

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE ENGENHARIA CIVIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
ENGENHARIA DO MEIO AMBIENTE - PPGEMA**

KEYLE BORGES E SILVA MONTEIRO

**REMOÇÃO DO HERBICIDA ATRAZINA POR FUNGOS DE DECOMPOSIÇÃO
BRANCA**

**GOIÂNIA
Agosto - 2013**

KEYLE BORGES E SILVA MONTEIRO

**REMOÇÃO DO HERBICIDA ATRAZINA POR FUNGOS DE DECOMPOSIÇÃO
BRANCA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia do Meio Ambiente - PPGEMA da Escola de Engenharia Civil da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia do Meio Ambiente.

Área de concentração:

Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientadora:

Profa. Dra. Mariângela Fontes Santiago.

Goiânia-GO

Agosto - 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

M775r Monteiro, Keyle Borges e Silva.
Remoção do herbicida atrazina por fungos de decomposição branca [manuscrito] / Keyle Borges e Silva Monteiro. - 2013.
137 f. : il., figs., tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mariângela Fontes Santiago.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Engenharia Civil, 2013.
Bibliografia.
Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.
Apêndices.

1. Biorremediação. 2. Atrazina. 3. Enzimas ligninolíticas. I. Título.

CDU: 628.168.4:579.6

KEYLE BORGES E SILVA MONTEIRO

**REMOÇÃO DO HERBICIDA ATRAZINA POR FUNGOS DE
DECOMPOSIÇÃO BRANCA**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Meio Ambiente no Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia do Meio Ambiente da Escola de Engenharia Civil da Universidade Federal de Goiás, aprovada em 12 de agosto de 2013, pela seguinte Banca Examinadora:



Profa. Dra. Mariângela Fontes Santiago – Universidade Federal de Goiás

Presidente da Banca



Prof. Dr. Rogério de Araújo Almeida - UFG

Examinador Interno



Prof. Dr. Alexandre Nunes Ponezi - UNICAMP

Examinador Externo

A Deus, o grande responsável por esta vitória e por renovar diariamente minhas forças para concluir este trabalho.

Aos meus pais, irmãos e familiares, pela dedicação, persistência e entusiasmo que me impulsionaram a seguir em frente, minha eterna gratidão.

Aos meus filhos, Beatriz e Arthur, fontes de inspiração para continuar caminhando com coragem, pelo carinho, compreensão e apoio nas horas difíceis.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Goiás - UFG, por meio do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia do Meio Ambiente (PPGEMA), possibilitou a realização deste Mestrado que muito contribuiu para minha qualificação profissional.

À Faculdade de Farmácia - UFG, em especial ao Laboratório de Enzimologia e Biocatálise Ambiental, pela contribuição técnica na realização dos experimentos.

À Saneamento de Goiás S/A - SANEAGO, pelo incentivo ao desenvolvimento intelectual e disponibilização dos recursos necessários à realização da pesquisa, que seria impossível sem esse apoio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pela concessão de ajuda financeira.

À Professora Dra. Mariângela Fontes Santiago pela orientação, incentivo, confiança e companheirismo.

Aos demais Professores do PPGEMA, pelo conhecimento transmitido durante o Mestrado.

À Djanir do Espírito Santo, Supervisora do Laboratório Central de Análise de Água da SANEAGO, amiga e companheira, pela oportunidade, apoio, incentivo e compreensão.

À equipe da Supervisão do Laboratório de Água (P-SLA), pela paciência e contribuição diária, citados por ordem alfabética para evitar injustiças: Alessandra, Aline, Caio, Daniel, Elaine Cristine, Elaine Ribeiro, Fabíola, José Vieira, Karla, Leonardo, Márcia Rejane, Meyre Lúcia, Patrícia Keller, Patrícia Pimentel, Rafaela, Selma, Sílvia Maísa, Sílvia Moreira, Tereza e demais colegas, que de forma direta ou indireta contribuíram muito para que eu pudesse concluir o trabalho.

