

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCar
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA, MATEMÁTICA E
EDUCAÇÃO

ANA CAROLINA DE OLIVEIRA MIYASATO

BIORREMEDIAÇÃO EM AMBIENTE AQUÁTICO
COM SISTEMA EM FLUXO COM A UTILIZAÇÃO
DE BIOFILME

ARARAS

2023

ANA CAROLINA DE OLIVEIRA MIYASATO

BIORREMEDIAÇÃO EM AMBIENTE AQUÁTICO
COM SISTEMA EM FLUXO COM A UTILIZAÇÃO
DE BIOFILME

Monografia apresentada no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientação: Professor Doutor Renato Nallin Montagnolli

ARARAS

2023

ANA CAROLINA DE OLIVEIRA MIYASATO

BIORREMEDIAÇÃO EM AMBIENTE AQUÁTICO COM SISTEMA EM FLUXO COM
A UTILIZAÇÃO DE BIOFILME

Monografia apresentada no Curso de
Licenciatura em Ciências Biológicas
da Universidade Federal de São
Carlos para obtenção do título de
Licenciado em Ciências Biológicas.

Data da defesa: 30 de agosto de 2023

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli
Universidade Federal de São Carlos

Ma. Biana Pelissari Gadanhoto
Instituto Agronômico de Campinas

Prof. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli
Universidade Federal de São Carlos

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me permitido ter experiências memoráveis, me permitir ter saúde e ultrapassar todos os obstáculos.

A minha mãe e meu pai, Rosana e Celso, pelo incentivo e apoio, a minha irmã Juliana, à minha avó Haruko, e toda minha família.

Ao meu companheiro Vinícius, por sempre estar ao meu lado me apoiando e fazer tudo por mim, as minhas amigas Mônica e Mayara, e a todos meus amigos.

Aos meus colegas de laboratório Gabriel, Daniela e Sabrina; a todos do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM).

Ao professor Renato, pela orientação e aprendizado desde o primeiro ano de graduação.

A instituição Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade acadêmica, pela estrutura, pelos laboratórios e funcionários.

A todos que contribuíram de alguma forma com minha formação.

Meus sinceros muito obrigada!

RESUMO

Atualmente, a biorremediação vem sendo bastante utilizada dentro da área de biotecnologia juntamente com a utilização de biofilmes como biorremediadores. Os biofilmes bacterianos possuem uma propriedade importante de biorremediação em ambientes contaminados e/ou com alta concentração de nutrientes. Essa pesquisa visou realizar biorremediação na lagoa da Universidade Federal de São Carlos, em Araras, um local que pode conter concentrações de toxicidade, provenientes de agrotóxicos de plantações ao seu redor, metais pesados e/ou fertilizantes, sendo o objetivo desta pesquisa produzir biofilmes bacterianos e avaliar suas eficácias em tratamento a partir de dois microrganismos: AL (sigla proveniente da coloração amarelo alaranjado, por não possuir identificação) que possui coloração amarela ao redor do meio alaranjado com aspecto gelatinoso e BN (sigla proveniente da coloração branco neutro, por não possuir identificação) que possui aspecto mais “fino” de coloração branca com seu entorno mais transparente. Os microrganismos foram cultivados em dois tipos de superfícies, em bagaço de cana-de-açúcar (natural) e espuma de poliuretano (sintético). Ambos os substratos foram posteriormente utilizados como matrizes imobilizadoras como biorremediadores em um sistema em fluxo, baseado em um reator de tanque com agitação contínua (CSTR). Após os ensaios de biorremediação, foram realizados ensaios de toxicidade utilizando raízes de *Allium cepa* em contato com as soluções advindas da biorremediação, água bruta sem tratamento e controle (água destilada) totalizando seis bulbos, um para cada solução, utilizando como parâmetro o crescimento (solução não contaminada) ou estagnação do crescimento das raízes (solução contaminada). Dos seis testes com *Allium cepa*, dois resultaram em total estagnação de crescimento, sendo um deles a solução bruta de água não tratada do lago, levando a conclusão de que o ambiente aquático teste possui algum tipo de toxicidade. E em relação a quantidade de biofilme aderido a cada tipo de substrato, os microrganismos BN e AL apresentaram as mesmas quantidades de biofilme aderidos a cada tipo de substrato, sendo que o substrato de poliuretano se mostrou mais eficiente do que o bagaço de cana-de-açúcar em aproximadamente 100% de sólidos aderidos, provavelmente por conta das propriedades da lignina contida no bagaço de cana-de-açúcar. Este estudo mostrou-se importante em relação a descobertas na área de biorremediação podendo contribuir com próximos estudos nas áreas de microbiologia, ecotoxicologia e biorremediação; a possibilidade de utilização de um substrato natural como material de imobilização de biofilme, imobilização celular e utilização em processos de fermentação.

Palavras-chave: imobilização de biofilme; lignina; inibição de crescimento; teste de toxicidade com *Allium cepa*.

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 7 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 8 |
| | 2.1 RECURSOS HÍDRICOS | 8 |
| | 2.2 BIORREMEDIAÇÃO | 8 |
| | 2.3 BIOFILME | 9 |
| | 2.4 BIOFILME COMO BIORREMEDIADOR | 10 |
| 3 | OBJETIVOS | 11 |
| | 3.1 OBJETIVOS GERAIS | 11 |
| | 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 11 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 12 |
| | 4.1 COLETA DAS AMOSTRAS | 12 |
| | 4.2 MICRORGANISMOS RIZÓBIOS | 13 |
| | 4.2.1 MÉTODO ÁGAR VERMELHO CONGO | 16 |
| | 4.2.2 IMOBILIZAÇÃO DO BIOFILME | 17 |
| | 4.2.2.1 QUANTIFICAÇÃO DO BIOFILME | 18 |
| | 4.3 TRATAMENTO | 18 |
| | 4.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS PRÉ E PÓS-TRATAMENTO | 20 |
| | 4.4.1 ANÁLISE DE RAÍZES | 20 |
| 5 | RESULTADOS | 21 |
| | 5.1 TESTE ÁGAR VERMELHO CONGO | 22 |
| | 5.2 IMOBILIZAÇÃO DO BIOFILME | 22 |
| | 5.3 PH | 27 |
| | 5.4 ANÁLISE DE SÓLIDOS TOTAIS | 28 |
| | 5.5 ECOTOXICIDADE | 29 |
| 6 | DISCUSSÃO | 30 |
| 7 | CONCLUSÕES | 34 |
| 8 | REFERÊNCIAS | 35 |

1 INTRODUÇÃO

A biorremediação, de acordo com Gaylarde, Belinasso e Manfio (2005) é um processo no qual organismos vivos, neste caso, microrganismos, são utilizados biotecnologicamente para remover ou reduzir (remediar) poluentes no ambiente, além de ser um método econômico e não gerar resíduos tóxicos (COPETTI et al., 2022), e este processo foi escolhido para este trabalho por ser uma alternativa ecologicamente mais adequada e eficaz para o tratamento de ambientes contaminados com moléculas orgânicas de difícil degradação e metais tóxicos (GAYLARDE, BELINASSO e MANFIO, 2005).

Atualmente, a biorremediação vem ganhando um papel muito importante dentro da área de biotecnologia juntamente com a utilização de biofilmes como biorremediadores. Os biofilmes são produtos do crescimento dos microrganismos que visam se estabilizar com mais precisão em ambiente favorável ao seu crescimento, com estrutura polissacarídica, capazes de aderirem a substratos diversos, sendo mais bem aderidos em alguns substratos do que em outros. Como citado por Brito (2021), a utilização de biofilmes para biorremediações se dá pela capacidade do biofilme em absorver e reduzir concentrações de poluentes e compostos químicos, melhorando a qualidade dos ambientes poluídos.

De acordo com o IBGE, o estado de São Paulo é responsável por 56% da produção de cana de açúcar no Brasil. Por muitos anos a região de Piracicaba, onde está localizada a cidade de Araras, foi considerada a região de maior produção (ROSSETTO e OTERO, 2023; ARMAS et al., 2005). No entanto, os agrotóxicos não são nocivos apenas a pragas específicas, quando há ocorrência de lixiviação os agrotóxicos são lavados e depositados nos corpos d'água, tornando a água imprópria para outras atividades e comprometendo a natureza aquática.

Conforme citado por Pérez (2015) o biofilme, principalmente em lagoas facultativas, tem um papel muito importante na estimulação do processo de nitrificação, e no melhoramento da qualidade dos efluentes das lagoas quando se diz respeito a DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), DQO (Demanda Química de Oxigênio), clorofila-a e aos sólidos suspensos. A utilização do biofilme na biorremediação é uma técnica ainda a ser explorada, mas que possui grande potencial.

