillus safensis* ISOLADAS  
DE SOLO DE CANAVIAL**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), submetido ao curso de  
Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como  
requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

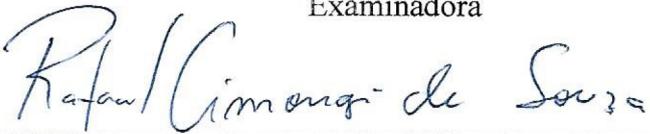
Aprovado em: 26 de abril de 2019

**BANCA EXAMINADORA**

  
Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (DB/CBIOTEC/UFPB)  
Orientador

  
Thiago Gonçalves Cavalcanti (PGBCM/COEN/UFPB)  
Coorientador

  
Andrea Farias de Almeida (DB/CBIOTEC/UFPB)  
Examinadora

  
Rafael Limongi de Souza (RENORBIO/UFPB)  
Examinador

# Agradecimentos

Aos meus pais e familiares pelo apoio contínuo, encorajamento e paciência através dos labirintos que aparecem na vida.

Ao meu pai, Guilherme Schulze, em especial, por seu apoio incondicional em momentos difíceis nesses últimos quatro anos.

À minha mãe, Kátia Santos, pelo amor e entendimento através de escolhas difíceis.

À minha irmã, Manuella Sancho, por aturar essa minha pessoa constantemente cansada e reclamona.

Ao meu orientador e amigo, Ulrich Vasconcelos, pelo eterno apoio, as palavras de encorajamento, pela paciência e confiança.

À Patrik Zarpellon e Wagner Faustino, colegas frequentes e aplicados em grupos de trabalhos e seminários, sempre pacientes com meus atrasos.

Aos professores do Centro de Biotecnologia e à minha turma, pela união, bom humor, compreensão e empenho. O curso não teria sido tão completo sem vocês.

Ao Laboratório de Química Quântica Computacional, em especial à Gerd Bruno e Gabriel Urquiza, pelo acolhimento e confiança durante minha estadia balística no laboratório.

Ao CNPq pelo fomento à esta pesquisa por meio do Processo n° 40766/2013-3 (Edital MCTI/CNPq/FNDCT - Ação Transversal - Redes Regionais de Pesquisa em Ecossistemas, Biodiversidade e Biotecnologia n° 79/2013).

# Resumo

Herbicidas são substâncias fitotóxicas ostensivamente utilizadas na agricultura. Os herbicidas são essenciais para o sistema produtivo mundial, sem os quais não seria possível suprir a crescente demanda agrícola. Infelizmente, essas substâncias podem contaminar os solos e as águas, provocando efeitos tóxicos em outros organismos. Portanto, a remoção ou inativação desses compostos é de extrema importância. Dentre as metodologias descritas na literatura, o uso de organismos selecionados, ou biorremediação, é simples e barata de ser executada. A escolha do organismo é de extrema importância, já que ele deve sobreviver e ser capaz de cumprir seu papel em um ambiente contaminado. O objetivo desse trabalho foi verificar o potencial biodegradador de duas linhagens selvagens de *Bacillus safensis*. As linhagens aclimatadas aos herbicidas foram testadas em reatores contendo solo esterilizado contaminado com 50 mg/kg de ametrina ou hexazinona e, durante 60 dias, avaliadas com relação à produção de CO<sub>2</sub> em presença ou ausência de fertilizante NPK e surfactante. O pH do solo foi monitorado durante esse período. O controle do teste foi realizado com solo previamente esterilizado, e com aplicação de AgNO<sub>3</sub> 10% (m/v) periodicamente. Não foi observada diferença aparente da produção de CO<sub>2</sub> entre as duas linhagens testadas. Observou-se uma produção máxima entre cerca de 830 mg de CO<sub>2</sub> por grama de solo e 1560 mg/g. O potencial das linhagens foi melhor verificado na presença de ametrina, porém o potencial degradador foi também demonstrado frente hexazinona, confirmado posteriormente com um ensaio de ecotoxicidade utilizando *Letuca sativa* e *Cucumis anguria*. Dessa forma, as duas linhagens testadas mostram um potencial de uso em protocolos de biorremediação de herbicidas.

**Palavras-chave:** biorremediação, ametrina, hexazinona, respiração induzida por substrato

# Abstract

Herbicides are phytotoxic substances that are widely used in agriculture. Herbicides are essential to the global production, without which it would not be possible to match the growing demand on agricultural products. Unfortunately, these substances can contaminate soil and water, creating toxic effects in other organisms. Thus, the removal or inactivation of these compounds is extremely important. From described methodologies in the literature, the use of selected organisms, or biorremediation, is simple and cheap to use. The choice of organism is extremely important, as it needs to survive and do its job in a contaminated environment. The objective of this work was to verify the biodegradation potential of two wild *Bacillus safensis* strains. Both strains adapted to the herbicides were tested in reactors containing sterilized soil contaminated with 50 mg/kg of either ametryn or hexazinone and, throughout 60 days, were evaluated in regards to their production of CO<sub>2</sub> with and without the presence of NPK fertilizer and surfactant. The soil's pH was monitored during this period. The test control was through a reactor with previously sterilized soil, and with periodic application of AgNO<sub>3</sub> 10% (m/v). No apparent differences in the production of CO<sub>2</sub> were observed between the two tested strains. A maximum production between about 830 mg of CO<sub>2</sub> per gram of soil and 1560 mg/g was observed. The potential of both strains was best verified with the presence of ametryn, although the potential for degradation was also demonstrated with hexazinone, later confirmed through a ecotoxicity test using *Letuca sativa* and *Cucumis anguria*. Thus, both tested strains show potential to be used in herbicide biorremediation protocols.

**Keywords:** biorremediation, ametryn, hexazinone, substrate-induced respiration

# Lista de Figuras

Figura 1 – Esquema da fase clara da fotossíntese em plantas e algas. As flechas azuis denotam o caminho do transporte de elétrons, e as flechas vermelhas o transporte de $H^+$ . <i>PSII</i> e <i>PSI</i> são os fotossistemas II e I, respectivamente. . . . .	15
Figura 2 – Esquema do fotossistema II com flechas vermelhas denotando o caminho de transporte dos elétrons. Herbicidas bloqueadores do fotossistema II se ligam irreversivelmente à subunidade D1, inibindo a atividade do fotossistema e da cadeia transportadora de elétrons. . . . .	16
Figura 3 – $N_2$ -etil- $N_4$ -isopropil-6-metiltiol-1,3,5-triazina-2,4-diamina, o herbicida ametrina (ALTA, 2018; ANVISA, 2006a) . . . . .	17
Figura 4 – 3-ciclohexil-6-dimetilamina-1-metil-1,3,5-triazina-2,4 (1 H, 3 H)-diona, o herbicida hexazinona (NORTOX, 2018; ANVISA, 2006b). . . . .	17
Figura 5 – Produção média cumulativa de $CO_2$ pela <i>B. safensis</i> C1AC5507-1 em reatores de triagem contaminados com ametrina. . . . .	26
Figura 6 – Produção média cumulativa de $CO_2$ pela <i>B. safensis</i> C1C5502-1 em reatores de triagem contaminados com ametrina. . . . .	26
Figura 7 – Produção média cumulativa de $CO_2$ pela <i>B. safensis</i> C1AC5507-1 em reatores de triagem contaminados com hexazinona. . . . .	27
Figura 8 – Produção média cumulativa de $CO_2$ pela <i>B. safensis</i> C1C5502-1 em reatores de triagem contaminados com hexazinona. . . . .	27
Figura 9 – Produção média cumulativa de $CO_2$ pela <i>B. safensis</i> C1AC5507-1 em reatores contaminados com ametrina. . . . .	29
Figura 10 – Produção média cumulativa de $CO_2$ pela <i>B. safensis</i> C1C5502-1 em reatores contaminados com ametrina. . . . .	29
Figura 11 – Produção média cumulativa de $CO_2$ pela <i>B. safensis</i> C1AC5507-1 em reatores contaminados com hexazinona. . . . .	30
Figura 12 – Produção média cumulativa de $CO_2$ pela <i>B. safensis</i> C1C5502-1 em reatores contaminados com hexazinona. . . . .	30
Figura 13 – Índice de germinação das sementes em solos contaminado com ametrina e hexazinona sem tratamento, relativo ao controle com água destilada. . . . .	32
Figura 14 – Índice de germinação das sementes em solo contaminado com ametrina após tratamento com <i>B. safensis</i> C1AC5507-1 relativo ao controle com água destilada. . . . .	32
Figura 15 – Índice de germinação das sementes em solo contaminado com ametrina após tratamento com <i>B. safensis</i> C1C5502-1 relativo ao controle com água destilada. . . . .	33

Figura 16 – Índice de germinação das sementes em solo contaminado com hexazina após tratamento com <i>B. safensis</i> C1AC5507-1 relativo ao controle com água destilada. . . . .	33
Figura 17 – Índice de germinação das sementes em solo contaminado com hexazina após tratamento com <i>B. safensis</i> C1C5502-1 relativo ao controle com água destilada. . . . .	34

# Lista de Quadros

- Quadro 1 – Condições experimentais do ensaio preliminar para uma única linhagem. 22
- Quadro 2 – Condições experimentais do ensaio em reator para uma única linhagem. 23

# Lista de Tabelas

Tabela 1 – Características físico-químicas do solo. . . . .	21
Tabela 2 – Espécies empregadas no ensaio de ecotoxicidade. . . . .	24

# Sumário

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	12
2	<b>OBJETIVOS</b>	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	15
3.1	Fotossíntese	15
3.2	Herbicidas Bloqueadores do Fotossistema II	16
3.3	<i>Bacillus safensis</i>	18
3.4	Métodos de Análise do Potencial Degradador de Bactérias	18
3.4.1	Respiração Induzida por Substrato	18
3.4.2	Monitoramento da Variação de pH	18
3.4.3	Utilização do Contaminante como Fonte de Carbono	19
4	<b>METODOLOGIA</b>	20
4.1	Linhagens de <i>Bacillus safensis</i>	20
4.2	Herbicidas	20
4.3	Solo	20
4.4	Determinação da Viabilidade	21
4.5	Aclimação aos Herbicidas	21
4.6	Ensaio Preliminar	21
4.7	Ensaio em Reator	22
4.8	Determinação da Concentração de CO <sub>2</sub>	23
4.9	Determinação do pH do Solo	23
4.10	Ensaio de Ecotoxicidade	24
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	25
5.1	Ensaio Preliminar	25
5.2	Ensaio em Reator	28
5.3	Ensaio de Ecotoxicidade	31
6	<b>CONCLUSÃO</b>	35
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	36

# 1 Introdução

Herbicidas são substâncias fitotóxicas usadas para eliminar ou inibir o crescimento de plantas indesejadas, principalmente na agricultura onde ervas daninhas comumente atrapalham a produção (GUPTA, 2011). Os herbicidas têm sido responsáveis por um aumento significativo na produção agrícola nas últimas décadas, em que chegam a dobrar a produção anual na mesma área cultivável (FARLAND; BURNSIDE, 2011). Infelizmente, o uso indiscriminado dessas substâncias têm levado à contaminação dos solos e das águas, com efeitos tóxicos na ecologia mundial e na biologia humana (MARIN-MORALES; VENTURA-CAMARGO; HOSHINA, 2013; ALBANITO et al., 2015).