Ao amigo biólogo Carlos Roberto dos Santos, pelo incentivo e por toda a ajuda nas análises estatísticas.

Às amigas e colegas da SANEAGO, Wilma Gomes da Silva Carmo e Luciana de Souza Melo Machado, pela amizade e contribuição, cujo apoio foi fundamental para o exame de qualificação.

À amiga Patrícia Flávia R. de Moraes, pelo apoio em tantos momentos, pelas orações, amizade, incentivo e torcida.

À Professora Livia Maria Gonzaga Monteiro, presente em todas as horas e pela contribuição para a melhora deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, obrigada pela disponibilidade e por todas as contribuições apresentadas.

A todos os que, embora não tenham sido nominados, auxiliaram na execução deste trabalho.

RESUMO

MONTEIRO, K. B. S. **Remoção do herbicida atrazina por fungos de decomposição branca**. Dissertação de Mestrado. Engenharia do Meio Ambiente – Escola de Engenharia Civil, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013. 137f.

Diante da deterioração dos recursos hídricos e da crescente necessidade de atender aos padrões de qualidade da água, são necessárias alternativas para a remoção de micropoluentes de ambientes aquáticos. Dentre os micropoluentes, destaca-se a atrazina (ATZ), herbicida da classe dos triazínicos, classificado como medianamente tóxico para o ser humano e altamente tóxico para organismos aquáticos, além de ser um potente disruptor endócrino e possível agente carcinogênico. Processos biotecnológicos têm sido utilizados para minimizar os efeitos tóxicos dos poluentes para o ser humano e meio ambiente, cuja finalidade é interação entre os micro-organismos e os produtos produzidos por eles, como enzimas. O presente estudo descreve de forma experimental, a remoção da ATZ na concentração de 100 mg.L⁻¹ em meio líquido, utilizando fungos de decomposição branca, com vistas a futuras aplicações em tratamento de águas residuárias ou de abastecimento. Inicialmente, foi testada a tolerância das espécies *Trametes villosa*, *Lentinus edodes*, *Pycnosporus sanguineus*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus* sp., em meio de cultura sólido contendo Batata, Dextrose e Agar (BDA) com variações nutricionais (BDA padrão, BDA 40% e BDA 0%) e atrazina nas concentrações de 100 mg.L⁻¹ e 500 mg.L⁻¹. Posteriormente, foi realizado ensaio com 2,2 –Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6 – ácido sulfônico) diamônia 0,02% (ABTS), para avaliação da produção de enzimas ligninolíticas. Nessas etapas, os micro-organismos apresentaram tolerância à toxicidade da atrazina, cresceram em cada condição nutricional avaliada com redução na velocidade de crescimento na concentração ATZ 500 mg.L⁻¹. A morfologia e o desenvolvimento micelial não foram satisfatórios na baixa concentração de nutrientes (BDA 0%) quando comparados com os meios BDA padrão e BDA 40%. Após o período de 24 horas de cultivo, foi observada atividade enzimática com aparecimento do halo de coloração em torno do inóculo dos micro-organismos em todas as condições avaliadas, exceto as espécies *Lentinus edodes* e *Trametes villosa* que apresentaram atividade após 96 horas, e este último somente em meio de cultivo BDA 0%, na ausência e presença do herbicida, por isso não foram selecionados para os experimentos da degradação da ATZ em meios de cultura líquido. Os maiores índices de remoção foram obtidos com as espécies *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus* sp., no meio BD 40% em condição estática (87,5% e 87,3%), respectivamente. Os menores valores de remoção foram de 47,2% pela espécie *Pycnosporus sanguineus* e 53,8% pelo fungo *Pleurotus* sp. em BD 0%, também na condição estática. A redução da concentração da atrazina foi obtida pela atividade enzimática, com destaque para a lacase e manganês peroxidase, e pelo mecanismo de adsorção na biomassa dos micro-organismos. A concentração da atrazina foi determinada por meio do cromatógrafo gasoso com detector de massa. Os resultados dos estudos com as espécies *Pleurotus* sp., *Pleurotus ostreatus* e *Pycnosporus sanguineus*, sob duas condições (agitação e estática), apresentaram grande potencial para serem utilizados na biorremediação de meios líquidos contaminados com atrazina.