Este trabalho visa a biorremediação com auxílio de biofilmes de dois diferentes microrganismos e dois diferentes substratos na lagoa da Universidade Federal de São Carlos, no campus de Araras, em que há em sua volta grandes plantações indicando uma possível contaminação por agrotóxicos, metais pesados e fertilizantes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RECURSOS HÍDRICOS

Recursos hídricos nada mais são do que as águas superficiais ou subterrâneas disponíveis para qualquer tipo de uso de região ou bacia. Teoricamente, a água é um recurso renovável, o que significa que sempre estaria disponível. No entanto, com a utilização em larga escala, juntamente a poluição por resíduos industriais e domésticos fez com que os grandes centros urbanos entrassem em estresse hídrico, causando falta do recurso e queda em sua qualidade (Costa et al., 2012). De acordo com Paz, Teodoro e Mendonça (2020) a falta de água pode ser, para muitos países, um dos fatores limitantes ao desenvolvimento, por conta do modelo tecnológico atual que está baseado na exploração indiscriminada dos recursos naturais, os quais estão esgotados.

O uso desse recurso é empregado em diversas formas e processos, como para abastecimento de cidades, irrigação de plantações, navegação fluvial, desenvolvimento do ecoturismo, lazer e entre outros (COSTA et al., 2012).

Deve-se sempre levar em consideração a preservação dos ambientes naturais, visando proteger o futuro dos recursos que podem estar ou não em escassez. O fato de que os ecossistemas de água doce são utilizados de forma múltipla e primordial para a sobrevivência humana reafirma a necessidade de respeitar os limites e potencialidades de utilização dos mesmos (Costa et al., 2012).

2.2 BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação é uma tecnologia que consiste em promover a detoxificação do ambiente. Essa estratégia visa utilizar atividade biológica por meio de microrganismos vivos que possuam capacidade de modificar ou decompor determinados poluentes, transformando-as em inertes.

As técnicas de biorremediação microbiana utilizam microrganismos ou compostos produzidos por eles para degradar ou transformar contaminantes em formas menos tóxicas ou atóxicas, visando a recuperação do ambiente contaminado

(MALLMANN et al., 2019). Em casos de ambientes com alta concentração de nutrientes, os microrganismos biorremediadores podem absorver e metabolizar os poluentes, retirando-os do ambiente e diminuindo a eutrofização. Outras características importantes da biorremediação são o baixo custo, alto potencial na remoção de contaminantes e a versatilidade de poder realizar o tratamento *in situ* (no local contaminado) ou *ex situ* (fora do local contaminado, utilizando amostras) (BRITO, 2021).

A utilização desta biotecnologia está em crescimento em vários países, e em alguns casos, pode apresentar menor custo e maior eficiência na remoção dos contaminantes do que as técnicas físicas e químicas (SOARES, 2011).

2.3 BIOFILME

O biofilme é uma matriz extracelular de substâncias poliméricas (MENOITA et al., 2012) produzida por microrganismos. Por definição, pode ser um ecossistema ou comunidade microbiológica complexa que tem como característica células com adesões irreversíveis a um substrato ou aderidas entre si e colocadas em uma matriz formada de polissacarídeos extracelulares de produção própria (CARVALHO et al., 2019).

Por conta de sua função de proteção contra agentes agressivos, o biofilme constitui uma rede gelatinosa que imobiliza e protege as células (OLIVEIRA, BRUGNERA e PICCOLI, 2010). Possuem propriedades como resistência a desinfetantes, antibióticos, radiação UV, desidratação e predadores como protozoários (XAVIER et al., 2015).

Referente a composição da matriz dos biofilmes, Oliveira, Brugnera e Piccoli (2010) dizem que 97% da matriz do biofilme é composta por água e que os microrganismos representam somente de 2 a 5%, e que a matriz de substâncias poliméricas extracelulares de origem microbiana é responsável pela morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional do biofilme. Mesmo que a predominância de sua composição seja de polissacarídeos ainda pode ser constituída também de proteínas.

A formação do biofilme ocorre geralmente em superfícies, pois são locais onde há maior concentração de nutrientes, em comparação com líquidos (KASNOWSKI et al., 2010). Como citado por Oliveira, Brugnera e Piccoli (2010), de 95 a 99% dos

microrganismos existem na forma de biofilmes, que podem ser encontrados em substratos que possuam umidade suficiente para suportar seu crescimento.

O fato de que podemos encontrar biofilme em diversos substratos é um indicativo de que a imobilização do biofilme pode ser realizada em diferentes materiais, no entanto, na indústria alimentícia, a barreira de umidade e porosidade é quebrada por conta da grande quantidade de nutrientes encontrados nesses locais. É possível encontrar crescimento de biofilme em superfícies como aço inox, vidro, polipropileno, fórmica, ferro, poliestileno de baixa densidade, policarbonato, entre outros (CARVALHO et al., 2019). Uma boa opção para a análise de crescimento e de composição do biofilme é imobilizá-lo em substratos artificiais (PÉREZ, 2015).

A adesão do biofilme aos substratos ocorre com o auxílio de uma matriz de exopolissacarídeos (glicocálix) secretada pelos microrganismos (KASNOWSKI et al., 2010). Sua formação ocorre, didaticamente, em 5 etapas: na primeira etapa ocorre a adesão inicial, que por sua vez pode ser revertida; já na segunda etapa, ocorre a adesão irreversível, a qual não pode se reverter a partir deste ponto; a terceira etapa consiste a formação da estrutura do biofilme e começa a adquirir forma conforme seu amadurecimento, sendo que o amadurecimento do biofilme ocorre de 3 a 6 dias após a adesão inicial, podendo ocorrer variações; na quarta etapa pode ser que ocorra o desprendimento do biofilme do substrato que anteriormente estava aderido, que pode ocorrer após 9 a 12 dias depois do início dos eventos (OLIVEIRA, BRUGNERA e PICCOLI, 2010); e na quinta e última etapa, o ciclo de formação do biofilme se inicia novamente (CARVALHO et al., 2019).

2.4 BIOFILME COMO BIORREMEDIADOR

Os tratamentos biológicos de efluentes possuem como objetivo atender padrões de lançamento de efluentes em corpos hídricos evitando causar quaisquer problemas ambientais (MUTCHAMUA et al., 2022). Os tratamentos biológicos podem ser divididos em aeróbios e anaeróbios. Os tratamentos aeróbios são utilizados com alta eficiência para a remoção de nutrientes e os anaeróbios possuem melhor eficiência na remoção de matéria orgânica, como lodo (OLIVEIRA, AZEVEDO e CAVALCANTI, 2021) existindo ainda a possibilidade de combinar os dois tipos de métodos de tratamento, possibilitando um sistema mais compacto e menor consumo de energia (SILVA et al., 2015).

Os biofilmes possuem características biorremediadoras, o que faz com que tenham aptidões em absorver nutrientes, auxiliando no controle da eutrofização, diminuindo a concentração de nutrientes em excesso e os utilizando para seu próprio desenvolvimento e crescimento (BRITO, 2021). Além das características citadas anteriormente ainda apresentam benefícios quando são utilizados em processos de fermentação, tratamentos de efluentes domésticos e industriais e podem ser utilizados com eficácia se tratando de processos biotecnológicos de degradação de poluentes orgânicos e inorgânicos, como herbicidas (FERREIRA, 2016).

Atualmente vem ocorrendo o crescimento e popularização da utilização de biofilmes como agentes biorremediadores, principalmente na área de descontaminação de solos e ambientes aquáticos (VIANA, 2009). Os biofilmes microbianos podem ser utilizados também no tratamento de água potável, ao eliminar da água substâncias tóxicas para o consumo humano (MACÊDO, 2000), além de vários outros poluentes químicos. Viana (2009) também diz que a utilização de biofilme na biorremediação ambiental é justificada por apresentarem alta taxa de biomassa e característica imobilizadora de compostos poluentes pelos mecanismos de bioadsorção, bioacumulação e biomineralização.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Quantificar a eficácia de biorremediação por biofilmes em um fluxo de efluente simulado conforme a ecotoxicidade.

3.2 Objetivos específicos

(1) Isolar bactérias provenientes de ambiente selecionado de produção de biofilme selecionando o microrganismo com melhor potencial de biorremediação; (2) identificar o potencial de produção de biofilme pelas bactérias selecionadas; (3) verificar se o biofilme produzido no substrato de espuma de poliuretano tem maior quantidade quando relacionado ao biofilme produzido no substrato natural de bagaço de cana-de-açúcar; e (4) inspecionar se o tratamento com o substrato de espuma de poliuretano foi mais eficaz do que o tratamento feito com bagaço de cana-de-açúcar.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das amostras

As amostras de água foram coletadas na lagoa da Universidade Federal de São Carlos, no campus de Araras, localizado no Bloco C da universidade. (-22.307926, -47.383337). Esse local foi escolhido para as coletas por conta do provável escoamento de agrotóxicos proveniente das plantações em seu entorno, metais pesados, fertilizantes e outras fontes de toxicidade. Em seu entorno existe uma faixa de mata nativa que poderia ser uma barreira para algumas formas de poluição, mas por ser muito estreita (ao Norte, 33m; a Oeste, 72m), provavelmente não realiza essa função. Infelizmente não foi possível caracterizar o efluente em relação a DQO, DBO e turbidez neste trabalho, no entanto, são características importantes a serem quantificadas em próximos trabalhos sobre este local.

De acordo com a Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005, capítulo II, seção I, este corpo d'água está classificado como classe IV, que são águas doces destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; à pesca amadora; à recreação de contato secundário; e à dessedentação de animais.