Por pior que sejam os efeitos deletérios de herbicidas, seu uso é essencial para a sociedade moderna e, paradoxalmente, à própria preservação da natureza. Sem o aumento da produção proporcionado por pesticidas em geral, a área agrícola necessária para a produção de comida suficiente para sustentar a população mundial se aproxima de toda a área terrestre fértil no planeta (FARLAND; BURNSIDE, 2011).

Herbicidas comerciais derivam seu efeito tóxico de diferentes possíveis mecanismos, e podem pertencer à uma variedade de classes químicas (DUKE, 1990). Os herbicidas com mecanismos conhecidos incluem o notório glifosato, que age bloqueando a síntese de aminoácidos aromáticos (SCHONBRUNN et al., 2001), o metolacoloro, que causa disfunções hormonais (WILKINSON, 1981), o paraquat, que induz a formação de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (YOUNGMAN; DODGE, 2014), e o 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilureia (DCMU<sup>1</sup>) que inibe a fotossíntese (BARRY; YOUNG; BRITTON, 1990).

Infelizmente, herbicidas tendem a ser de difícil degradação e a acumular em solos, rios e aquíferos (AHEMAD et al., 2009). Vários métodos químicos, como ozonólise e catalisadores específicos, e biológicos, com o uso de plantas e microorganismos, têm sido propostos para a remoção desse tipo de contaminante (CACHO et al., 2006; MULLER et al., 1998; ROBERT; MALATO, 2002; KOMIVES; GULLNER, 2006; CUNNINGHAM; BERTI, 1993; WALLNOFER, 1969).

Dentre essas alternativas, os métodos biológicos de remoção de contaminantes, ou *biorremediação*, são atrativos pelo baixo custo e maior aceitação do público. Na *biorremediação*, organismos selecionados da biota natural são usados para degradar ou remover contaminantes específicos, frequentemente com o uso de adjuvantes para garantir o sucesso do processo (VIDALI, 2001).

Tendo em vista essa problemática, este trabalho se destinou à investigação do

---

<sup>1</sup> Comercializado sob o nome *Diuron*

---

potencial biodegradador de duas linhagens de *Bacillus safensis* em solos contaminados com dois herbicidas inibidores da fotossíntese: ametrina e hexazinona. Essa investigação foi realizada por meio de triagens de viabilidade e ensaios microbiológicos baseados na metodologia de *substrate-induced respiration* (SIR).

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial biodegradador de ametrina e hexazinona em solo por duas linhagens de *Bacillus safensis*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Constatar a viabilidade das linhagens em meio contendo somente um herbicida como fonte de carbono;
- Estimar a atividade metabólica ao longo do tempo em solos contaminados com um herbicida e potenciais aditivos pelo acompanhamento da concentração de CO<sub>2</sub> em recipiente selado e do pH do solo;
- Verificar a redução da contaminação do solo por herbicida por meio de ensaios de ecotoxicidade.

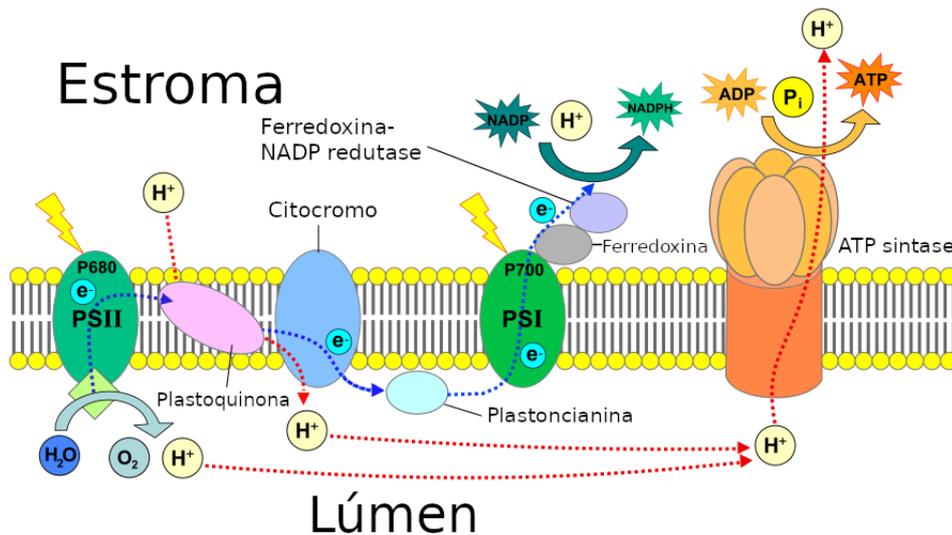
## 3 Referencial Teórico

### 3.1 Fotossíntese

Segundo Junqueira e Filho (2012), a fotossíntese é um processo biológico em que água e dióxido de carbono passam por uma reação de oxirredução sob presença de luz, produzindo oxigênio molecular e carboidrato. Em plantas e algas essa reação ocorre em organelas especializadas, os cloroplastos, possuindo uma membrana em bicamada e contendo um sistema de membranas internas, o tilacoide.

As reações da fotossíntese são divididas em duas fases: clara e escura. As reações da fase clara ocorrem na membrana dos tilacoides, onde estão presentes complexos proteicos específicos, e na presença de luz. Nessa fase há um transporte de elétrons do lúmen do tilacoide ao estroma do cloroplasto através dos fotossistemas I e II e diferentes proteínas auxiliares. Essa fase resulta na redução de NADP em NADPH e na produção de ATP pela ATP sintase (Figura 1).

**Figura 1** – Esquema da fase clara da fotossíntese em plantas e algas. As flechas azuis denotam o caminho do transporte de elétrons, e as flechas vermelhas o transporte de  $H^+$ . *PSII* e *PSI* são os fotossistemas II e I, respectivamente.



Modificado de: Somepics (2015)

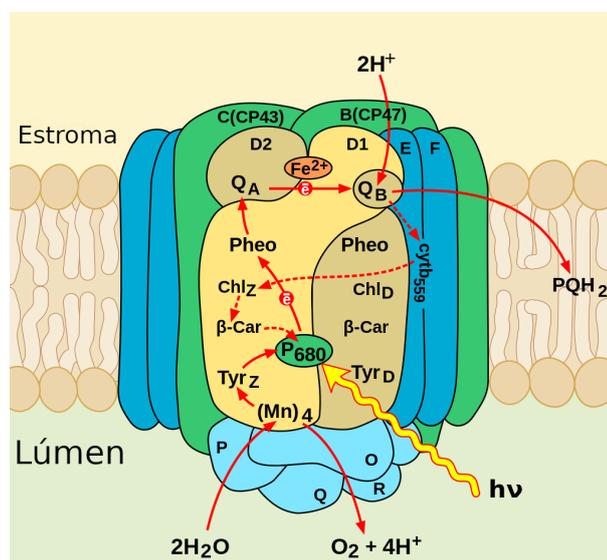
Já a fase escura ocorre no estroma com o ciclo de Calvin. Nesse ciclo  $CO_2$  atmosférico é capturado e reduzido em carboidratos com consumo de ATP e NADPH produzido na fase clara. Esses carboidratos servem como fonte de energia para o organismo.

## 3.2 Herbicidas Bloqueadores do Fotossistema II

Os vários herbicidas dependem de diferentes efeitos e mecanismos para ter o efeito tóxico desejado (DUKE, 1990). Desses, os herbicidas bloqueadores do fotossistema II são amplamente utilizadas no mundo todo e são alvos de estudos desde a introdução do primeiro exemplar (FARLAND; BURNSIDE, 2011): a simazina, em 1956 (HERI et al., 2008). À época de sua introdução nos plantios, esses herbicidas se mostraram altamente eficazes no aumento da produção agrícola (FARLAND; BURNSIDE, 2011).

Os herbicidas bloqueadores do fotossistema II pertencem a diferentes possíveis classes químicas, como triazinas e derivados da ureia. Embora haja uma certa variação nos detalhes das ligações químicas, todos os herbicidas descritos dessa classe se ligam irreversivelmente à subunidade D1 do fotossistema II, bloqueando assim a ligação da plastoquinona e prevenindo o transporte de elétrons e o processo de fotossíntese (DUKE, 1990; HERI et al., 2008). Esses herbicidas podem ser seletivos, com dependência em resíduos clado-específicos da subunidade D1 (OETTMEIER, 1999). A Figura 2 esquematiza o fotossistema II.

**Figura 2** – Esquema do fotossistema II com flechas vermelhas denotando o caminho de transporte dos elétrons. Herbicidas bloqueadores do fotossistema II se ligam irreversivelmente à subunidade D1, inibindo a atividade do fotossistema e da cadeia transportadora de elétrons.



Modificado de: Kaidor (2017)

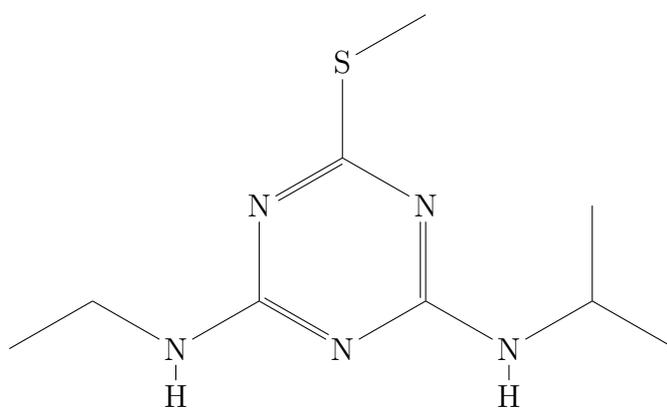
É possível que exemplares dessa classe tenham um possível potencial carcinogênico ou ação endócrina (ALBANITO et al., 2015; MACLENNAN et al., 2002; DELANCEY et al., 2009). No entanto, esses herbicidas ainda são amplamente utilizados, especialmente na sucrocultura e de forma preventiva (TIRONI; SOUZA, 2013).

Um dos grupos de herbicidas bloqueadores do fotossistema II mais empregados

compreende as triazinas, caracterizados por um heterociclo com três átomos de nitrogênio intercalados entre três átomos de carbono. Aqui também se incluem as triazinonas, triazinonas com grupamentos cetona no heterociclo. A ametrina e hexazinona pertencem a esses dois grupos, respectivamente, e foram as triazinonas mais utilizadas, ao longo de 14 anos, no solo do canavial em que as linhagens da *B. safensis* utilizada neste trabalho foram colhidas.