Palavras-chave: biorremediação, atrazina, enzimas ligninolíticas.

ABSTRACT

MONTEIRO, K. B. S. **Removal of herbicide atrazine through rot-white fungi.** Master Dissertation. Environmental Engineering – Civil Engineering School, Federal University of Goiás, 2013. 137 f.

Given the deterioration of water resources and the growing need to meet water quality standards, alternatives to remove micropollutants from aquatic environments have become necessary. Among micropollutants, we highlight atrazine (ATZ), from the class of triazine herbicides, classified as moderately toxic to humans and highly toxic to aquatic organisms, a potent endocrine disruptor and possibly a carcinogenic. Biotechnological processes have been utilized to minimize the toxic effects of pollutants on both humans and the environment, promoting the interaction between micro-organisms and their by-products, such as enzymes. This study aimed to experimentally describe the removal of ATZ from a final concentration of 100 mg.L^{-1} in liquid culture medium, utilizing rot-white fungi as a future contributor in the treatment of wastewater or public water supplies. Initially assessed the tolerance of *Trametes villosa*, *Lentinus edodes*, *Pycnosporus sanguineus*, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus* sp., in PDA (Potato Dextrose Agar) culture with nutritional variations (PDA test standard, PDA 40% and PDA 0%) in the presence of atrazine at a concentration of 100 mg.L^{-1} and above an application value of 500 mg.L^{-1} . Next conducted a test 2.2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium 0.02% (ABTS) to assess the production of ligninolytic enzymes. In these stages, the microorganisms showed both tolerance to atrazine toxicity and growth through each nutritional condition assessed, displaying decrease in growth rate at a concentration of 500 mg.L^{-1} . Morphology and mycelial growth were unsatisfactory at a low nutrient concentration (PDA 0%) when compared with PDA test standard and PDA 40%. Following a 24 hour culture period, enzymatic activity was detected through a colored halo around the microorganisms inoculant across all assessed conditions, except for *Lentinus edodes* and *Trametes villosa*, which showed activity after 96 hours, the latter only in PDA 0% culture in the presence and absence of herbicide, therefore selected for the ATZ degradation experiments in liquid culture medium. *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus* sp. in PDA 40% static condition yielded the highest removal concentration indexes. ATZ concentration decrease was obtained through enzymatic activity, especially that of laccase and manganese peroxidase, by means of adsorption in the biomass of the microorganisms. Atrazine concentration was determined by means of gas chromatography/high resolution mass spectrometry methods. Study results regarding *Pleurotus* sp., *Pleurotus ostreatus* and *Pycnosporus sanguineus*, under two distinct conditions (agitation and statics), showed their great potential in the bioremediation of aquatic environments contaminated by atrazine.