Figura 1: Imagem via satélite da Universidade Federal de São Carlos, em Araras, mostrando a região em que se localiza a lagoa teste do experimento, podendo ser observada plantações de cana-de-açúcar e outros dois corpos d'água. Escala: 1:300



Fonte: Google Earth com edição autoral.

Figura 2: Lagoa em que foi realizada a coleta de amostras de água para o experimento, localizada no Bloco C da UFSCar Araras.



Fonte: autoral

Para a coleta foram utilizados 3 frascos de boeco de 500mL cada, autoclavados e identificados., como realizado por Piratelli, Quinones e Máximo (2013). Após serem autoclavados, os frascos foram abertos somente no momento da coleta, submergindo metade do frasco na água e o fechando logo em seguida. Posteriormente, foram levados ao laboratório e foram armazenados em geladeira até as análises e tratamentos.

4.2 Microrganismos rizóbios

O primeiro material necessário são microrganismos que sejam potenciais criadoras de biofilme. Os microrganismos utilizados fazem parte da coleção microbiana do Grupo de Pesquisas em Biorremediação, Bioprospecção e Biodegradação (Gr3B). As cepas isoladas são provenientes do solo aderido às raízes de *Crotalaria spectabilis*, cultivadas em substrato retirado do CCA-UFSCar, em vaso de 5 litros e mantidas em casa de vegetação.

Foi realizada a remoção direta do solo aderido às raízes das duas plantas e a raspagem de sua rizosfera e solo que estava entorno da raiz. Foram retiradas 3g de

solo aderido às raízes, que foram solubilizados na solução salina (NaCl) a 0,85% e agitados em shaker a 30 rpm por 24 horas, a 22°C para aumentar a quantidade de microrganismos suspensos na solução.

Após essa etapa, foi efetuada a diluição seriada até 10^{-5} e plaqueamento das amostras, nas placas de Petri, contendo meio de cultura Ágar Nutriente (NA) e antifúngico Nistatina a 2mL/L, adequado para o crescimento de actinobactérias, deixados em incubadora por 7 dias com o objetivo de isolamento.

Foram identificados 5 tipos de microrganismos, já em culturas puras, demonstrados na figura 3, itens a, b, c, d e e.

Figura 3: Microrganismos resultantes do plaqueamento por diluição seriada em culturas puras em meio de cultura NA.

- a) Microrganismo “AF” (sigla proveniente da coloração amarelo fluorescente, por não possuir identificação).



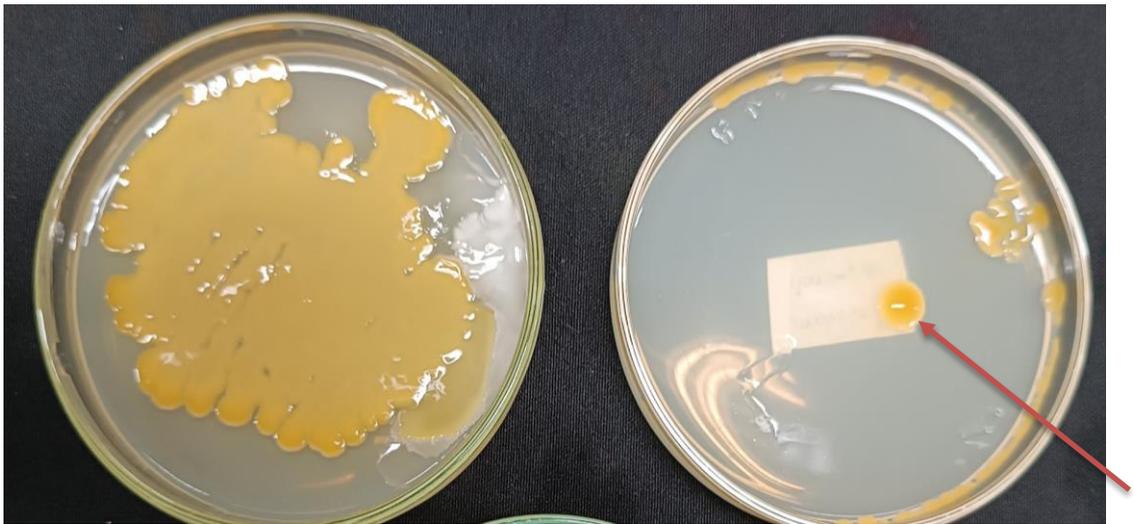
- b) Microrganismo "BL" (sigla proveniente da coloração branco leitoso, por não possuir identificação).



- c) Microrganismo "BN" (sigla proveniente da coloração branco neutro, por não possuir identificação).



- d) Microrganismo “AL” (sigla proveniente da coloração amarelo alaranjado, por não possuir identificação)



- e) Microrganismo “BT” (sigla proveniente da coloração branco transparente, por não possuir identificação).



Fonte: autoral

Os microrganismos foram corados em lâminas utilizando o corante azul de metileno e foi identificado que são bactérias com morfologia de *coccus*.

Os microrganismos selecionados para o experimento foram o BN (branco neutro, pois os microrganismos não possuem identificação) e o AL (amarelo alaranjado, por também não possuir identificação), por conta de suas consistências gelatinosas e por conta da coloração diferenciada envolta das colônias, que as setas estão indicando, sendo indicativos de produção de biofilme.

4.2.1. Método Ágar Vermelho Congo

Para analisar se os microrganismos selecionados têm potencial construtor de biofilme, foi feito o teste confirmatório utilizando o método Ágar Vermelho Congo.

O método Ágar Vermelho Congo descrito por Freeman et al. (1989), é um método qualitativo para a detecção de biofilme utilizando o meio de cultura Ágar Vermelho Congo (CRA). Originalmente, neste método se utiliza o caldo BHI (*brain heart infusion broth*), no entanto, não havia disponibilidade deste meio em laboratório, além de que este caldo é utilizado mais especificamente para microrganismos patogênicos, portanto o método foi adaptado para a cultura de bactérias mais simples.

Para realizar esse método, foram realizados os seguintes passos: o meio foi preparado com ágar nutriente 28 g/L, sacarose 50 g/L e indicador Vermelho Congo 8 g/L. Primeiro, foi preparado o indicador Vermelho Congo a 0,8% e autoclavado a 121°C por 15 minutos, separadamente dos outros constituintes do meio; depois o Vermelho Congo foi adicionado ao meio de cultura com os outros componentes, também já autoclavados da mesma forma, assim que o meio ágar estivesse a 55°C; os microrganismos foram inoculados nas placas contendo o meio por 24 horas a 35°C aerobiamente.

O crescimento de colônias pretas com aspecto seco e cristalino indica produção de biofilme. O experimento foi feito em triplicata para cada microrganismo (AL e BN).

4.2.2 Imobilização do biofilme

Os microrganismos-teste (BN e AL) foram inoculados em tubos de ensaio contendo caldo nutriente a 100% (1:1) e mantidos em estufa por 48h a 35°C sem agitação.

Para a imobilização de biofilme nos substratos de espuma de poliuretano e bagaço seco de cana de açúcar foram utilizados 14 Erlenmeyer de 125 mL contendo 75 mL de caldo nutriente (*nutrient broth*) a 50% (1:2), ou seja, uma parte de meio de cultura para duas partes de água destilada, divididos da seguinte forma:

| | Espuma de poliuretano | Bagaço de cana-de-açúcar |
|-------------------|-----------------------|--------------------------|
| Sem microrganismo | 1 | 1 |

| | | |
|----|---|---|
| BN | 3 | 3 |
| AL | 3 | 3 |

Os substratos inseridos nas vidrarias contendo meio de cultura possuíam as seguintes dimensões:

- espuma de poliuretano: 2,0 x 2,0 x 0,5 cm
- bagaço de cana de açúcar: 1,0 x 4,0 x 0,5 cm

para que assim, os dois substratos tivessem o mesmo volume de 2 cm³.

O inóculo em meio líquido foi pipetado na quantia de 1000 µL em cada um dos ensaios, apenas não sendo adicionado aos ensaios controles. Os 14 Erlenmeyer foram levados ao shaker por cerca de 168 horas (aproximadamente 7 dias) a 35°C sob agitação de 60 rpm. De acordo com Krsmanovic et al (2021) o fluxo de agitação promove o crescimento de um biofilme mais denso e espesso quando comparado a ambientes sem agitação, facilitando também a detecção do biofilme.

4.2.2.1 Quantificação do biofilme

A quantificação dos sólidos aderidos nos substratos realizada foi baseada na metodologia trabalhada por Correa (2014), Vela (2006) e Daniel (2005). Os substratos foram retirados dos meios de cultivo em Erlenmeyer, cortados e inseridos em tubos Falcon de 50 mL, lavados com água destilada, submetido a agitação em vórtex por 10 minutos para que a biomassa aderida se desprendesse. Depois os substratos foram retirados dos tubos que foram levados a centrífuga por mais 10 minutos para que os sólidos decantassem. A água de lavagem da espuma e os sólidos decantados foram submetidos a análise de Sólidos Totais (STA), que consiste em colocar a água da lavagem da espuma e os sólidos para evaporar toda a água e sobrar somente os sólidos e pesá-los, de acordo com procedimentos descritos por APHA (2017).