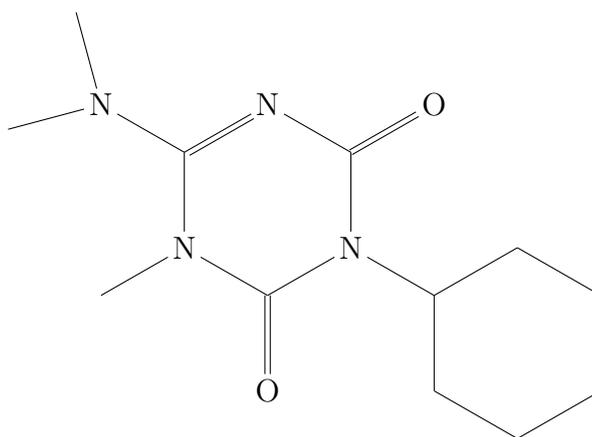
A estrutura molecular da ametrina e hexazinona estão representadas nas Figuras 3 e 4.

**Figura 3** – N<sub>2</sub>-etil-N<sub>4</sub>-isopropil-6-metilol-1,3,5-triazina-2,4-diamina, o herbicida ametrina (ALTA, 2018; ANVISA, 2006a)



Fonte: Autor (2019)

**Figura 4** – 3-ciclohexil-6-dimetilamina-1-metil-1,3,5-triazina-2,4(1H,3H)-diona, o herbicida hexazinona (NORTOX, 2018; ANVISA, 2006b).



Fonte: Autor (2019)

A ametrina e a hexazinona são classificadas como pouco tóxicas em caso de exposição aguda (ANVISA, 2006a; EPA, 2010; ANVISA, 2006b; EPA, 2015). Segundo a *Environment Protection Agency* (EPA), a agência de proteção ambiental americana, efeitos adversos a longo prazo são provavelmente inexistentes se consumidos em doses abaixo do limite regulatório (EPA, 2010; EPA, 2015).

### 3.3 *Bacillus safensis*

O *Bacillus safensis* é um bacilo Gram-positivo, aeróbio, mesófilo, quimioheterotrófico e formador de esporos. As células têm entre 0,5 e 0,7  $\mu\text{m}$  de diâmetro e entre 1 e 1,2  $\mu\text{m}$  de largura. As condições ótimas de crescimento são de 30 a 37 °C e pH entre 4 e 8, dependendo da linhagem (LATEEF; ADELERE; GUEGUIM-KANA, 2015).

Inicialmente isolada por Satomi, Duc e Venkateswaran (2006) na *Spacecraft Assembly Facility* (SAF) da NASA, a *B. safensis* é bem adaptada às condições extremas incluindo salas limpas, desertos salinos, ambientes contaminados por petróleo e efluentes industriais. Esse bacilo também é sintetizador de amilases, celulasas, proteases, lipases, xilanases, quitinases, inulinases, queratinases, e  $\beta$ -galactosidases (LATEEF; ADELERE; GUEGUIM-KANA, 2015).

Abdelbagi et al. (2018) utilizaram com sucesso uma linhagem de *B. safensis* para biorremediação de dois inseticidas. Motesharezadeh e Savaghebi-Firoozabadi (2011) mostraram o potencial do bacilo como adjuvante em certos tipos de fitorremediação de solos contaminados com níquel. Lateef, Adelere e Gueguim-Kana (2015) apresentam uma revisão da aplicabilidade da *B. safensis* em processos biotecnológicos, incluindo a biorremediação.

## 3.4 Métodos de Análise do Potencial Degradador de Bactérias

### 3.4.1 Respiração Induzida por Substrato

Introduzido por Anderson e Domsch (1978), a metodologia de *substrate-induced respiration* (SIR) foi originalmente utilizada para estimar a biomassa celular em um recipiente fechado pela aferição do  $\text{CO}_2$  dentro do recipiente, comparado com os resultados de um controle abiótico. Em sua forma original, essa aferição era feita por cromatografia gasosa. O princípio da metodologia — a correlação de  $\text{CO}_2$  acima de níveis abióticos e massa celular — também é útil na confirmação e acompanhamento da atividade celular. Severino et al. (2005) exemplificam essa ideia ao acompanhar a atividade microbiana na mineralização de diferentes substratos. Nesse caso, foi feita um acompanhamento baseada na difusão de  $\text{CO}_2$  catalisada em solução de NaOH e subsequente titulação dos carbonatos formados.

### 3.4.2 Monitoramento da Variação de pH

A observação da variação do pH ao longo de um monitoramento, em meio líquido ou sólido, é um importante indicativo da utilização dos compostos-teste por agentes microbianos. Podem ser observados os dois extremos. O pH fixado inicialmente em um determinado valor sofre alterações por razões da metabolização e formação de produtos

como ácidos orgânicos, tendendo à redução do pH, comparado ao observado inicialmente (WATSON et al., 2002), ou na formação de amônia e demais compostos alcalinos, promovendo desta vez o aumento do pH, comparado ao determinado inicialmente (ZIEGLER et al., 2013)

A variação decorre em função da atividade metabólica normal dos micro-organismos, produzindo e secretando diferentes metabólitos para o meio. Além disso, as mudanças do pH podem sinalizar o ambiente preferencial do agente microbiano, geralmente ácido para fungos e do neutro ao alcalino para bactérias, embora qualquer um destes micro-organismos possa ser adaptado às condições específicas de pH (MADIGAN et al., 2017).

### 3.4.3 Utilização do Contaminante como Fonte de Carbono

Outro importante método de observação de potencial degradador microbiano diz respeito aos testes de utilização de diferentes moléculas como fonte de carbono e energia. Estes testes podem ser empregados em meios sólidos e líquidos (WOOD; KRIEG, 1989). No primeiro caso, menos comum, o organismo-teste é colocado em ágar simples ou ágar mineral e a fonte de carbono pode ser adicionada na forma de spray (CLAXTON, 2015). Neste tipo de teste, o objetivo é verificar o crescimento, permitindo a quantificação ou o isolamento das colônias formadas. Nos testes em meio líquido, podendo optar se em caldo ou meio mineral, o organismo é estimulado a utilizar os compostos-teste como fontes principais de carbono. O crescimento pode ser conhecido pela turvação do meio, podendo também ser expresso em densidade óptica, pela alteração na coloração do meio, quando um corante ou solução indicadora está adicionada na composição do meio (VEERANAGOUDA; PATIL; KAREGOUDAR, 2004), ou pelo no colapso da gota, quando há redução da tensão superficial entre dois líquidos imiscíveis, geralmente compostos oleosos, promovendo sua ruptura (TUGRUL; CANSUNAR, 2005).

## 4 Metodologia

O estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia Ambiental, no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba.

### 4.1 Linhagens de *Bacillus safensis*

Nesse trabalho, foram utilizadas duas linhagens de *Bacillus safensis*, com os acessos C1AC5507-1 e C1C5502-1, isoladas de canaviais da região próxima à João Pessoa/PB. Amostras do bacilo foram cedidas como parte do projeto *Utilização de biossurfactante produzido por microrganismos do solo na remoção de herbicidas* com o cadastro na plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) número A06A1E6.

### 4.2 Herbicidas

Dois herbicidas foram selecionados para o estudo devido à sua disponibilidade: ametrina (ALTA, Curitiba, Brasil) e hexazinona-D (Nortox, Arapongas, Brasil), o primeiro do grupo químico das triazinas (ALTA, 2018; ANVISA, 2006a) e o segundo do grupo químico das triazinonas (NORTOX, 2018; ANVISA, 2006b). Ambos foram adquiridos em 2017 em João Pessoa, na Paraíba, com números de lote 139-16-12600-22/NOV/16 (ametrina) e 081-17-4810 (hexazinona).

Ambos os herbicidas foram solubilizados em água destilada e acondicionados em recipientes de vidro, sendo homogenizados em vórtex antes de serem utilizados.

### 4.3 Solo

Foi utilizado um solo arenoso adquirido em uma casa de material de construção, em João Pessoa, na Paraíba. Esse solo foi previamente caracterizado pelo laboratório Eurofins Anatech, de Recife/PE, sumarizado na Tabela 1.

**Tabela 1** – Características físico-químicas do solo.

<b>Característica</b>	<b>Resultado</b>
Textura	
Argila	0,99 %
Silte	1,29 %
Areia	95,86 %
Cascalho	1,86 %
Carbono Orgânico Total	0,74 mg/kg
Nitrogênio Total	31,8 mg/kg
Fósforo Total	3,04 mg/kg
pH em água	7,35
Umidade	0,3 %

Fonte: (CARTAXO, 2018)

#### 4.4 Determinação da Viabilidade

As duas linhagens foram incubadas em caldo nutriente, composto de extrato de levedura (3 g/L) e extrato de carne (5 g/L), por 48 horas a 37 °C. Uma alíquota de 0,5 mL do caldo foi transferida para meio mineral mínimo constituído de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5 g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 g/L), MgSO<sub>4</sub> (0,5 g/L), FeCl<sub>2</sub> (10 mg/L), CaCl<sub>2</sub> (10 mg/L), MnCl<sub>2</sub> (0,1 mg/L) e ZnSO<sub>4</sub> (0,01 mg/L) (PALITTAPONGARNPIM et al., 1998) acrescido de 0,1 mL de herbicida diluído (0,5 g/L de hexazinona ou 1 % v/v de ametrina). Também foram testados grupos com e sem extrato de levedura (0,5 g/L). A viabilidade foi então constatada com uma inspeção visual após 5 dias de incubação estática à 37 °C.

#### 4.5 Aclimação aos Herbicidas

Para aclimatar as linhagens aos herbicidas a serem testados foi utilizado uma metodologia baseada no trabalho de Del'Arco e França (1999). Os bacilos foram incubadas em meio mineral mínimo acrescido de 0,1 g/L de extrato de levedura e contaminadas por concentrações gradualmente maiores do princípio ativo do herbicida: 5 mg/L, 10 mg/L e 20 mg/L, calculado segundo as informações contidas na bula de cada herbicida (ALTA, 2018; NORTOX, 2018). Em cada etapa da série, o caldo foi incubado até turvar em shaker à 30 °C e 150 rpm, com transferência de 10 mL do caldo turvo para o próximo da série.

#### 4.6 Ensaio Preliminar

Foi realizado um ensaio preliminar em escala reduzida com o objetivo de testar a compatibilidade do bacilo com o solo contaminado, seguindo a metodologia de Severino et al. (2005), além de dois possíveis aditivos: fertilizante químico, como frequentemente presente em solos contaminados com herbicidas, e glicerol como uma possível fonte secundária

de carbono. Foram realizadas medições periódicas do CO<sub>2</sub> produzido pelo metabolismo do bacilo e do pH do solo. A partir dos resultados do ensaio preliminar foi selecionada a condição mais favorável para o ensaio principal.