Key words: bioremediation, atrazine, ligninolytic enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural da atrazina	9
Figura 2 - Rota de degradação da atrazina por bactérias	9
Figura 3 - Estrutura química dos principais produtos de degradação da atrazina	10
Figura 4 - Fluxograma simplificado do roteiro utilizado na realização dos experimentos.	18
Figura 5 - Transferência do inóculo da área de crescimento ativo da colônia para o centro da placa contendo o meio de cultivo.	21
Figura 6 - Posições pré-definidas para medidas dos raios de crescimento fúngico.....	23
Figura 7 - Padronização da disposição dos discos retirados de cada espécie de fungo analisado.	24
Figura 8 - Perfil cromatográfico da atrazina.	31
Figura 9 - Curva de calibração da atrazina.	32
Figura 10 – Procedimento da extração da atrazina por meio da técnica SPE, a) cartucho de extração b) suporte com sulfato de sódio.	33
Figura 11- Aspectos morfológicos dos micélios dos fungos no meio de cultura BDA 0% sem adição de atrazina (grupo controle) e com atrazina nas concentrações de 100mg.L ⁻¹ e 500mg.L ⁻¹	36
Figura 12 - Gráfico do crescimento de <i>Trametes villosa</i> com variação dos nutrientes e da concentração da atrazina (ATZ100) e (ATZ 500).	38
Figura 13 – Desenvolvimento micelial do fungo <i>Trametes villosa</i> nos meios de cultivo BDA padrão e BDA 40% na presença da atrazina nas concentrações 100 mg.L ⁻¹ e 500 mg.L ⁻¹	38
Figura 14 - Gráfico do crescimento do micro-organismo <i>Lentinus edodes</i> , com variação dos nutrientes e de atrazina 100 mg.L ⁻¹ e atrazina 500 mg.L ⁻¹	40
Figura 15 - Aspecto morfológico do micélio de <i>Lentinus edodes</i> no 8º dia de cultivo nos meios de cultivo BDA padrão e BDA 40% na presença da atrazina nas concentrações de 100 mg.L ⁻¹ e 500 mg.L ⁻¹	40
Figura 16 - Gráfico do crescimento do micro-organismo <i>Pycnosporus sanguineus</i> , com variação dos nutrientes e de atrazina (ATZ100 e ATZ 500).	41
Figura 17- Aspecto morfológico do micélio do fungo <i>Pycnosporus sanguineus</i> na presença da atrazina 500 mg.L ⁻¹ após 20 dias de cultivo.....	42
Figura 18 - Gráfico do crescimento do <i>Pleurotus ostreatus</i> , com variação dos nutrientes e de atrazina (ATZ100 e ATZ 500).....	43

Figura 19 - Aspecto satisfatório do micélio de <i>Pleurotus ostreatus</i> e limitação do crescimento na presença da atrazina 500 mg.L ⁻¹	44
Figura 20 - Gráfico do crescimento do <i>Pleurotus</i> sp, com variação dos nutrientes e de atrazina (ATZ100 e ATZ 500).	45
Figura 21 - Resultados do crescimento do <i>Pleurotus</i> sp com destaque na presença da ATZ 100 mg.L ⁻¹	45
Figura 22 - Biomassa do fungo <i>Pleurotus</i> sp em meio de cultura BDA 40%	46
Figura 23 - Avaliação da atividade enzimática do <i>Trametes villosa</i> com ABTS 0,02% após 4 dias de cultivo.....	47
Figura 24 - Avaliação da atividade enzimática do <i>Lentinus edodes</i> com ABTS 0,02% após 6 dias de crescimento.....	48
Figura 25 - Avaliação da atividade enzimática do <i>Pycnosporus sanguineus</i> com ABTS 0,02% após 24 horas de cultivo.	50
Figura 26 - Avaliação da atividade enzimática dos fungos <i>Pleurotus ostreatus</i> e <i>Pleurotus</i> sp com ABTS 0,02% após 24 horas de cultivo.....	50
Figura 27 - Avaliação da atividade enzimática do <i>Pycnosporus sanguineus</i> com ABTS 0,02% após 4 dias e 6 dias de cultivo.	51
Figura 28 - Avaliação da atividade enzimática dos fungos <i>Pleurotus ostreatus</i> e <i>Pleurotus</i> sp com ABTS 0,02% após 8 dias.	51
Figura 29 - Aspecto morfológico dos micélios do fungo <i>Pycnosporus sanguineus</i> nas duas condições nutricionais (BD 0% e BD 40%) sem agitação no 12º dia de crescimento.	53
Figura 30 - Biomassa do <i>Pycnosporus sanguineus</i> no meio de cultura BD 0% e BD 40% nas condições estática e sob agitação com adição de atrazina (ATZ100) e sem atrazina (grupo controle).....	54
Figura 31- Atividade enzimática do fungo <i>Pycnosporus sanguineus</i> em condição estática no meio BD 0% sem adição de atrazina (grupo-controle).....	55
Figura 32 - Atividade enzimática do fungo <i>Pycnosporus sanguineus</i> em condição estática no meio BD 0% com ATZ100.....	55
Figura 33 - Produção de MnP pelo <i>Pycnosporus sanguineus</i> no meio BD 0% em condição estática.	56
Figura 34 - Produção de LiP pelo <i>Pycnosporus sanguineus</i> no meio BD 0% em condição estática.	56
Figura 35 - Produção de Lcc pelo <i>Pycnosporus sanguineus</i> no meio BD 0% em condição estática.	56