4.3 Tratamento

Para iniciar o processo de biorremediação foi construído um fluxo utilizando béquer de 500 mL (figura 4), baseado em um reator de tanque com agitação contínua (CSTR) (figura 5) em que a amostra de água da lagoa teste foi inserida no béquer juntamente ao substrato contendo biofilme. A amostra de água passou pelo primeiro substrato contendo biofilme sob agitação de 45 rpm a 22°C por 24 horas para simular

um ambiente aquático em condições normais. Após as 24h, o restante foi adicionado a outro sistema com um biofilme “novo”, e assim foi feito com todos os substratos de cada um dos microrganismos.

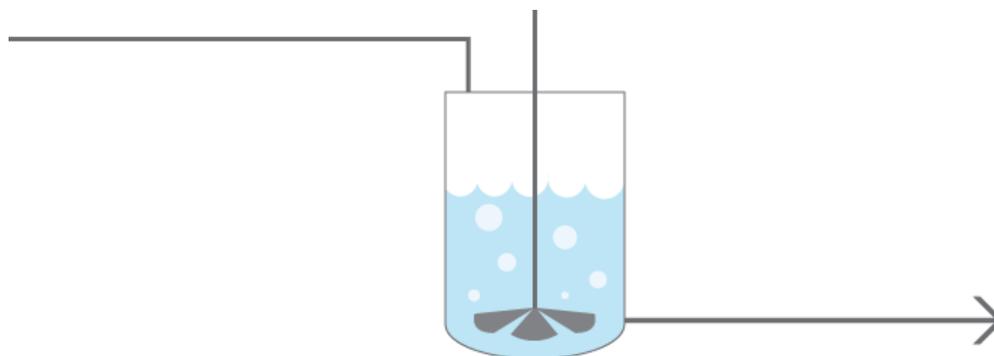
Figura 4: Ilustração do modelo de fluxo de tratamento baseado em reator CSTR com biofilmes immobilizados nos substratos de bagaço de cana-de-açúcar e espuma de poliuretano em agitação de 45 rpm a 22°C por 24 horas.



Fonte: autoral

O reator de tanque com agitação contínua (CSTR) foi utilizado como modelo para o tratamento realizado com os substratos e os biofilmes. Os CSTR são reatores com fluxo contínuo através de tubulações que são conectadas ao reator. Possuem também um sistema de mistura, que podem ser lâminas ou hélices, fazendo com que a mistura seja perfeita. (FONSÊCA, 2017). A grande diferença entre o sistema implementado no experimento e o CSTR foi o modelo de vazão, sendo que o CSTR utiliza uma forma de vazão contínua, e por conta de não possuir disponibilidade de vidrarias neste formato no laboratório a vazão da solução era realizada de forma manual de um béquer para outro.

Figura 5: Modelo de reator de tanque com agitação contínua (CSTR) que foi utilizado como base para a construção do fluxo de tratamento com biofilmes.



Fonte: <https://sutherland.che.utah.edu/teaching/educational-apps/isothermal-cstr/>

4.4 Análise das amostras pré e pós-tratamento

Foram feitas análises anterior e posterior aos processos de tratamento do efluente, sendo eles avaliação da presença de toxicidade com bioensaios em raiz de cebola (*Allium cepa*) e a verificação do pH das amostras utilizando papel indicador.

4.4.1 Análise de raízes

Para a análise de toxicidade foi utilizada a técnica de bioensaios com raízes de cebola (figura 6), como feito no trabalho de Kruger (2009). Para cada concentração testada e para o controle negativo (água destilada) foi utilizado um bulbo de *A. cepa*. Os bulbos foram inicialmente preparados e colocados em água destilada durante 96 horas a temperatura ambiente, para estimular o desenvolvimento do meristema radicular. Após este período, os bulbos foram colocados nas soluções teste por um período de 48 horas (RANK et al., 1997).

Figura 6: Bioensaios com raízes de *Allium cepa*, um bulbo em cada solução de tratamento, água bruta e água destilada.



Fonte: autoral

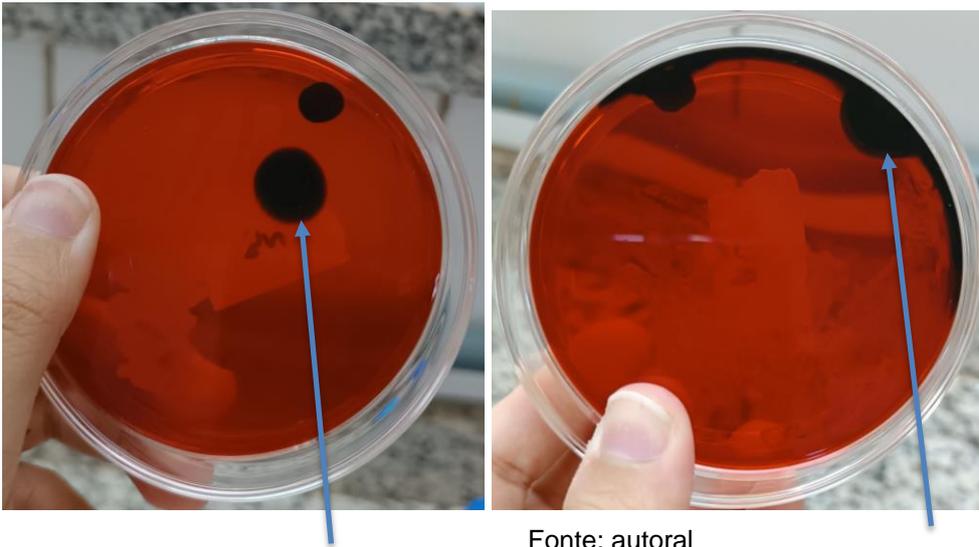
O comprimento das raízes foi utilizado como índice de toxicidade, como referência padrão foram utilizadas três raízes. Para cada bulbo, o comprimento das três raízes maiores foi medido com auxílio de uma régua e, então, estimado o comprimento médio. Cada tratamento foi comparado com o controle e a ocorrência de toxicidade (inibição do crescimento) foi considerada quando a diferença entre tratamento e controle negativo foi estatisticamente significativa.

5 RESULTADOS

5.1 Teste Ágar Vermelho Congo

O primeiro teste realizado foi o Ágar Vermelho Congo para a identificação de formação de biofilme pelos microrganismos AL e BN. As figuras 7 e 8 mostram duas placas com o meio indicador, que resultaram em positivas para formação de biofilme pelos microrganismos selecionados.

Figuras 7 e 8: Teste Ágar Vermelho Congo com microrganismo BN (à esquerda) e microrganismo AL (à direita), com resultado positivo para formação de biofilme.

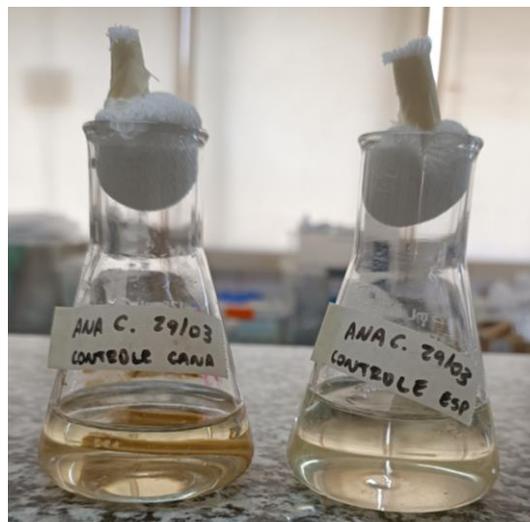


Fonte: autoral

5.2 Imobilização do biofilme

Para a imobilização do biofilme em substrato natural e sintético, foram produzidos os frascos com o meio de cultura e os substratos imersos. A figura 9.a mostra o frasco controle, sem turbidez, para podermos comparar com a figura 8.b que apresenta grande turbidez e mudança de coloração no meio, mostrando o crescimento dos microrganismos na solução.

Figura 9: a) Erlenmeyer com meio de cultura caldo nutriente a 50% sem inoculação (controle) após 168 horas de incubação em shaker a 60 rpm.



Fonte: autoral

- b) Erlenmeyers com inoculação de microrganismo BN em caldo nutriente 50% após 168 horas de incubação em shaker a 60 rpm.