Esse ensaio foi conduzido em reatores descartáveis de polietileno semitransparentes com volume de 500 mL e tampa selante. Um total de 200 g de solo esterilizado e posteriormente contaminado com ametrina ou hexazinona (50 mg/kg do princípio ativo) foram distribuídos em cada reator. Após mistura vigorosa com espátula descartável de madeira, um recipiente contendo 25 mL de solução de NaOH 0,5 mol/L foi deixado repousando na superfície do solo, sendo utilizado para o teste de determinação do CO<sub>2</sub> formado. Foram testados oito condições experimentais (Quadro 1) para cada linhagem, compreendendo cada combinação das seguintes variáveis: presença ou não de fertilizante químico NPK 10:10:10 (Vitaplan, Capitão Leônidas Marques, Brasil) e glicerol (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). O inóculo foi preparado em 20 mL de meio mineral mínimo (PALITTAPON-GARNPIM et al., 1998) a partir das linhagens aclimatadas e mantidas no LAMA. Foram confeccionados dois controles do teste: o solo contaminado (negativo), mantida a assepsia com solução de AgNO<sub>3</sub> 10% (m/v) (VASCONCELOS; FRANÇA; OLIVEIRA, 2011) e o solo contaminado contendo a suspensão de cada linhagem (positivo). O ensaio foi realizado em duplicata.

**Quadro 1** – Condições experimentais do ensaio preliminar para uma única linhagem.

Código	Contaminante	Fertilizante (0,1 mg/g)	Glicerol (0,25 mL/kg)
C-	-	-	-
C+	-	-	+
A/F-G-	Ametrina	-	-
A/F-G+	Ametrina	-	+
A/F+G-	Ametrina	+	-
A/F+G+	Ametrina	+	+
H/F-G-	Hexazinona	-	-
H/F-G+	Hexazinona	-	+
H/F+G-	Hexazinona	+	-
H/F+G+	Hexazinona	+	+

O teste durou 25 dias, com determinações do CO<sub>2</sub> e pH em d = 5, 10 e 20. Após cada leitura, o solo era novamente homogeneizado com auxílio de uma espátula descartável de madeira previamente autoclavada e um novo recipiente contendo a solução de NaOH adicionado.

## 4.7 Ensaio em Reator

Foi realizado o ensaio do potencial biodegradador das linhagens de forma similar ao ensaio preliminar, incluindo o controles negativo (seção 4.6). Os reatores foram

completados com 250 g de solo esterilizado, contaminado com os herbicidas e o ensaio durou 60 dias, avaliando três condições experimentais para cada linhagem e para cada contaminante, sumarizadas no Quadro 2. O teste foi realizado em duplicata.

**Quadro 2** – Condições experimentais do ensaio em reator para uma única linhagem.

Código	Contaminante	Biossurfactante (0,1 g/L)	Fertilizante (0,1 g/kg)
C-	-	-	-
A/F-S+	Ametrina	-	+
A/F+S-	Ametrina	+	-
A/F+S+	Ametrina	+	+
H/F-S+	Hexazinona	-	+
H/F+S-	Hexazinona	+	-
H/F+S+	Hexazinona	+	+

A concentração de CO<sub>2</sub> e a determinação do pH foram conhecidas nos dias 5, 10, 25, 40 e 55. No final dos 60 dias, foram tomadas amostras de solo de cada condição experimental para realização do ensaio de ecotoxicidade (seção 4.10)

## 4.8 Determinação da Concentração de CO<sub>2</sub>

O acompanhamento da concentração de CO<sub>2</sub> da atmosfera de cada reator foi baseado no trabalho de Severino et al. (2005). Inicialmente, recipientes plásticos de 50 mL contendo 25 mL de uma solução 0,5 mol/L de NaOH foram acomodados dentro de cada reator. Em cada ponto de medição, os recipientes foram substituídos por novos contendo novas soluções de NaOH à 0,5 mol/L. Assim que retirados dos reatores, os recipientes receberam 2 mL de solução 0,5 mol/L de BaCl<sub>2</sub>. Por último, o conteúdo de cada recipiente recebeu vermelho de fenol 2 % e foi titulado com HCl à 0,5 mol/L até o ponto de viragem do vermelho de fenol. O volume gasto foi então convertido em CO<sub>2</sub>, em mg/g de solo, presente em cada reator pela equação:

$$\text{CO}_2 = \frac{44(V_0 - V_1)}{m} \quad (1)$$

em que  $V_0$  é o volume gasto pelo controle negativo,  $V_1$  o gasto pelo experimental, e  $m$  é a massa em kg de solo dos reatores.

## 4.9 Determinação do pH do Solo

O pH do solo foi medido segundo a metodologia descrita por Vasconcelos (2011). Solo e água destilada foram adicionados em um falcon de 50 mL na proporção de 2:5. A mistura foi homogeneizada em vórtex e então posta em repouso até a decantação do solo.

O pH do sobrenadante foi então aferido com um potenciômetro (Lucadema Luca-210) previamente calibrado com soluções padrão de pH 4 e 7.

## 4.10 Ensaio de Ecotoxicidade

Foi realizado um ensaio de fitotoxicidade segundo a metodologia de Tiquia, Tam e Hodgkiss (1996) para confirmar a degradação dos herbicidas. Sementes de espécies selecionadas por sua disponibilidade foram lavadas com água destilada e postas para secar em papel filtro. Para cada condição experimental e cada semente, foi confeccionada uma placa de Petri contendo uma camada de papel filtro onde dez sementes foram acomodadas. O papel filtro foi então embebido com 8 mL de uma mistura previamente filtrada de 10 g de solo e 90 mL de água destilada. Foi também elaborado um controle com água destilada. As placas foram então acondicionadas em um ambiente controlado a 22 °C por cinco dias. No final desse período, o índice de germinação ( $I_g$ ) foi calculado segundo a seguinte fórmula:

$$I_g = 100 \frac{S_1 R_1}{S_2 R_2} \quad (2)$$

em que  $S_1$  e  $S_2$  são o número de sementes que germinaram na condição experimental e no controle, respectivamente. Similarmente,  $R_1$  e  $R_2$  são os comprimentos médios das raízes das sementes que germinaram. Quanto mais baixo o  $I_g$ , maior a toxicidade. Valores acima de 100% são possíveis.

No ensaio de ecotoxicidade foram empregadas sementes de duas espécies, como detalhado na Tabela 2. Todas as sementes foram adquiridas em João Pessoa, Paraíba e são produzidas por Feltrin (Farroupilha, Brasil).

**Tabela 2** – Espécies empregadas no ensaio de ecotoxicidade.

Nome Popular	Nome Binomial	Comprimento Médio da Semente
Alface	<i>Lactuca sativa</i>	1 mm
Maxixe	<i>Cucumis anguria</i>	4 mm

## 5 Resultados e Discussão

Ambas as linhagens mostraram viabilidade em caldo contaminado, independentemente da presença de extrato de levedura. Por esse motivo nenhuma fonte de carbono secundária foi necessária nos ensaios.

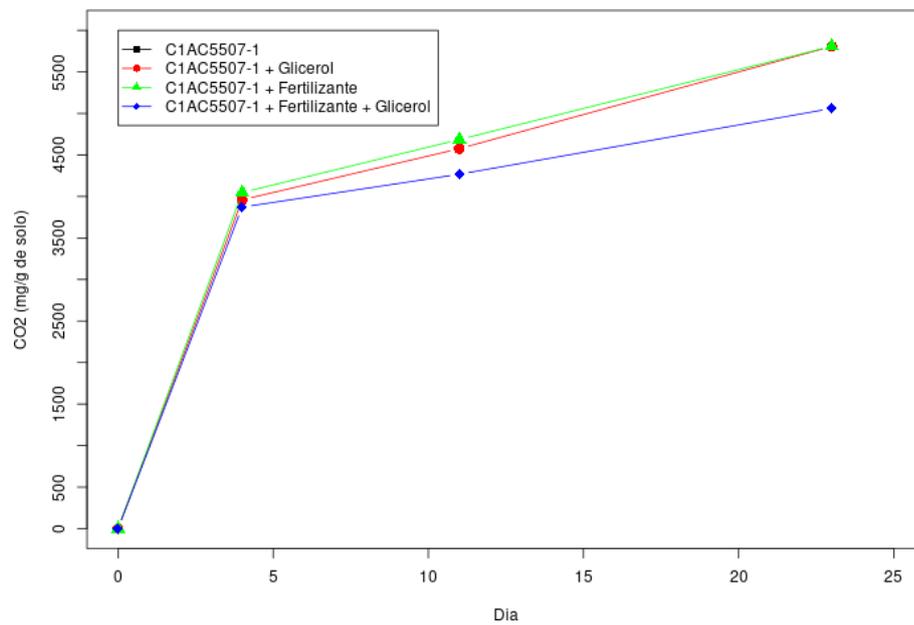
### 5.1 Ensaio Preliminar

As Figuras 5, 6, 7, e 8 ilustram a produção de CO<sub>2</sub> ao longo de 25 dias, em relação à um controle estéril. Comparativamente, foi observada uma maior produção de CO<sub>2</sub> nos reatores cujo solo foi contaminado por ametrina. Contudo, emissões do gás nos reatores com solo contaminado com hexazinona foram observadas. Embora significativamente menores, comparadas com os reatores contendo solo contaminado com ametrina, sugere-se maior recalcitrância da hexazinona, relativa ao pouco tempo do ensaio de 25 dias. Ainda assim, devido à ausência de uma fonte secundária de carbono, é razoável a conclusão de que ambos os herbicidas foram metabolizados por ambas as linhagens (ANDERSON; DOMSCH, 1978; SEVERINO et al., 2005).

Adicionalmente, reatores enriquecidos com fertilizante químico mostram uma maior produção cumulativa de CO<sub>2</sub> na maioria das combinações de herbicidas e linhagens. Ressalta-se que a concentração de nitrogênio não foi inibitória, considerando que o solo continha um teor importante de nitrogênio e uma relação C:N inicial cerca de 1:40. Surpreendentemente, a adição de glicerol não implicou em uma maior produção de CO<sub>2</sub>. Pode ter ocorrido escolha preferencial por esta fonte de carbono, levando à uma atividade metabólica menor devido à reduzida concentração utilizada desse aditivo. A remoção de glicerol reduziria os custos do processo, podendo ser substituído por outro cossubstrato como por exemplo resíduos ricos em matéria orgânica.

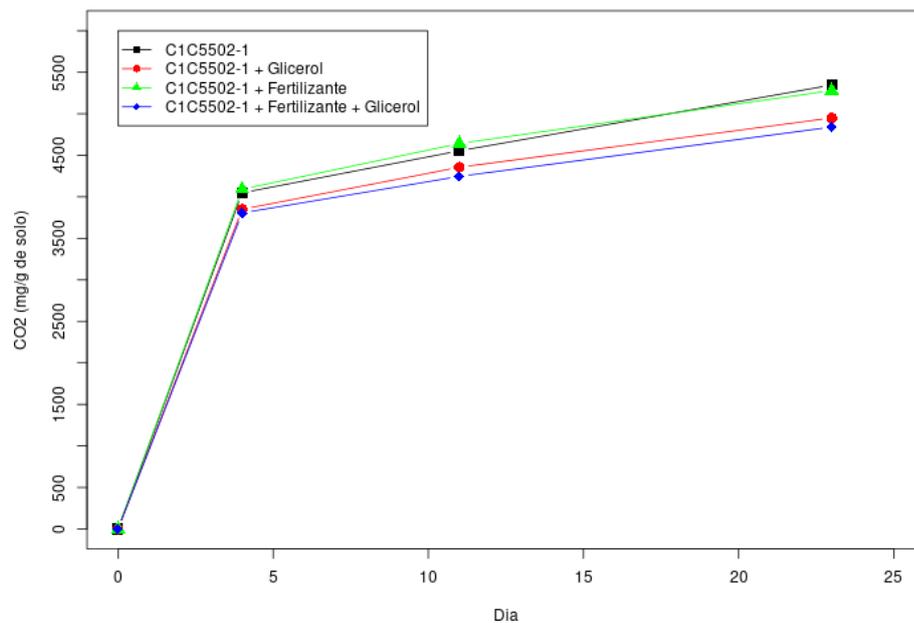
O pH registrado no período de duração do teste foi em média 5, indicativo da necessidade de correção no teste em reator com tempo maior. Com base nesses resultados, o fertilizante químico foi selecionado como um dos aditivos a serem testados no ensaio em reator.