Figura 36 - Redução da concentração de atrazina por meio do fungo <i>Pycnosporus sanguineus</i> no meio BD 0% em condição estática.	58
Figura 37 – Cromatogramas da atrazina dos experimentos no meio BD 0% sem agitação com o micro-organismo <i>Pycnosporus sanguineus</i>	59
Figura 38 - Atividade enzimática do fungo <i>Pycnosporus sanguineus</i> em condição estática no meio BD 40% sem adição de atrazina (grupo-controle).....	60
Figura 39 - Atividade enzimática do fungo <i>Pycnosporus sanguineus</i> em condição estática no meio BD 40% com ATZ100.....	61
Figura 40 - Produção de Lacase pelo <i>Pycnosporus sanguineus</i> no meio BD 40% em condição estática.	61
Figura 41 - Produção de Manganês peroxidase pelo <i>Pycnosporus sanguineus</i> no meio BD 40% em condição estática.....	62
Figura 42 - Produção de Lignina peroxidase pelo <i>Pycnosporus sanguineus</i> no meio BD 40% em condição estática.	62
Figura 43 - Redução da concentração de atrazina por meio do fungo <i>Pycnosporus sanguineus</i> no meio BD 40% em condição estática.	64
Figura 44 - Atividade enzimática do fungo <i>Pycnosporus sanguineus</i> no meio BD 40% sob agitação – grupo-controle.	65
Figura 45 - Atividade enzimática do fungo <i>Pycnosporus sanguineus</i> no meio BD 40% sob agitação com adição de ATZ 100.	65
Figura 46 - Produção de Lacase pelo <i>Pycnosporus sanguineus</i> em meio BD 40% sob agitação.....	66
Figura 47 - Produção de Manganês peroxidase pelo <i>Pycnosporus sanguineus</i> em meio BD 40% sob agitação.	66
Figura 48 - Produção de Lignina peroxidase pelo <i>Pycnosporus sanguineus</i> em meio BD 40% sob agitação.	67
Figura 49 – Cromatograma da atrazina do grupo (CT) após 21 dias de cultivo no meio BD 40% sob agitação	68
Figura 50 - Redução da concentração de atrazina por meio do fungo <i>Pycnosporus sanguineus</i> no meio BD 40% sob agitação.....	68
Figura 51 - Biomassa do <i>Pleurotus ostreatus</i> no meio de cultura BD 0% e BD40% nas condições estática e sob agitação com adição de atrazina (ATZ100) e sem atrazina (controle).	69
Figura 52 - Atividade enzimática do fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> no meio BD 0% em condição estática (grupo-controle).....	70