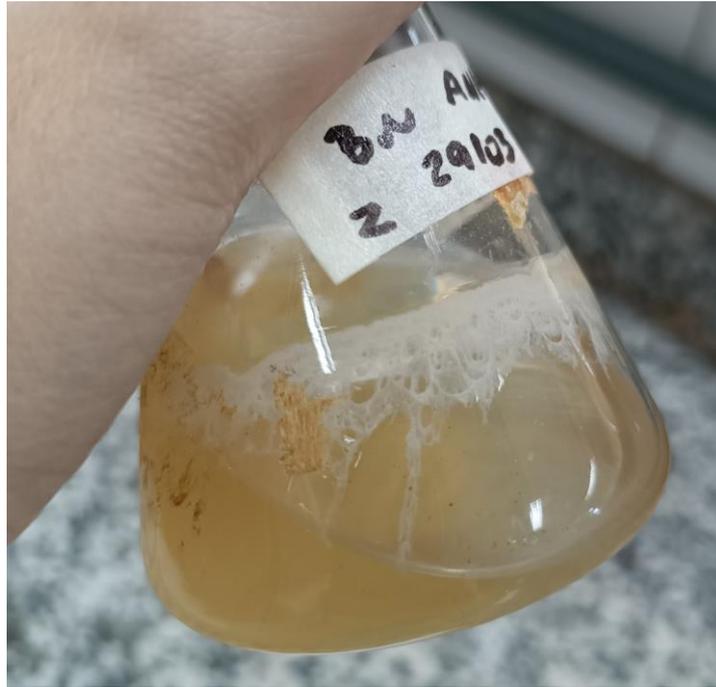


Fonte: autoral

A partir da observação das vidrarias contendo os meios de cultura após inoculação e incubação foi possível visualizar algumas características indicadoras de crescimento de biofilme pelos microrganismos.

Nas figuras 9.b e 10.a, nos ensaios com o microrganismo BN foi evidenciado a presença de material aderido à parede da vidraria, material em suspensão e aderido aos substratos (figuras 10.b e 10.c), e ainda apresentou turbidez no meio de cultura.

Figura 10: a) Erlenmeyer com biofilme do microrganismo BN fixado na parede interna da vidraria contendo meio de cultura caldo nutriente a 50%.



Fonte: autoral

b) Erlenmeyer com biofilme do microrganismo BN imobilizado em poliuretano imerso no meio de cultura caldo nutriente a 50%.



Fonte: autoral

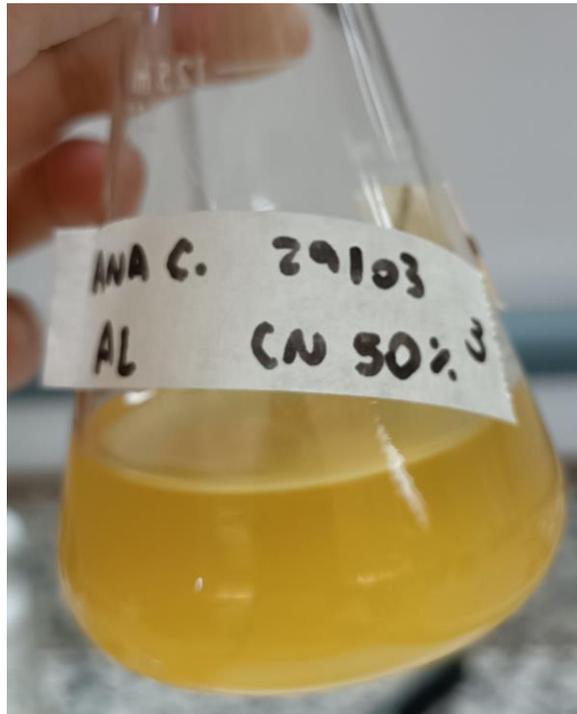
c) Erlenmeyer com biofilme do microrganismo BN immobilizado em bagaço de cana-de-açúcar imerso no meio de cultura caldo nutriente a 50%.



Fonte: autoral

Os frascos contendo a inoculação do microrganismo AL no meio de cultura líquido mudaram drasticamente suas colorações e não apresentaram material suspenso visível como visto nos frascos do microrganismo BN. Ao movimentar o frasco foi possível perceber a mudança da viscosidade do meio de cultura, que de líquido se tornou muito viscoso (figuras 11.a e 11.b).

Figura 11: a) Erlenmeyer com biofilme do microrganismo AL imobilizado em poliuretano imerso no meio de cultura caldo nutriente a 50% (não visível).



Fonte: autoral

b) Erlenmeyer com biofilme do microrganismo AL imobilizado em bagaço de cana-de-açúcar imerso no meio de cultura caldo nutriente a 50%.



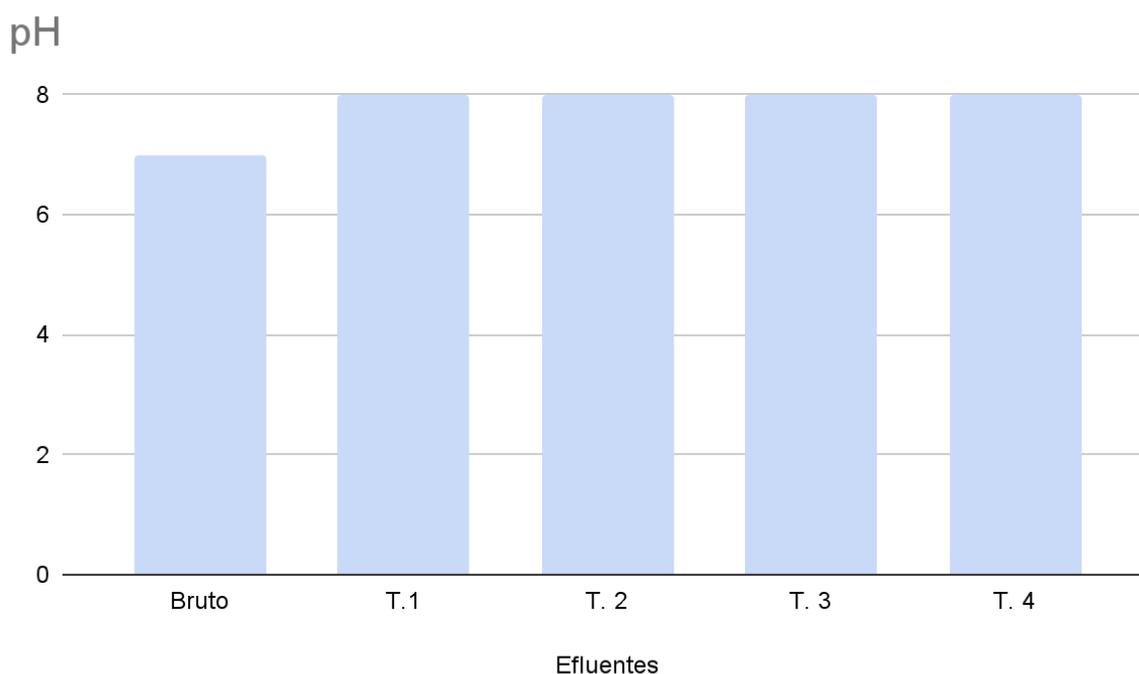
Fonte: autoral

O biofilme produzido pelo microrganismo BN apresentou visualmente um aspecto de membrana fina com coloração branca opaca, que se rompe facilmente, com aderência baixa no substrato de bagaço e intermediária na espuma de poliuretano, mas que, no entanto, cresceu visivelmente nas paredes das vidrarias. Já o biofilme produzido pelo microrganismo AL apresentou visualmente um aspecto viscoso e que se mistura facilmente com o meio de cultura líquido, o que tornou difícil sua separação do meio, apresentou também aderência intermediária ao substrato de cana-de-açúcar, alta ao substrato de poliuretano e não cresceu nas paredes das vidrarias. Em relação aos substratos utilizados em cada uma das culturas do microrganismo AL, visivelmente, o poliuretano conseguiu oferecer melhores condições de adesão para o biofilme.

5.3 pH

Foi realizada a medição de pH de todas as soluções teste após o tratamento com os biofilmes produzidos pelos microrganismos AL e BN.

Figura 12: Gráfico com resultados do pH das soluções teste. T.1 = BN + poliuretano; T.2 = BN + bagaço de cana de açúcar; T.3 = AL + poliuretano; T.4 = AL + bagaço de cana de açúcar; BRUTO = água do lago, sem tratamento.



Fonte: autoral

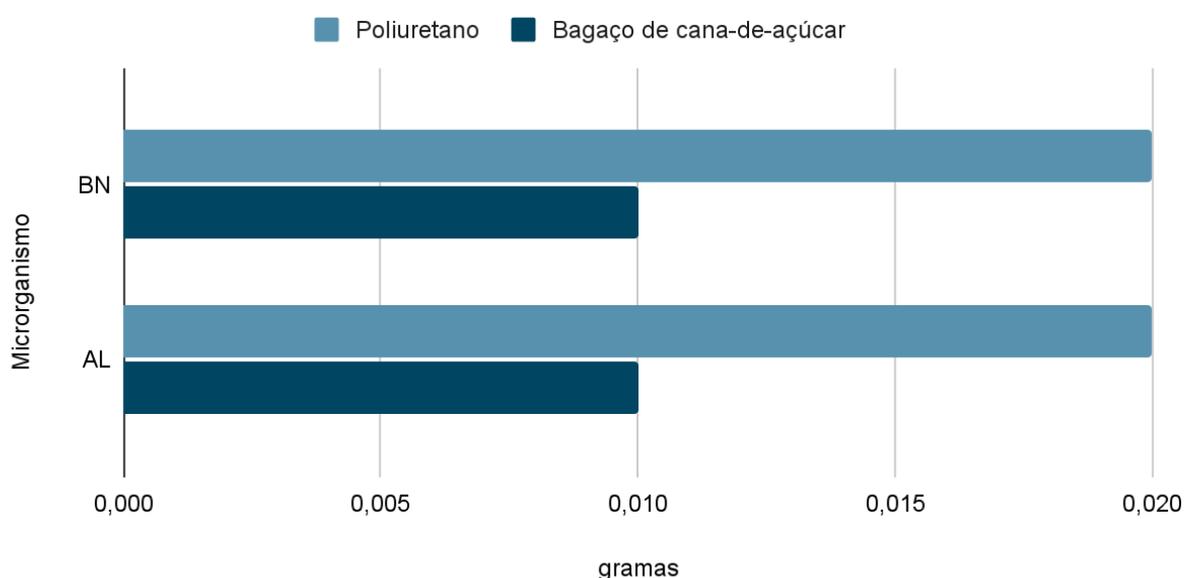
De acordo com a figura 12, foi possível observar que todas as soluções provenientes dos tratamentos com o biofilme apresentaram aumento no pH. Esta alcalinização de pH 7,0 para 8,0 em todas as soluções teste.