**Figura 5** – Produção média cumulativa de CO<sub>2</sub> pela *B. safensis* C1AC5507-1 em reatores de triagem contaminados com ametrina.



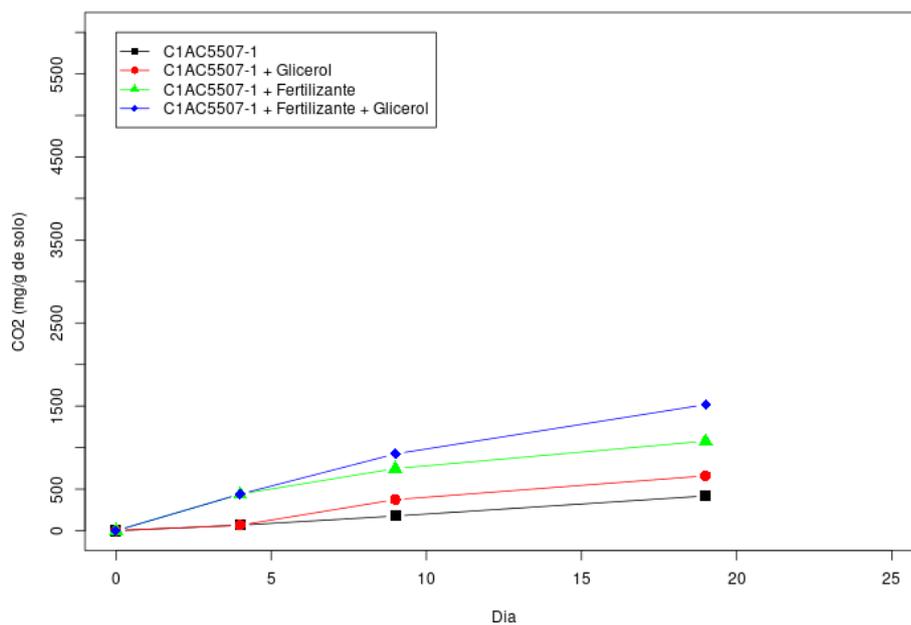
Fonte: Autor (2019)

**Figura 6** – Produção média cumulativa de CO<sub>2</sub> pela *B. safensis* C1C5502-1 em reatores de triagem contaminados com ametrina.



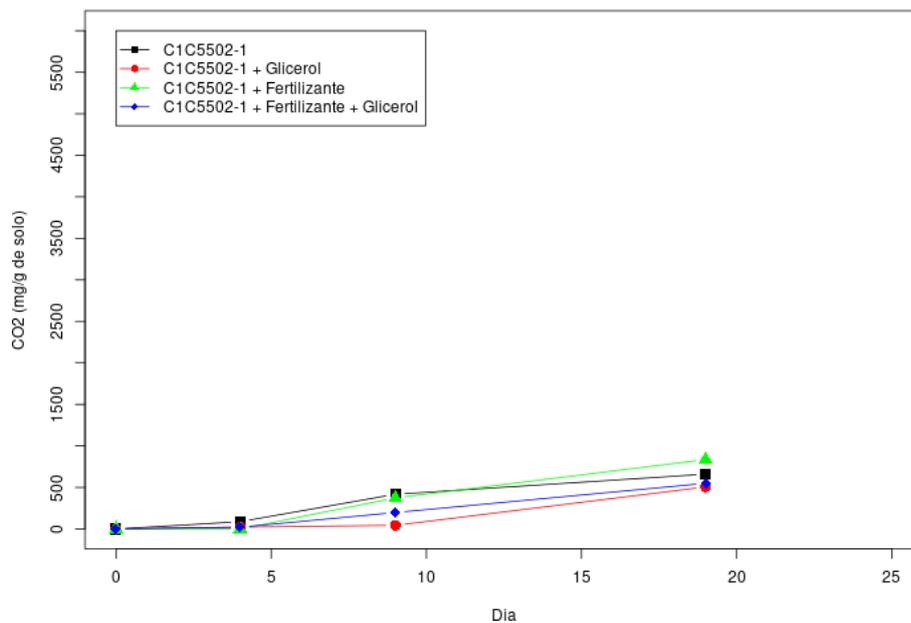
Fonte: Autor (2019)

**Figura 7** – Produção média cumulativa de CO<sub>2</sub> pela *B. safensis* C1AC5507-1 em reatores de triagem contaminados com hexazinona.



Fonte: Autor (2019)

**Figura 8** – Produção média cumulativa de CO<sub>2</sub> pela *B. safensis* C1C5502-1 em reatores de triagem contaminados com hexazinona.



Fonte: Autor (2019)

## 5.2 Ensaio em Reator

As Figuras 9, 10, 11, e 12 denotam a produção cumulativa de CO<sub>2</sub> ao longo de 60 dias. Similarmente aos resultados do ensaio preliminar (seção 5.1), com produção de CO<sub>2</sub> em todas as condições experimentais, variando entre cerca de 400 mg por grama de solo e 1500 mg/g. Esse resultado apoia os resultados do ensaio preliminar quanto ao metabolismo de herbicidas pelas linhagens.

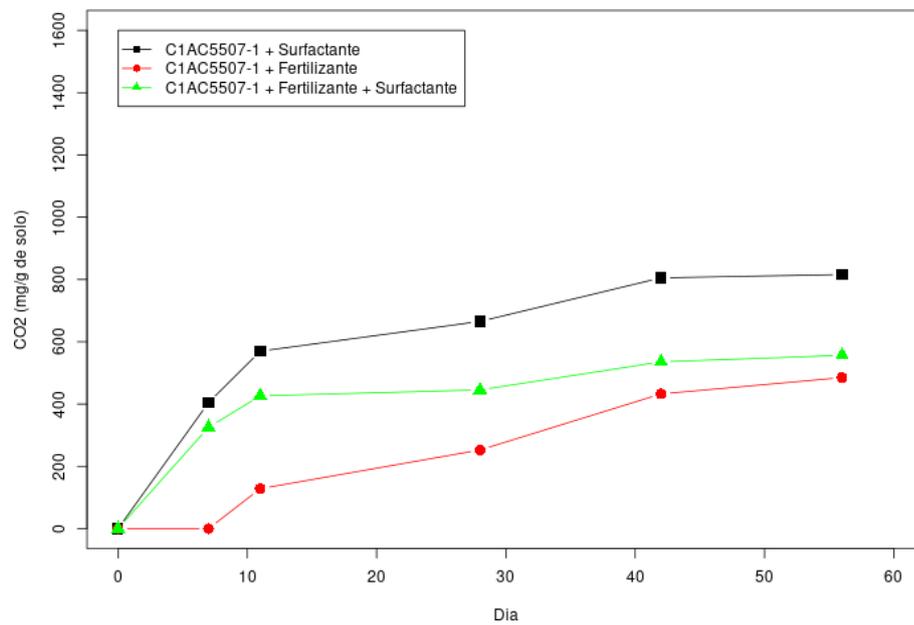
A inclinação das curvas de CO<sub>2</sub> sugerem que todos os reatores, exceto os da *B. safensis* C1AC5507-1 em ametrina (Figura 9, em contraste com as Figuras 10, 11 e 12), poderiam continuar a sustentar certo nível de atividade, mesmo que reduzido, após o final do prazo do experimento. Já os reatores da *B. safensis* C1AC5507-1 mostram uma inclinação quase horizontal, denotando concentrações de CO<sub>2</sub> iguais ou próximas ao controle. Ou seja, atividade aeróbica quase nula.

Os resultados revelaram ainda que a presença de fertilizante, independente do biossurfactante, reduz a produção de CO<sub>2</sub> em todos os reatores exceto aqueles contendo a *B. safensis* C1C5502-1, se comparado com a condição contendo somente biossurfactante. No caso da *B. safensis* linhagem C1C5502-1, a combinação de biossurfactante com fertilizante levou à uma produção próxima àquelas contendo somente biossurfactante.

Em um trabalho de biorremediação de hidrocarbonetos com *Pseudomonas aeruginosa*, Cavalcanti (2014) relatou um valor máximo de 29,9 mg/kg de CO<sub>2</sub> após 30 dias. Severino et al. (2005) relatou um valor máximo de 35 mg/kg em 30 dias com ensaios de mineralização de resíduos orgânicos.

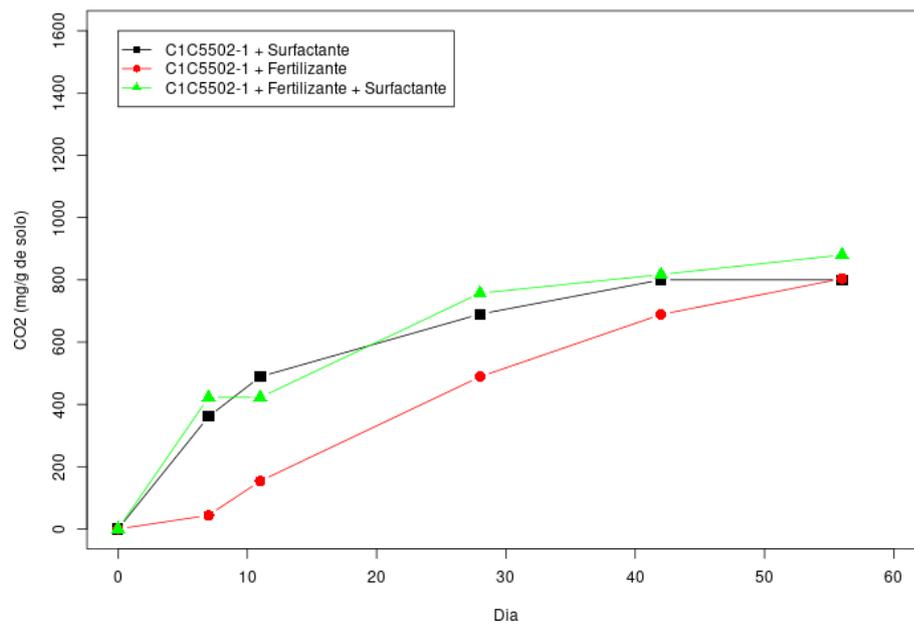
Durante o ensaio o pH se mostrou variável com uma clara tendência à acidificação, compatível com uma possível acumulação de metabólitos ao longo do tempo. O pH médio variou ao redor de 7,2 em reatores contendo biossurfactante, e 5 em reatores contendo somente fertilizante. Segundo Lateef, Adelere e Gueguim-Kana (2015), o pH ácido dos reatores contendo somente fertilizante não é ideal para várias linhagens descritas da *B. safensis*, sendo possivelmente esse o motivo da menor produção de CO<sub>2</sub> nesses casos.