Figura 53 - Atividade enzimática do fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> no meio BD 0% com ATZ 100	71
Figura 54 - Produção de Lacase pelo <i>Pleurotus ostreatus</i> no meio BD 0% em condição estática.	71
Figura 55 - Produção da enzima MnP pelo <i>Pleurotus ostreatus</i> no meio BD 0% em condição estática.	71
Figura 56 - Produção da enzima LiP pelo <i>Pleurotus ostreatus</i> no meio BD 0% em condição estática.	72
Figura 57- Redução da concentração de atrazina por meio do fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> no meio BD 0% na condição estática.	73
Figura 58 - Atividade enzimática do fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> no meio BD 40% em condição estática (grupo-controle).	74
Figura 59 - Atividade enzimática do fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> no meio BD 40% em condição estática com ATZ 100.	74
Figura 60 - Produção de Lacase pelo <i>Pleurotus ostreatus</i> no meio BD 40% em condição estática.	75
Figura 61 - Produção de MnP pelo <i>Pleurotus ostreatus</i> no meio BD 40% em condição estática.	75
Figura 62 - Produção de LiP pelo <i>Pleurotus ostreatus</i> no meio BD 40% em condição estática.	76
Figura 63 - Redução da concentração de atrazina por meio do fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> no meio BD 40% na condição estática.	77
Figura 64- Cromatograma da atrazina no tempo (T0) do grupo CTe grupo experimental e no final do período de incubação no meio BD 40% em condição estática com o fungo <i>Pleurotus ostreatus</i>	78
Figura 65- Atividade enzimática do fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> no meio BD 40% sob agitação (grupo-controle).	79
Figura 66 - Atividade enzimática do fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> no meio BD 40% sob agitação com atrazina 100 mg.L ⁻¹	79
Figura 67 - Produção de Lacase pelo <i>Pleurotus ostreatus</i> em BD 40% sob agitação.	80
Figura 68 - Produção de Manganês peroxidase pelo <i>Pleurotus ostreatus</i> em meio BD 40% sob agitação.	81
Figura 69 - Produção de Lignina peroxidase pelo <i>Pleurotus ostreatus</i> em meio BD 40% sob agitação.	81

Figura 70 - Redução da concentração de atrazina por meio do fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> no meio BD 40% sob agitação.....	82
Figura 71- Cromatograma da atrazina no tempo (T0) do grupo CTe grupo experimental e no final do período de incubação no meio BD 40% sob agitação com o fungo <i>Pleurotus ostreatus</i>	83
Figura 72- Biomassa do <i>Pleurotus</i> sp nos meios de cultura BD 0% e BD40% nas condições estática e sob agitação com adição de atrazina (ATZ100) e sem atrazina (controle).	84
Figura 73 - Biomassa do <i>Pleurotus</i> sp no meio de cultura BD 40% em condição estática após 18 dias de cultivo.	84
Figura 74 - Atividade enzimática do fungo <i>Pleurotus</i> sp no meio BD 0% em condição estática (grupo-controle).	85
Figura 75 - Atividade enzimática do fungo <i>Pleurotus</i> sp no meio BD 0% em condição estática com atrazina 100 mg.L ⁻¹	86
Figura 76- Produção de Lacase pelo <i>Pleurotus</i> sp no meio BD 0% em condição estática.....	87
Figura 77 - Produção de Manganês peroxidase pelo <i>Pleurotus</i> sp no meio BD 0% em condição estática.	87
Figura 78 - Produção de Lignina peroxidase pelo <i>Pleurotus</i> sp no meio BD 0% em condição estática.	87
Figura 79 - Redução da concentração de atrazina por meio do fungo <i>Pleurotus</i> sp no meio BD 0% em condição estática.....	89
Figura 80- Cromatograma da atrazina do grupo CTe grupo experimental no primeiro dia de inoculação (T0) no meio BD 0% em condição estática com o micro-organismo <i>Pleurotus</i> sp.	89
Figura 81 - Atividade enzimática do fungo <i>Pleurotus</i> sp no meio BD 40% em condição estática (grupo- controle).	91
Figura 82 - Atividade enzimática do fungo <i>Pleurotus</i> sp no meio BD 40% em condição estática com ATZ 100.....	91
Figura 83- Produção de Lacase pelo <i>Pleurotus</i> sp no meio BD 40% em condição estática.....	91
Figura 84 - Produção de Manganês peroxidase pelo <i>Pleurotus</i> sp no meio BD 40% em condição estática.	92
Figura 85 - Produção de Lignina peroxidase pelo <i>Pleurotus</i> sp no meio BD 40% em condição estática.	92
Figura 86 - Redução da concentração de atrazina por meio do fungo <i>Pleurotus</i> sp no meio BD 40% em condição estática.....	93