5.4 Análise de Sólidos Totais

A análise de sólidos totais foi realizada com o objetivo de quantificar a massa sólida do biofilme produzida e aderida aos substratos. Os resultados da quantificação estão apresentados na figura 13.

Figura 13: Gráfico dos resultados da Análise de Sólidos Totais (STA) dos microrganismos AL e BN nos substratos de espuma de poliuretano (sintético) e bagaço de cana-de-açúcar (natural).

Análise de Sólidos Totais (STA)



Fonte: autoral

Neste procedimento foi realizado o desprendimento da massa polissacarídica de cada um dos substratos de seus respectivos microrganismos por agitação em vórtex e centrifugação para separar os sólidos do líquido. Para chegar a esses números foi feita a pesagem, em gramas, dos sólidos após secagem de toda parte líquida que possuíam. Ao analisar os resultados, podemos observar que o substrato de poliuretano, poroso e rugoso, apresentou a mesma massa de sólidos para os dois microrganismos testados. Já o substrato de bagaço de cana-de-açúcar, de acordo

com a pesagem dos sólidos, apresentou metade da massa aderida em relação ao substrato sintético. Esse método apresentou resultados pouco sensíveis ao identificar que as pesagens foram baixas e próximas aos limites analíticos da balança, no entanto deve se considerar que ainda sim foi uma análise importante a ser realizada uma vez que foi apresentado o dobro de sólidos aderidos no substrato de poliuretano e ainda sendo possível visualizar qualitativamente o biofilme formado nos substratos.

5.5 Ecotoxicidade

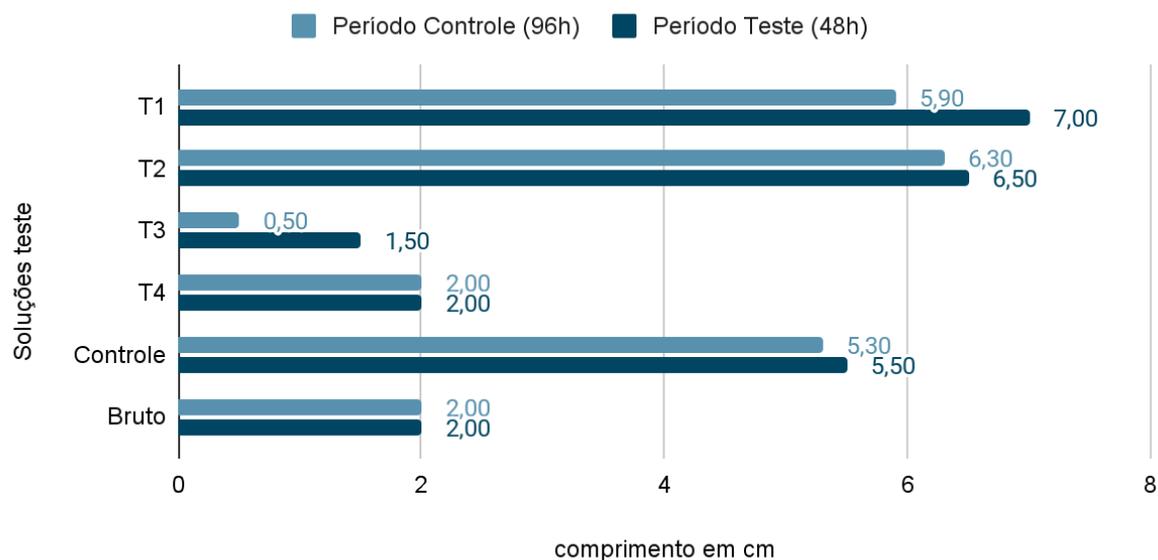
O parâmetro utilizado para a análise de toxicidade foi o crescimento das raízes de *Allium cepa* (figura 14), comparando o tamanho quando exposto à solução controle e à solução teste respectiva. A estagnação de crescimento da raiz foi utilizada como indicativo de toxicidade.

Após a exposição dos bulbos, no período controle (bulbos em água destilada por 96h), foi possível observar que as raízes de cada um dos seis bulbos cresceram de forma não uniforme, algumas cresceram muito mais do que outras na solução controle (água destilada), portanto, a comparação de crescimento foi feita individualmente, sem relacionar um bulbo com outro.

Figura 14: Resultados e sados do bioensaio com bulbos e raízes de *Allium cepa*, que mostram crescimento, não crescimento ou regressão. T.1 = BN + poliuretano; T.2 = BN + bagaço de cana de açúcar; T.3 = AL + poliuretano; T.4 = AL + bagaço de cana de açúcar; BRUTO = água do lago, sem tratamento.

Bioensaio com *Allium cepa*

Tamanho médio de 3 unidades de raízes de *Allium cepa* de cada bulbo



Fonte: autoral

Ao analisar os resultados, pode-se observar que houve estagnação total de crescimento em 2 dos 6 bulbos, sendo um deles, do efluente bruto. No caso da solução teste T4, não ocorreu biorremediação eficaz.

Os testes T2 e controle obtiveram a mesma quantidade de crescimento de 0,2 cm, enquanto T1 obteve 1,1 cm e T3 obteve 1 cm.

Ao relacionar os substratos com a quantidade de crescimento, pode-se observar que o crescimento das raízes nas soluções T1 e T3, que são os substratos de poliuretano, cresceram mais do que quando comparadas as soluções T2 e T4, que são as de bagaço de cana-de-açúcar.

6 DISCUSSÃO

Um dos passos mais importantes para o desenvolvimento desta pesquisa é a formação de biofilme pelos microrganismos selecionados. A partir do método ágar Vermelho Congo, descrito por Freeman et al (1989) foi detectada a produção de

biofilme pelos microrganismos AL e BN, que são microrganismos encontrados no solo. Não é muito comum na literatura encontrar estudos sobre produção de biofilme em ambientes terrestres tanto quanto encontramos sobre biofilme em ambientes aquáticos. De acordo com Cai et al. (2019) bactérias presentes no solo podem produzir biofilme principalmente em raízes, hifas fúngicas e matéria orgânica em decomposição com função de proteção as colônias, fornecendo proteção contra predação, dessecação, entre outros.

Após detectar que os microrganismos produziam biofilme, outro passo importante foi a imobilização do biofilme em dois diferentes substratos, bagaço de cana-de-açúcar (natural) e espuma de poliuretano (sintético). A imobilização de biofilme em espuma de poliuretano é bem comum, assim como em outros tipos de polímeros. No trabalho de Marque, Silva e Foresti (2021) os autores relatam que a utilização do poliuretano foi escolhida por possuir grau de porosidade elevado e baixo valor econômico. Liu et al (2019) utilizou diversos substratos para imobilização de biofilme em seu estudo, sendo um deles o bagaço de cana-de-açúcar, por ser também de fácil acesso, de baixo custo, alta porosidade e boa capacidade de retenção de líquidos. Por estas características, o bagaço de cana-de-açúcar foi um substrato escolhido para ser comparado com a espuma de poliuretano por ser um substrato com potencial tão grande quanto o poliuretano, mas que com características biodegradáveis em relação ao polímero. Ainda em relação aos substratos utilizados em cada uma das culturas do microrganismo AL, visivelmente, o poliuretano conseguiu oferecer melhores condições de adesão para o biofilme. A adesão do biofilme a diferentes substratos está relacionada com diversas características do material, como porosidade, rugosidade (BARROS, 2021) e permeabilidade (ORTEGA et al, 2001). A adesão ainda pode estar relacionada com características da superfície dos microrganismos e do material, como hidrofobia e hidrofília, sendo que superfícies hidrofóbicas favorecem a adesão de microrganismos hidrofóbicos e superfícies hidrofílicas favorecem a adesão de microrganismos hidrofílicos. As forças de Van der Waals possuem papel importante na forte adesão de alguns microrganismos a superfícies suporte devido a interação entre a dupla camada elétrica das células e a superfície interna do substrato suporte (ORTEGA et al, 2001).