**Figura 9** – Produção média cumulativa de CO<sub>2</sub> pela *B. safensis* C1AC5507-1 em reatores contaminados com ametrina.



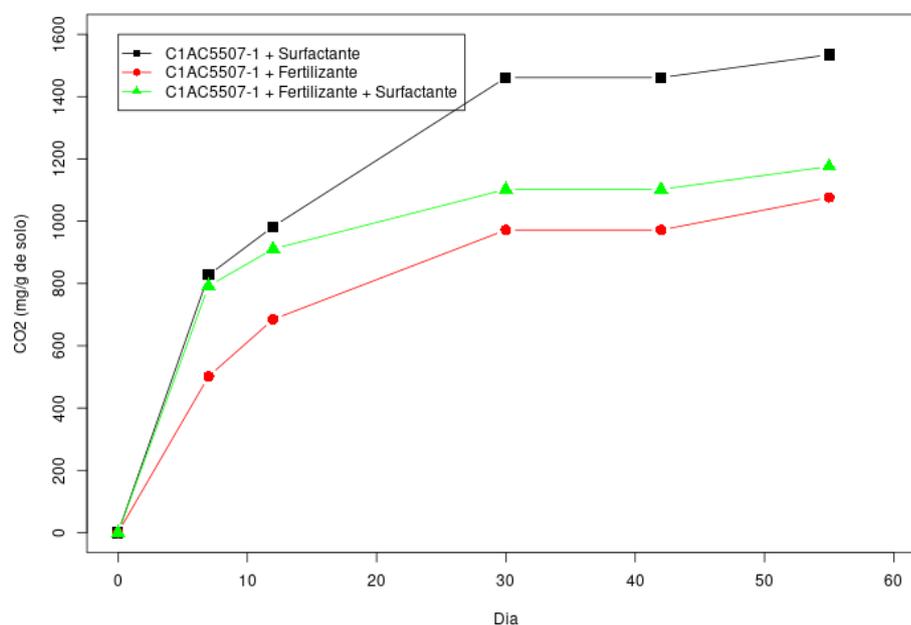
Fonte: Autor (2019)

**Figura 10** – Produção média cumulativa de CO<sub>2</sub> pela *B. safensis* C1C5502-1 em reatores contaminados com ametrina.



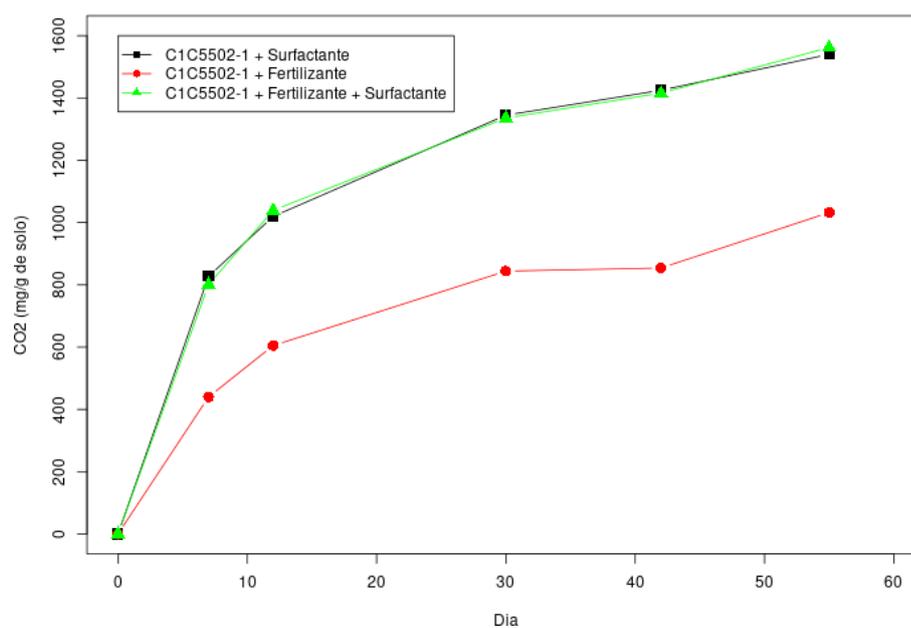
Fonte: Autor (2019)

**Figura 11** – Produção média cumulativa de CO<sub>2</sub> pela *B. safensis* C1AC5507-1 em reatores contaminados com hexazinona.



Fonte: Autor (2019)

**Figura 12** – Produção média cumulativa de CO<sub>2</sub> pela *B. safensis* C1C5502-1 em reatores contaminados com hexazinona.



Fonte: Autor (2019)

### 5.3 Ensaio de Ecotoxicidade

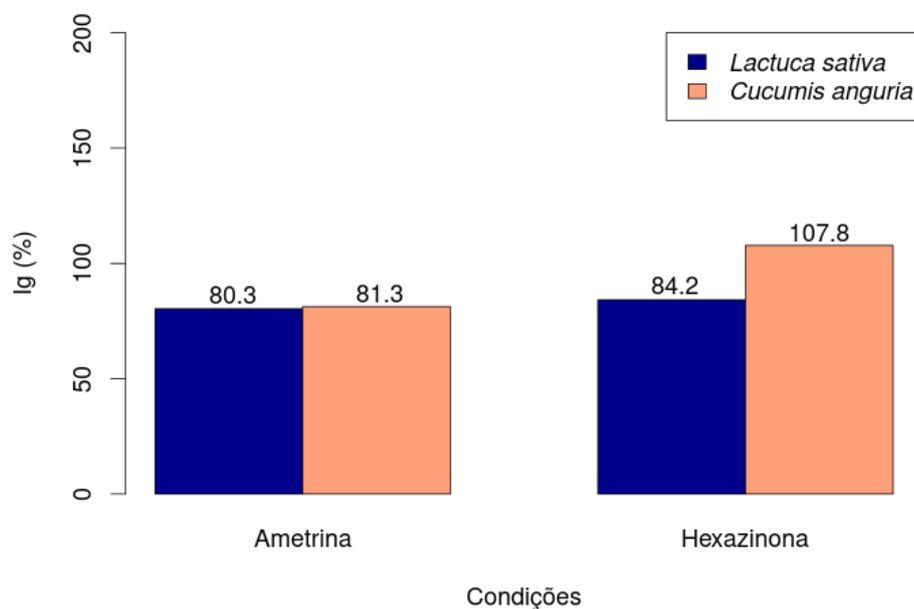
As Figuras 13, 14, 15, 16, e 17 ilustram os resultados do teste de ecotoxicidade. Segundo a classificação proposta por Anastasi et al. (2009), o índice de germinação  $I_g$  pode ser subjetivamente classificado em alto ( $I_g < 50\%$ ), moderado ( $50\% \leq I_g < 80\%$ ), ou nulo ( $I_g \geq 80\%$ ). Por essa interpretação, para as plantas testadas, ambos herbicidas na concentração de 50 mg/kg ao início do teste não foram tóxicos, mesmo que próximos ao limiar. Entretanto, após 60 dias de bioprocessamento, os índices aumentaram significativamente na maioria das condições.

Entre *Lactuca sativa* e *Cucumis anguria*, a segunda se revelou mais sensível, como já observado em trabalhos anteriores (CAVALCANTI, 2014; CAVALCANTI et al., 2016). O valor do  $I_g$  de *C. anguria* no reator sem fertilizante, com biossurfactante contaminado por ametrina foi inferior ao início do processo (Figura 15, código A/F-S+). Isso pode sugerir a produção de metabólitos, corroborados com a concentração de  $\text{CO}_2$ . A maior toxicidade nesse caso não foi devido ao biossurfactante, uma vez que nos reatores em que ele estava presente, os  $I_g$  foram superiores ao determinado no início do teste.

Em contraste, o  $I_g$  de solos contaminados por ametrina após tratamento (Figuras 14 e 15) estão frequentemente acima de 100%, denotando uma melhor germinação que o controle em água destilada e os controles com solos contaminados, e bem acima de qualquer limiar de toxicidade. Já os solos contaminados hexazinona e tratados (Figuras 16 e 17) mostram um aumento mas não tão significativo no  $I_g$ . Em várias condições com esse contaminante,  $80\% < I_g < 90\%$ . Isso ressalta a hipótese da maior recalcitrância da hexazinona, se comparada à ametrina, bem como, o tempo de teste de 60 dias talvez não tenha sido suficiente, considerando que ambas linhagens estavam perfeitamente aclimatadas aos compostos.

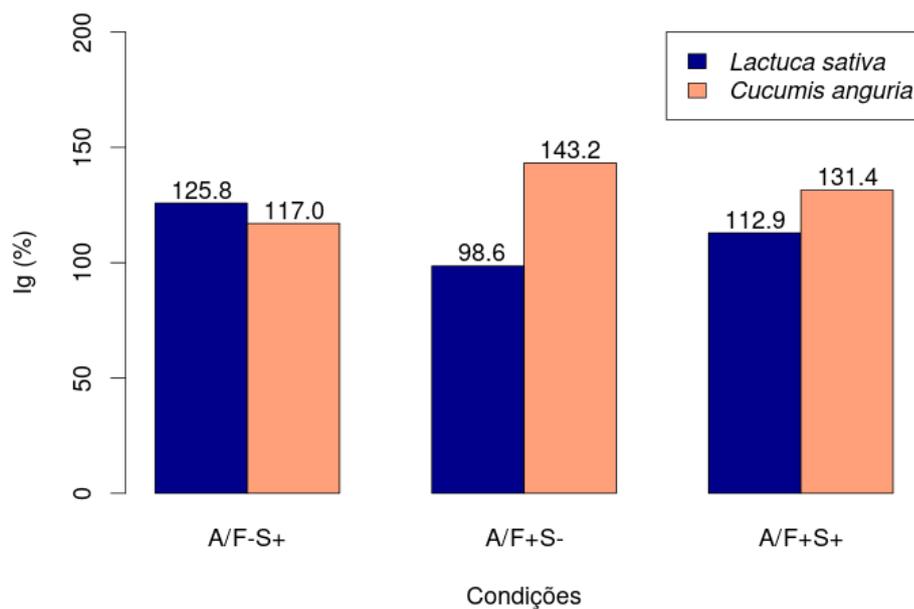
Com esses resultados, não é possível concluir definitivamente que houve biodegradação dos herbicidas, entretanto, foi revelado que houve uma modificação no que diz respeito à contaminação presente no solo durante o ensaio em reator, indicada pela emissão de gás e variação no pH, refletindo de forma benéfica sobre a germinação de *L. sativa* e *C. anguria*.

**Figura 13** – Índice de germinação das sementes em solos contaminado com ametrina e hexazinona sem tratamento, relativo ao controle com água destilada.