Figura 87 - Cromatograma da atrazina do grupo CTe grupo experimental no primeiro e último dia de inoculação (T0) no meio BD 40% em condição estática com o micro-organismo <i>Pleurotus</i> sp.	94
Figura 88- Atividade enzimática do fungo <i>Pleurotus</i> sp no meio BD 40% sob agitação (grupo-controle).	95
Figura 89 - Atividade enzimática do fungo <i>Pleurotus</i> sp no meio BD 40% sob agitação com ATZ 100.	95
Figura 90 - Produção de Lacase pelo <i>Pleurotus</i> sp no meio BD 40% sob agitação.	96
Figura 91 - Produção de Manganês peroxidase pelo <i>Pleurotus</i> sp no meio BD 40% sob agitação.	96
Figura 92 - Produção de Lignina peroxidase pelo <i>Pleurotus</i> sp no meio BD 40% sob agitação.	97
Figura 93 - Redução da concentração de atrazina por meio do fungo <i>Pleurotus</i> sp no meio BD 40% sob agitação.	98
Figura 94 - Cromatograma da atrazina do grupo CTe grupo experimental no primeiro e último dia de inoculação (T0) no meio BD 40% sob agitação com o micro-organismo <i>Pleurotus</i> sp.	99
Figura 95 - Relação entre a produção de enzima lacase (U.mL^{-1}) e a biomassa (g).....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Crescimento e morfologia dos fungos submetidos a diferentes condições nutricionais na presença da atrazina (ATZ 100 e ATZ 500) e na ausência da atrazina (controle).	34
Tabela 2 - Concentração de atrazina do grupo controle de toxicidade (CT) no meio de cultura Batata Dextrose 0% em condição estática.....	57
Tabela 3 - Concentração de atrazina no experimento com o fungo <i>Pycnosporus sanguineus</i> (Ps) no meio de cultura Batata Dextrose 0% em condição estática.....	58
Tabela 4 - Concentração de atrazina do grupo Controle de Toxicidade (CT) no meio de cultura BD 40% em condição estática.	63
Tabela 5 - Concentração de atrazina no experimento com o fungo <i>Pycnosporus sanguineus</i> no meio de cultura Batata Dextrose 40 em condição estática	63
Tabela 6 - Concentração de atrazina no grupo Controle de Toxicidade (CT) no meio de cultura BD 40% sob agitação.....	67
Tabela 7 - Concentração de atrazina no experimento com o fungo <i>Pycnosporus sanguineus</i> no meio de cultura BD 40% sob agitação.....	68
Tabela 8 - Concentração de atrazina no experimento com o fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> no meio de cultura (BD 0%) em condição estática.....	73
Tabela 9 - Concentração de atrazina no experimento com o fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> no meio de cultura BD 40% em condição estática	77
Tabela 10 - Concentração de atrazina no experimento com o fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> no meio de cultura BD 40% sob agitação.....	82
Tabela 11 - Concentração de atrazina no experimento com o fungo <i>Pleurotus</i> sp no meio de cultura BD 0% em condição estática.	88
Tabela 12 - Concentração de atrazina no experimento com o fungo <i>Pleurotus</i> sp no meio de cultura BD 40% em condição estática	93
Tabela 13 - Concentração de atrazina no experimento com o fungo <i>Pleurotus</i> sp no meio de cultura Batata Dextrose 40% em condição agitação.....	98
Tabela 14 - Valores máximos dos resultados obtidos nos experimentos em meio de cultura líquido com e sem agitação.	100
Tabela 15 - Matriz de correlação de Pearson entre a biomassa das espécies dos fungos selecionados para o estudo e a produção de enzimas, em negrito correlação significativa ($p < 0,05$)......	101