Outras evidências secundárias de crescimento de biofilme nos meios de cultura foi primeiramente a turbidez apresentada nos meios de cultura após a incubação, sendo um indicador de bom crescimento bacteriano, que conseqüentemente mostrou-

se estar em um ambiente favorável para a geração de biofilme. Outra evidência foi a aderência de material à superfície da vidraria após incubação por 7 dias a 35°C, assim como ocorreu no trabalho de Ristow et al (2008) que em tubo de ensaio havia inóculo de microrganismo em meio de cultura líquido, e após 10 dias de incubação a 30°C foi formado um biofilme na interface ar-meio de cultura.

O fato de que o meio de cultura contendo microrganismo AL tornou-se viscoso e gelatinoso pode ser relacionado ao que cita Peterson et al (2015), que diz que a viscosidade do biofilme está relacionada com sua estrutura e composição, que utilizam a viscosidade a seu favor como fator de resistência do biofilme. De acordo com Sutherland (2001) o biofilme quando expostos a íons, em razão da interação com alguns grupos de ácido carboxílico expostos nos exopolissacarídeos é possível que aconteçam alterações resultando em aumento da viscosidade ou até mesmo gelificação. Neste caso, o aumento de viscosidade pode ter ocorrido por conta dos íons presentes no meio de cultura em que o microrganismo foi inoculado.

Em relação ao teste de pH da água coletada na lagoa teste, de acordo com a CETESB, o parâmetro considerado adequado para a presença de peixes de água doce varia o pH entre 7,0 e 8,0, mostrando que a água após o tratamento estaria dentro do parâmetro de pH ótimo para a fauna aquática. A alcalinização pode ter ocorrido por conta da interação com alguns componentes que contaminaram as soluções em tratamento, como resquícios de meio de cultura ou presença dos microrganismos teste. Tomaz (2016) cita que os dados de pH das soluções é um dos dados mais importantes quando avaliamos ambientes aquáticos. O pH é um parâmetro que pode interferir em processos biogeoquímicos, no balanço de CO₂, na natureza química de água, e na solubilidade de sais.

Retomando as características dos substratos testados neste trabalho para compreender melhor os motivos que levaram o poliuretano ter apresentado melhores resultados em retenção de biofilme do que o bagaço de cana-de-açúcar, de acordo com Antunes et al (2022) a lignina é o maior biopolímero da natureza, e é um dos três principais componentes do bagaço de cana-de-açúcar. Gallardo-Rodriguez, Rios-Rivera e Von Bennevit (2019) citam que um dos problemas do alto teor de lignina é que essa molécula pode inibir o crescimento de microrganismos. O fato de que houve menor crescimento de biofilme no bagaço de cana pode estar relacionado com o alto teor de lignina que inibe crescimento de microrganismos, levando a inibir o crescimento também do biofilme. Ademais, por conta do frequente uso do poliuretano

provavelmente a espuma possui características mais adequadas para a imobilização do que o bagaço de cana. De acordo com Tang et al. (2020) estudos recentes revelaram que a lignina possui propriedade de encapsulamento de toxinas provenientes de, por exemplo, agrotóxicos e metais pesados, ou seja, além de ser um material natural, de baixo custo e biodegradável, ainda é possui propriedade que auxilia por si só a biorremediação de ambientes com toxicidade apresentada.

O teste de ecotoxicidade escolhido para este trabalho foi o crescimento de raízes de *Allium cepa* nas soluções de tratamento, controle e água bruta. De acordo com Lustosa et al. (2023) o comprimento das raízes de *Allium cepa* é considerado um parâmetro importante para a revelação da toxicidade da solução em que o bulbo teve contato. As raízes interagem com diversos fatores do ambiente e isso pode causar alterações nas raízes, além de que o não crescimento ou o crescimento diminuído pode ocorrer devido a mudanças cromossômicas e diminuição da atividade mitótica, no entanto esses parâmetros não foram avaliados. Vale ressaltar que este teste não tem como escopo identificar agrotóxicos, somente verificar uma possível toxicidade no ambiente aquático, mas que ainda assim podemos considerar os agrotóxicos como possível fonte de contaminação levando em consideração a localização do corpo d'água testado. De acordo com os dados de crescimento das raízes de *Allium cepa* as raízes que tiveram contato com as soluções contendo o biofilme em substrato de bagaço de cana-de-açúcar obtiveram menor crescimento do que as que tiveram contato com as soluções com poliuretano. Assim como provavelmente o biofilme cresceu menos no substrato de bagaço, por conta da propriedade inibitória de crescimento bacteriano da lignina, havia menos quantidade de biofilme no substrato de bagaço o que levou a baixa eficiência no tratamento das soluções teste.

Em relação aos testes que obtiveram um alongamento radicular maior quando comparado com o período controle, de acordo com os parâmetros designados para este teste, pode-se dizer que os tratamentos T1, T2 e T3 resultaram em dados que detoxificação da solução contaminada, sendo T1 a solução teste com melhores resultados.

7 CONCLUSÕES

Ao final deste trabalho e após a análise dos dados foi possível concluir que o isolamento das bactérias possíveis produtoras de biofilme coletadas em solo obteve resultado positivo, assim como o teste em ágar Vermelho Congo, utilizado para avaliar o potencial produtor de biofilme; que os resultados da análise de sólidos totais mostraram que o substrato sintético de espuma de poliuretano reteve mais biofilme do que o substrato natural de bagaço de cana-de-açúcar provavelmente por conta da lignina presente no bagaço; o microrganismo BN mostrou-se ligeiramente mais eficaz do que o microrganismo AL nos resultados obtidos com os testes de toxicidade com raízes de *Allium cepa* dizendo respeito à biorremediação das amostras de água, que de acordo com o teste de ecotoxicidade foi evidenciada toxicidade, no entanto, como não foram efetuados testes para detecção de agrotóxicos não é possível dizer que a toxicidade é resultante de sua presença; e que o tratamento utilizando espuma de poliuretano mostrou-se mais eficaz do que o tratamento feito com bagaço de cana-de-açúcar para detoxificação das soluções teste.

Este estudo mostrou-se importante em relação a descobertas na área de biorremediação utilizando biofilme para descontaminação de ambientes aquáticos com toxicidade presente, podendo contribuir com próximos estudos nas áreas de microbiologia, ecotoxicologia e biorremediação. Outras relevâncias deste trabalho podem ser a possibilidade de utilização de um substrato natural, neste caso, o bagaço de cana-de-açúcar, como material de imobilização de biofilme, encapsulamento de toxinas, imobilização celular e ser utilizado em processos de fermentação.

8 REFERÊNCIAS

ANTUNES, F. et al. A review on the valorization of lignin from sugarcane by-products: from extraction to application. **Biomass and Bioenergy**, v. 166, 2022.

APHA/AWWA/WEF (2017) **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 23rd Edition, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Denver.

ARMAS, Eduardo Dutra de et al. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na bacia do Rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. **Química Nova** [online]. 2005, v. 28, n. 6, p. 975-982. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000600008>>. Epub 12 Dez 2005. ISSN 1678-7064. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000600008>.

BARROS, M.C.C. **Avaliação da formação de biofilme e adesão de Candida albicans em polimetilmetacrilato termicamente ativado e em impressão 3D**. 2021, 53f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Odontologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2021.

BOLSAN, A.C. et al. Determinação de sólidos em suspensão através do método de centrifugação. **15ª Jornada de Iniciação Científica - JINC**: Concórdia, p. 12-13. 2021. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/229143/1/final9789.pdf>>. Acesso em: 26 de janeiro de 2023.

BORTOLUZZI, E. C. et al. Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo, RS. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, n. 4, p. 881–887, out. 2006.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**; Anuário Estatístico do Brasil, IBGE: Rio de Janeiro, 1998.

BRASIL, Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Classificação de águas doces, salobras e salinas do Território Nacional. Publicado no D.O.U.

BRITO, L.D. **Potencial de uso de macrófitas e biofilme como ferramenta de biorremediação na lagoa facultativa da estação de tratamento de esgoto de Mamanguape - PB**. 2021, 112f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2021.

CAI, P. et al. Soil biofilms: microbial interactions, challenges, and advanced techniques for ex-situ characterization. **Soil Ecol. Lett.** v. 1, p. 85–93, 2019.

CARVALHO, A.C.P. et al. Formação e resistência do biofilme microbiano em indústrias processadoras de alimentos. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v.16, n.30; p. 312-325, 2019. Disponível em: <<https://www.conhecer.org.br/enciclop/2019b/formacao.pdf>> . Acesso em 12 de junho de 2023.

CASSAL, V.B. et al. Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. **Rev. Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental - REGET**, Bagé, v. 18, n. 1, 2014, p.437-445.

CETESB. Mortandade de peixes: pH. **Companhia Ambiental do Estado de São Paulo**. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/mortandade-peixes/alteracoes-fisicas-e-quimicas/ph/#:~:text=J%C3%A1%20alguns%20metais%20em%20pH,para%20peixes%20de%20%C3%A1gua%20doce.>>

CHAVES, B.S., RODRIGUES, L.A.D. e PIMENTA, D.N. Agroecologia e saúde coletiva na construção dos agrotóxicos como problema de saúde pública no Brasil. **Saúde em Debate [online]**, v. 46, n. spe2, pp. 363-376, 2022.