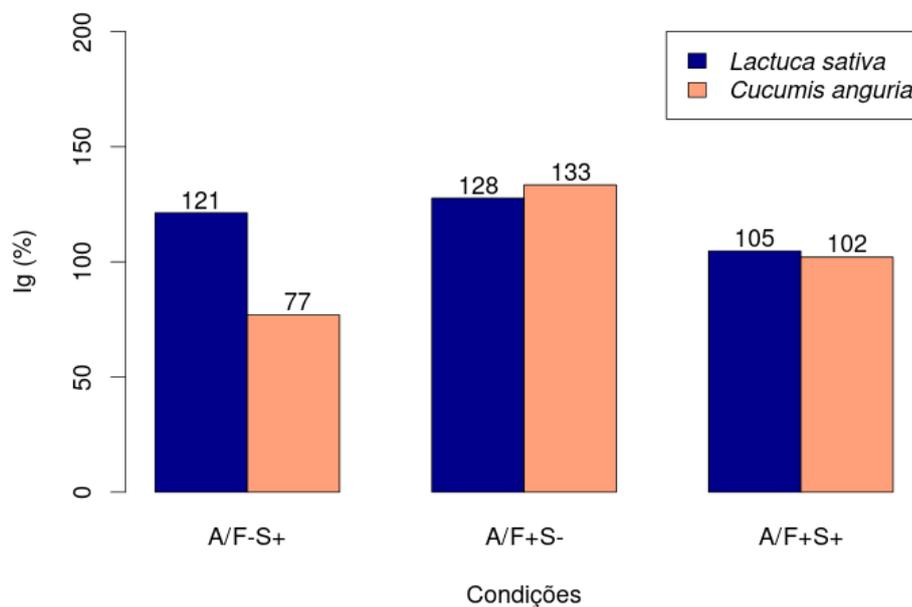
Fonte: Autor (2019)

**Figura 14** – Índice de germinação das sementes em solo contaminado com ametrina após tratamento com *B. safensis* C1AC5507-1 relativo ao controle com água destilada.



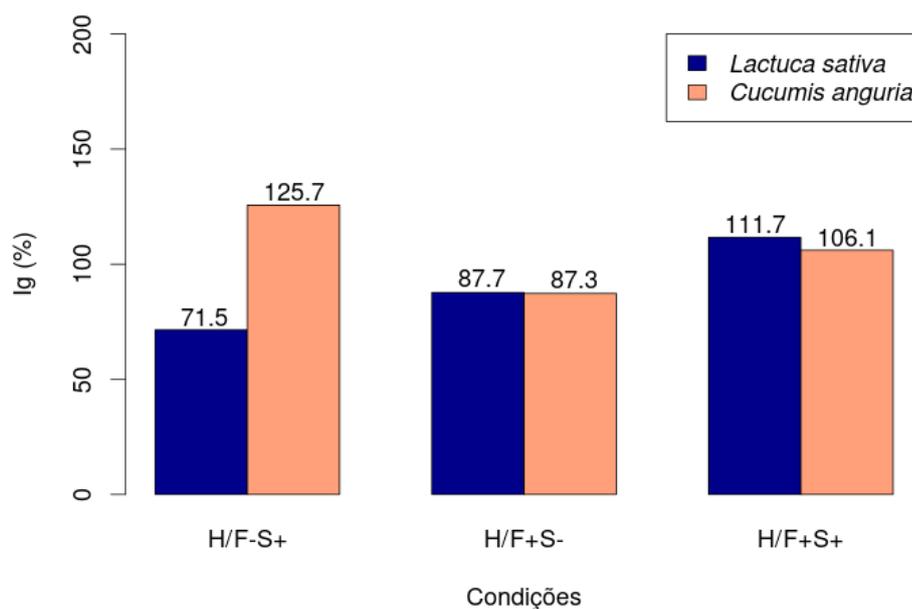
Fonte: Autor (2019)

**Figura 15** – Índice de germinação das sementes em solo contaminado com ametrina após tratamento com *B. safensis* C1C5502-1 relativo ao controle com água destilada.



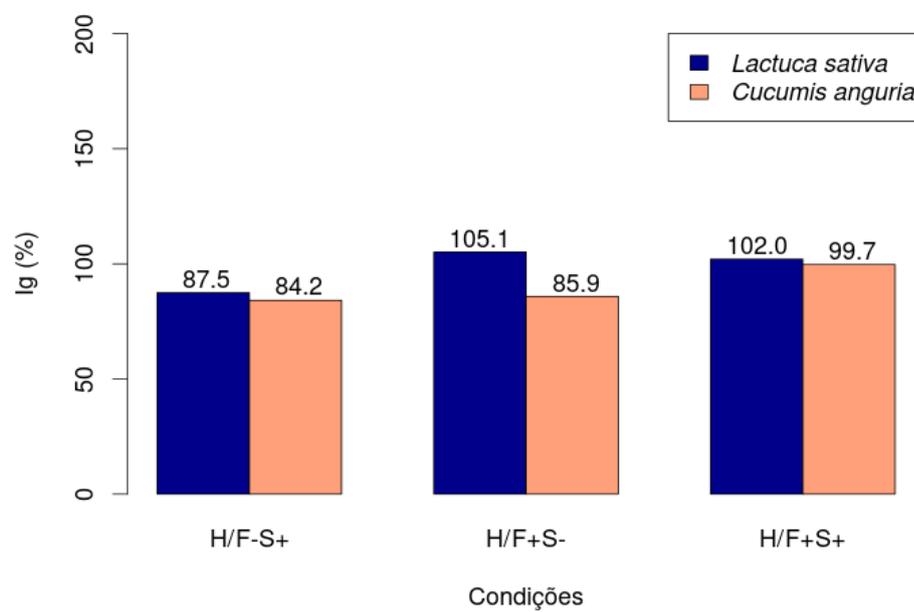
Fonte: Autor (2019)

**Figura 16** – Índice de germinação das sementes em solo contaminado com hexazinona após tratamento com *B. safensis* C1AC5507-1 relativo ao controle com água destilada.



Fonte: Autor (2019)

**Figura 17** – Índice de germinação das sementes em solo contaminado com hexazinona após tratamento com *B. safensis* C1C5502-1 relativo ao controle com água destilada.



Fonte: Autor (2019)

## 6 Conclusão

Nas condições experimentais testadas, os resultados apontam para a capacidade da *Bacillus safensis* linhagens C1AC5507-1 e C1C5502-1 de usar ametrina e hexazinona como fonte de carbono e energia. Os ensaios em solo mostram a viabilidade do bacilo em condições desafiadoras e tolerância a fertilizante químico. Os ensaios de ecotoxicidade mostram uma ação positiva de ambas as linhagens no solo, principalmente nos contaminados com ametrina. Dessa forma, ambas as linhagens poderiam ser utilizadas em estudos futuros e na elaboração de protocolos de biorremediação para solos contaminados com ametrina ou hexazinona, e talvez outros herbicidas de classes químicas similares.

Estudos futuros se beneficiariam de um acompanhamento mais detalhado da biomassa da *Bacillus safensis* e da concentração de herbicida em solo ao longo do tempo, com objetivo de melhor caracterizar a atividade biodegradadora do bacilo.

## Referências Bibliográficas

- ABDELBAGI, A. O.; WADY, A. I. A.; ISHAG, A. E. S. A.; HAMMAD, A. M. A.; ABDALLA, M. A. O.; HUR, J.-H. Biodegradation of fenthion and temphos in liquid media by *Bacillus safensis* isolated from pesticides polluted soil in the Sudan. *African Journal of Biotechnology*, v. 17, n. 12, p. 396–404, 2018.
- AHEMAD, M.; KHAN, S.; ZAIDI, A.; WANI, P. Remediation of herbicides contaminated soil using microbes. *Microbes in Sustainable Agriculture*, p. 261–284, 2009.
- ALBANITO, L.; LAPPANO, R.; MADEO, A.; CHIMENTO, A.; PROSSNITZ, E. R.; CAPPELLO, A. R.; DOLCE, V.; ABONANTE, S.; PEZZI, V.; MAGGIOLINI, M. Effects of Atrazine on Estrogen Receptor – and G Protein–Coupled Receptor 30–Mediated Signaling and Proliferation in Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts. *Environmental Health Perspectives*, v. 123, n. 5, p. 493–499, maio 2015. ISSN 0091-6765. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4421771/>>.
- ALTA. *Ametrina*. Weifang: Shandong Weifang Rainbow Chemical CO. LTD., 2018. Bula.
- ANASTASI, A.; COPPOLA, T.; PRIGIONE, V.; VARESE, G. C. Pyrene degradation and detoxification in soil by a consortium of basidiomycetes isolated from compost: Role of laccases and peroxidases. *Journal of Hazardous Materials*, v. 165, n. 1, p. 1229–1233, jun. 2009. ISSN 0304-3894. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389408014878>>.
- ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K. H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 10, n. 3, p. 215–221, jan. 1978. ISSN 0038-0717. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0038071778900998>>.
- ANVISA. *A11 - Ametrina*. 2006. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/a11.pdf/06ee492f-745b-4da9-ae2d-a24bd84ae8e9>>.
- ANVISA. *H02 - Hexazinona*. 2006. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/h02.pdf/ed5377aa-d856-435f-996e-c0b381170f60>>.
- BARRY, P.; YOUNG, A. J.; BRITTON, G. Photodestruction of Pigments in Higher Plants by Herbicide Action I. THE EFFECT OF DCMU (DIURON) ON ISOLATED CHLOROPLASTS. *Journal of Experimental Botany*, v. 41, n. 2, p. 123–129, fev. 1990. ISSN 0022-0957. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article/41/2/123/498785>>.
- CACHO, C.; TURIÉL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A.; AYALA, D.; PÉREZ-CONDE, C. Semi-covalent imprinted polymer using propazine methacrylate as template molecule for the clean-up of triazines in soil and vegetable samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1114, n. 2, p. 255–262, maio 2006. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967306004134>>.

- CARTAXO, I. *Avaliação da concentração de Bacillus safensis C1C5502-1 em um solo arenoso contaminado com ametrina*. Tese (Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia)) — Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.
- CAVALCANTI, T. G. *Uso de Pseudomonas aeruginosa na remoção de hidrocarbonetos do petróleo em sedimento suplementado com torta de algodão*. Tese (Relatório (Iniciação Científica)) — Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.
- CAVALCANTI, T. G.; VIANA, A. A. G.; GUEDES, T. P.; FREIRE, A. d. S.; TRAVASSOS, R. d. A.; VASCONCELOS, U. Seed options for toxicity tests in soils contaminated with oil. *Canadian Journal of Pure and Applied Sciences*, v. 10, n. 3, p. 4039–4045, out. 2016. ISSN 1715-9997.
- CLAXTON, L. D. The history, genotoxicity, and carcinogenicity of carbon-based fuels and their emissions. part 3: diesel and gasoline. *Mutation research/reviews in mutation research*, Elsevier, v. 763, p. 30–85, 2015.
- CUNNINGHAM, S. D.; BERTI, W. R. Remediation of contaminated soils with green plants: An overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v. 29, n. 4, p. 207–212, out. 1993. ISSN 1475-2689. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF02632036>>.
- DELANCEY, J. O. L.; ALAVANJA, M. C. R.; COBLE, J.; BLAIR, A.; HOPPIN, J. A.; AUSTIN, H. D.; FREEMAN, L. E. B. Occupational Exposure to Metribuzin and the Incidence of Cancer in the Agricultural Health Study. *Annals of epidemiology*, v. 19, n. 6, p. 388–395, jun. 2009. ISSN 1047-2797. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2693328/>>.
- DEL'ARCO, J. P.; FRANÇA, F. P. de. Biodegradation of crude oil in sandy sediment. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 44, n. 2, p. 87–92, set. 1999. ISSN 0964-8305. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830599000633>>.
- DUKE, S. O. Overview of herbicide mechanisms of action. *Environmental Health Perspectives*, v. 87, p. 263–271, jul. 1990. Disponível em: <<https://ehp.niehs.nih.gov/doi/abs/10.1289/ehp.9087263>>.
- EPA. *US EPA - Pesticides - Fact Sheet for Ametryn*. 2010. Disponível em: <[https://www3.epa.gov/pesticides/chem\\_search/reg\\_actions/reregistration/fs\\_PC-080801\\_26-Sep-05.pdf](https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_PC-080801_26-Sep-05.pdf)>.
- EPA. *Hexazinone: Reregistration Eligibility Decision (RED) Fact Sheet | US EPA ARCHIVE DOCUMENT*. 2015. Disponível em: <<https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/0266fact.pdf>>.
- FARLAND, J. M.; BURNSIDE, O. *The Triazine Herbicides*. [S.l.]: Elsevier, 2011. Google-Books-ID: ZD2\_PRR\_f1IC. ISBN 978-0-08-055963-6.
- GUPTA, P. K. Herbicides and fungicides. In: GUPTA, R. C. (Ed.). *Reproductive and Developmental Toxicology*. San Diego: Academic Press, 2011. p. 503–521. ISBN 978-0-12-382032-7. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123820327100396>>.

HERI, W.; CARROLL, B.; PARSHLEY, T.; NABORS, J. B. Production, Development, and Registration of Triazine Herbicides. In: LEBARON, H. M.; MCFARLAND, J. E.; BURNSIDE, O. C. (Ed.). *The Triazine Herbicides*. San Diego: Elsevier, 2008. p. 31–43. ISBN 978-0-444-51167-6. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444511676500064>>.

JUNQUEIRA, L. C. U.; FILHO, J. C. d. S. *Biologia Celular e Molecular*. 9<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. ISBN 978-85-277-2078-6.

Kaidor. *Photosystem II structure, modified from original by translating stroma and lumen from Russian to English*. 2017. Disponível em: <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Photosystem\\_II.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Photosystem_II.png)>.

KOMIVES, T.; GULLNER, G. Dendroremediation: The Use of Trees in Cleaning up Polluted Soils. In: MACKOVA, M.; DOWLING, D.; MACEK, T. (Ed.). *Phytoremediation Rhizoremediation*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2006. p. 23–31. ISBN 978-1-4020-4999-6. Disponível em: <[https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4999-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4999-4_3)>.

LATEEF, A.; ADELERE, I. A.; GUEGUIM-KANA, E. B. The biology and potential biotechnological applications of *Bacillus safensis*. *Biologia*, v. 70, n. 4, p. 411–419, 2015. ISSN 1336-9563. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/view/j/biolog.2015.70.issue-4/biolog-2015-0062/biolog-2015-0062.xml>>.

MACLENNAN, P. A.; DELZELL, E.; SATHIAKUMAR, N.; MYERS, S. L.; CHENG, H.; GRIZZLE, W.; CHEN, V. W.; WU, X. C. Cancer Incidence Among Triazine Herbicide Manufacturing Workers. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, v. 44, n. 11, p. 1048, nov. 2002. ISSN 1076-2752. Disponível em: <[https://journals.lww.com/joem/Abstract/2002/11000/Cancer\\_Incidence\\_Among\\_Triazine\\_Herbicide.11.aspx](https://journals.lww.com/joem/Abstract/2002/11000/Cancer_Incidence_Among_Triazine_Herbicide.11.aspx)>.

MADIGAN, M.; BENDER, K.; BUCKLEY, D.; STAHL, D.; SATTLEY, W. *Brock Biology of Microorganisms, Books a la Carte Edition*. Pearson Education, 2017. ISBN 9780134626109. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=IGhSvGAACAAJ>>.

MARIN-MORALES, M. A.; VENTURA-CAMARGO, B. d. C.; HOSHINA, M. M. Toxicity of Herbicides: Impact on Aquatic and Soil Biota and Human Health. *Herbicides - Current Research and Case Studies in Use*, jun. 2013. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/herbicides-current-research-and-case-studies-in-use/toxicity-of-herbicides-impact-on-aquatic-and-soil-biota-and-human-health>>.

MOTESHAREZADEH, B.; SAVAGHEBI-FIROOZABADI, G. R. Study of the increase in phytoremediation efficiency in a nickel polluted soil by the usage of native bacteria: *Bacillus safensis* FO.036b and *Micrococcus roseus* M2. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, v. 9, n. 2, p. 133–143, 2011. ISSN 1753-3033. Disponível em: <[https://cjes.guilan.ac.ir/article\\_1065.html](https://cjes.guilan.ac.ir/article_1065.html)>.

MULLER, T. S.; SUN, Z.; KUMAR, G.; ITOH, K.; MURABAYASHI, M. The combination of photocatalysis and ozonolysis as a new approach for cleaning 2,4-dichlorophenoxyacetic acid polluted water. *Chemosphere*, v. 36, n. 9, p. 2043–2055, abr. 1998. ISSN 0045-6535. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653597100893>>.

NORTOX. *Hexazinona-D*. Arapongas: Nortox S.A., 2018. Bula.

OETTMEIER, W. Herbicide resistance and supersensitivity in photosystem II. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, v. 55, n. 10, p. 1255–1277, ago. 1999. ISSN 1420-9071. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s000180050370>>.

PALITTAPONGARNPIM, M.; POKETHITIYOOK, P.; UPATHAM, E. S.; TANGBANLUEKAL, L. Biodegradation of crude oil by soil microorganisms in the tropic. *Biodegradation*, v. 9, n. 2, p. 83–90, mar. 1998. ISSN 1572-9729. Disponível em: <<https://doi.org/10.1023/A:1008272303740>>.

ROBERT, D.; MALATO, S. Solar photocatalysis: a clean process for water detoxification. *Science of The Total Environment*, v. 291, n. 1, p. 85–97, maio 2002. ISSN 0048-9697. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969701010944>>.

SATOMI, M.; DUC, M. T. L.; VENKATESWARAN, K. *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, n. 8, p. 1735–1740, 2006. Disponível em: <<https://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.64189-0>>.

SCHONBRUNN, E.; ESCHENBURG, S.; SHUTTLEWORTH, W. A.; SCHLOSS, J. V.; AMRHEIN, N.; EVANS, J. N. S.; KABSCH, W. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 4, p. 1376–1380, fev. 2001. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Disponível em: <<https://www.pnas.org/content/98/4/1376>>.

SEVERINO, L. S.; COSTA, F. X.; BELTRÃO, N. E. d. M.; LUCENA, A. M. Amador de; GUIMARÃES, M. M. Mineralização da torta de mamona, esterco bovino e bagaço de cana estimada pela respiração microbiana. *Revista de biologia e ciências da terra*, v. 5, n. 1, 2005.

Somepics. *Thylakoid membrane 3*. 2015. Disponível em: <[https://en.wikipedia.org/wiki/File:Thylakoid\\_membrane\\_3.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/File:Thylakoid_membrane_3.svg)>.

TIQUIA, S. M.; TAM, N. F. Y.; HODGKISS, I. J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environmental Pollution*, v. 93, n. 3, p. 249–256, jan. 1996. ISSN 0269-7491. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749196000528>>.

TIRONI, S. P.; SOUZA, R. C. de. Manejo de Plantas Daninhas na Cultura de Cana-de-Açúcar no Nordeste. In: *Desafios, Avanços e Soluções no Manejo de Plantas Daninhas*. [S.l.: s.n.], 2013. p. 21–35.

TUGRUL, T.; CANSUNAR, E. Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Springer, v. 21, n. 6-7, p. 851–853, 2005.

VASCONCELOS, U. *Tratamento Microbiológico Sequencial de Solo Proveniente de Unidade de Dessorção Térmica*. Tese (Doutorado em Processos Químicos e Bioquímicos) — Departamento de Engenharia Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

VASCONCELOS, U.; FRANÇA, F. P. d.; OLIVEIRA, F. J. S. Removal of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons. *Química Nova*, v. 34, n. 2, p. 218–221, 2011. ISSN 0100-4042. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0100-40422011000200009&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0100-40422011000200009&lng=en&nrm=iso&tlng=es)>.

VEERANAGOUDA, Y.; PATIL, K. N.; KAREGOUDAR, T. A method for screening of bacteria capable of degrading dimethylformamide. *Current Science*, JSTOR, v. 87, n. 12, p. 1652–1654, 2004.

VIDALI, M. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, v. 73, n. 7, p. 1163–1172, 2001. ISSN 0033-4545. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/view/j/pac.2001.73.issue-7/pac200173071163/pac200173071163.xml>>.

WALLNOFER, P. The Decomposition of Urea Herbicides by *Bacillus Sphaericus*, Isolated from Soil. *Weed Research*, v. 9, n. 4, p. 333–339, 1969. ISSN 1365-3180. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3180.1969.tb01492.x>>.

WATSON, J. S.; JONES, D. M.; SWANNELL, R. P. J.; DUIN, A. C. T. van. Formation of carboxylic acids during aerobic biodegradation of crude oil and evidence of microbial oxidation of hopanes. *Organic Geochemistry*, v. 33, n. 10, p. 1153–1169, out. 2002. ISSN 0146-6380. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0146638002000864>>.

WILKINSON, R. E. Metolachlor influence on growth and terpenoid synthesis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 16, n. 1, p. 63–71, ago. 1981. ISSN 0048-3575. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0048357581900729>>.

WOOD, W. A.; KRIEG, N. R. *Methods for general and molecular bacteriology*. [S.l.]: ASM Press, Washington DC, 1989.

YOUNGMAN, R. J.; DODGE, A. D. Mechanism of Paraquat Action: Inhibition of the Herbicidal Effect by a Copper Chelate with Superoxide Dismutating Activity. *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 34, n. 11, p. 1032–1035, 2014. ISSN 1865-7125. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/view/j/znc.1979.34.issue-11/znc-1979-1129/znc-1979-1129.xml>>.

ZIEGLER, S.; WAIDNER, B.; ITOH, T.; SCHUMANN, P.; SPRING, S.; GESCHER, J. Metallibacterium scheffleri gen. nov., sp. nov., an alkalizing gammaproteobacterium isolated from an acidic biofilm. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 63, n. 4, p. 1499–1504, 2013. Disponível em: <<https://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.042986-0>>.