COPETTI, C.M. et al. Biorremediação: metodologia sustentável na remoção de xenobióticos da água. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, 2022.

CORREA, Camila Zoe. **Uso de micro-organismos eficientes (EM's) na formação de biofilmes em espuma de poliuretano no tratamento de esgoto sanitário**. 2014. 93 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2014.

COSTA, A.F.S., et al. **Recursos hídricos**. Cadernos de Graduação - Ciências Exatas e Tecnológicas. Sergipe, v.1, n.15, p. 67-73, 2012.

DANIEL, L.M.C. **Remoção De Nitrogênio Via Nitrito Em Reator Operado Em Bateladas Sequenciais Contendo Biomassa Imobilizada E Aeração Intermitente**. 2005, 116f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

FERREIRA, I. C. et al. A contribuição e relevância do agronegócio para o Brasil. **Revista do CEDS**, v. 2, n. 10, 2022.

FERREIRA, T.A. **Degradação do herbicida Atrazina por consórcios de bactérias formadoras de biofilme**. 2016. 67f. Monografia (Bacharelado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/31282>>. Acesso em 13 de junho de 2023.

FONSÊCA, V.C.Q. **Múltiplos estados estacionários em um reator de mistura não-isotérmico**. 2017, 48f. Monografia (Bacharelado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Centro de Tecnologia, Natal, 2017.

FREEMAN, D.J., FALKINER, F.R., KEANE, C.T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, 42, 1989, p. 872-874.

FROTA, M.T.B.A.; SIQUEIRA, C.E. Agrotóxicos: os venenos ocultos na nossa mesa. **Cadernos de Saúde Pública** [online], v. 37, n. 2, 2021.

GALLARDO-RODRÍGUEZ, J.J., RIOS-RIVERA, A.C., VON BENNEVITZ, M.R. Living biomass supported on a natural-fiber biofilter for lead removal. **Journal of Environmental Management**, v. 231, p. 825–832, 2019.

GAYLARDE, C.C.; BELLINASSO, M.L.; MANFIO, G.P. Biorremediação. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 34, p. 36-43, 2005.

KASNOWSKI, M.C. et al. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Rev. Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano VIII, n. 15, julho, 2010.

KRSMANOVIC, M. et al. Hydrodynamics and surface properties influence biofilm proliferation. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 288, 2021.

KRÜGER, R.A. **Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com Allium cepa**. 2009. 58f. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) - Centro Universitário Feevale, Nova Hamburgo, 2009.

LIU, J. et al. (2019). Coproduction of hydrogen and butanol by *Clostridium acetobutylicum* with the biofilm immobilized on porous particulate carriers. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, p.11617-11624, 2019.

LOPES, C.V.A.; ALBUQUERQUE, G.S.C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, n. 117, p. 518–534, 2018.

MACÊDO, J.A.B. Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria farmacêutica. **Revista Fármacos & Medicamentos**, v.2, n.7, p. 19-24, Nov/Dez. 2000.

MALLMANN, V. et al. The Advantages of Bioremediation in Environmental Quality. **Ensaios e Cienc.**, v. 23, n. 1, p. 12-15, 2019.

MARQUE, M.B., SILVA, B.G., FORESTI, E. Obtenção do coeficiente de difusividade da amônia em biofilme aderido a espuma de poliuretano aplicado à nitrificação e desnitrificação simultâneas. **XVII Semana da Engenharia Ambiental**: São Carlos, 2021.

MENOITA, E. et al. Biofilms: Knowing the Entity. **Journal of Aging & Innovation**, 1 (2): p. 23-32, 2012.

MORO et al. Bactérias amonificantes e nitrificantes e teores de amônio e nitrato afetados por plantas de cobertura e fertilizantes nitrogenados. **Rev. Agrarian**, v.9, n.33, p. 204-207, Dourados, 2016.

MURO-VILLANUEVA, F., MAO, X., CHAPPLE, C. Linking phenylpropanoid metabolism, lignin deposition, and plant growth inhibition. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 202-208, 2019.

MUTCHAMUA, H.H.G. et al. Estabilização de lodo de lagoas de tratamento biológico de efluentes agroindustriais via desnitrificação. **9º Congresso Luso-Moçambicano de Engenharia / VI Congresso de Engenharia de Moçambique**, Maputo, 2022.

NASRALA, E.; LACAZ, F.A.C. e PIGNATI, W.A. Health surveillance and agribusiness: the impact of pesticides on health and the environment. Danger ahead! **Ciência & Saúde Coletiva** [online]. 2014, v. 19, n. 12, p. 4709-4718. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1413-812320141912.03172013>>.

DE OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.; PICCOLI, R.H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 277-284, 2010.

OLIVEIRA, D.C.S.; AZEVEDO, P.G.F.; CAVALVANTI, L.A.P. Processos biológicos para o tratamento de efluentes: uma revisão integrativa. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**: v. 8, n.18, p. 397-415, 2021.

OLIVEIRA, S.S. **O papel da avaliação de risco no gerenciamento de produtos agrotóxicos: diretrizes para a formulação de políticas públicas** [tese]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2005.

ORTEGA, F.S. et al. Aplicação de espumas cerâmicas produzidas via “gelcasting” em biorreator para tratamento anaeróbio de águas residuárias. **Cerâmica**, v. 47, n. 304, p. 199-203, 2001.

PAZ, V. P. DA S.; TEODORO, R. E. F.; MENDONÇA, F. C. Recursos hídricos, agricultura irrigada e meio ambiente. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, n. 3, p. 465–473, set. 2000.

PÉREZ, J.M. et al. **Biofilme e macrófitas como ferramenta de biorremediação em ecossistemas aquáticos e tratamento de esgotos**. 2015. 196 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

PESSOA, P.C. et al. Cholinesterase inhibition and behavioral toxicity of carbofuran on *Oreochromis niloticus* early life stages. **Aquatic Toxicol.** 2017; 105(3-4):312-320. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21794226>>.

PETERSON, B.W. et al. Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 2, 2015, p. 234–245.

PIGNATI, W.A., MACHADO, J.M.H., CABRAL, J.F. Acidente rural ampliado: o caso das "chuvas" de agrotóxicos sobre a cidade de Lucas do Rio Verde - MT. **Cien Saude Colet.** 2007; 12(1):863-872.

PIRATELLI, A.; QUINONES, E.M.; MÁXIMO, H.J. Análise microbiológica quantitativa e qualitativa da água do Ribeirão Constantino, localizado no município de Leme, estado de São Paulo. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, vol. 17, n. 2, pp. 37-50, Campo Grande, 2013.

RANK, J., & NIELSEN, M. (1997). Allium cepa anaphase–telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 390(1-2), 121–127. doi:10.1016/s0165-1218(97)00008-6

RIBAS, P.P., MATSUMURA, T.S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p. 149-158, 2009.

RIGOTTO, R.M., VASCONCELOS, D.P. e ROCHA, M.M. Pesticide use in Brazil and problems for public health. **Cadernos de Saúde Pública** [online]. 2014, v. 30, n. 7, p.1360-1362. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0102-311XPE020714>>.

RISTOW, P. et al. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. **Microbiology**, v. 154, n. 5, p. 1309-1317, 2008.

RODRIGUES, S. C.; BIANCHINI, A. Extraction and concentration of freshwater – and seawater – derived dissolved organic matter for use in aquatic toxicology studies. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Rio Grande, v. 2, n. 3, p. 275-281, 2007.

ROSSETTO, M.P.F., OTERO, E.V. Parcelamento clandestino do solo na área rural de Piracicaba/SP: conflitos e confluências entre urbano e rural. **XX ENANPUR**, Belém, maio/2023.

SANTOS, H.F. Neoliberalismo e expansão do agronegócio globalizado no Brasil. **Revista Tamoios**, São Gonçalo (RJ), v. 18, n. 1, p. 21-46, jan-jun. 2022.

SILVA, A.J. da. **Biodessulfatação com posterior oxidação parcial do sulfeto em reatores operados em bateladas sequenciais**. 2005. 188f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

SILVA, V.E.M. **Tratamento de efluentes vinícolas por processos biológicos**. 2015. 24f. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real. 2015.

SOARES, I.A. et al. FUNGOS NA BIORREMEDIAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. Arq. Inst. Biol., 2011 78(2), abr. 2011.

SUTHERLAND, I.W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**, v. 147, n. 1, p. 3-9, 2001.

SUZUKI, L.C. **Desenvolvimento de biofilme formado por Candida albicans in vitro para estudo da terapia fotodinâmica**. 2009. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, Universidade de São Paulo, 2009.

TOMAZ, D.B. **Avaliação da toxicidade das águas do Rio Sangão (Criciúma, Santa Catarina) utilizando Allium cepa L. como bioindicador**. 2016. 42f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2016.

VELA, F. J. **Tratamento de esgoto sanitário em reator anaeróbio operado em bateladas sequenciais e periodicamente aerado**. 2006. 159f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

VIANA, M.G. **Avaliação de produtos naturais sobre biofilmes formados em sistema dinâmico**. 2009. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Petróleo) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

XAVIER, J. et al. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, 76. p. 2-13, 2015.