Tabela 16 - Matriz das probabilidades (p) do teste T ($p < 0,05$ -significativo) entre os percentuais de remoção total e por adsorção de Atrazina.....	102
Tabela 17 - Matriz das probabilidades (p) do teste F ($p < 0,05$ – significativo) entre os percentuais de remoção total e por adsorção de Atrazina.....	102
Tabela 18 - Matriz de probabilidade (p) teste T e F ($p < 0,05$ -significativo) entre a produção de enzimas. Em negrito relação significativa ($p < 0,05$). Onde: Lcc ,LiP e MnP- enzimas produzidas pelos espécimes deste estudo.	103

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Propriedades físico-químicas e informações ecológicas da atrazina.....	12
QUADRO 2 - Micro-organismos utilizados na Pesquisa.....	19
QUADRO 3 - Composição dos meios de cultura sólido e líquido.....	20
QUADRO 4 - Codificação dos experimentos para rastreabilidade dos dados	26
QUADRO 5 - Parâmetros e variáveis inseridas no cromatógrafo para detecção da concentração de ATZ.....	30
QUADRO 6 - Parâmetros e variáveis do detector de massas para detecção da concentração de ATZ.	31

APÊNDICE A

Tabela A 1- Resultados do teste de adsorção do *Pycnosporus sanguineus* nos meios (BD 0% e BD 40%) na condição estática e agitação 115

Tabela A 2 - Resultados do teste de adsorção do *Pleurotus ostreatus* nos meios (BD 0% e BD 40%) na condição estática e agitação 115

Tabela A 3 - Resultados do teste de adsorção do *Pleurotus* sp nos meios (BD 0% e BD 40%) na condição estática e agitação 116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABRASCO	Associação Brasileira de Saúde Coletiva
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ABTS	2,2 –Azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6 – ácido sulfônico) diamônia
ATZ	Atrazina
ATZ 100	Atrazina 100 mg.L ⁻¹
ATZ 500	Atrazina 500 mg.L ⁻¹
BDA	Batata, Dextrose e Ágar
BPL	Boas Práticas de Laboratório
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CE	Controle do Experimento
CT	Controle da Toxicidade
CV	Coeficiente de Variação
EPI	Equipamento de Proteção Individual
FF	Faculdade de Farmácia
FISPQ	Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
Lcc	Lacase
Le	<i>Lentinus edodes</i>
LiP	Lignina peroxidase
LMR	Limite Máximo Residual
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MnP	Manganês peroxidase
pH	Potencial hidrogeniônico
PPGEMA	Programa de Pós-graduação <i>Stricto Sensu</i> em Engenharia do Meio Ambiente
P-SLA	Supervisão do Laboratório de Água
Ps	<i>Pycnoporus sanguineus</i>
Pl sp	<i>Pleurotus</i> sp.
Pl os	<i>Pleurotus ostreatus</i>
qsp	Quantidade suficiente para

rpm	Rotação por minuto
SANEAGO	Saneamento do Estado de Goiás S.A.
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
Tvi	<i>Trametes villosa</i>
UFG	Universidade Federal de Goiás
UNICA	União da Indústria de Cana-de-Açúcar
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 JUSTIFICATIVA	3
3 OBJETIVOS	5
3.1 OBJETIVO GERAL.....	5
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
4.1 USO DE AGROTÓXICOS E CONTAMINAÇÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS	6
4.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO HERBICIDA ATRAZINA	8
4.3 BIORREMEDIAÇÃO.....	13
4.4 APLICAÇÃO DOS FUNGOS DE DECOMPOSIÇÃO BRANCA EM BIORREMEDIAÇÃO	15
5 MATERIAL E MÉTODOS	17
5.1 MICRO-ORGANISMOS	19
5.2 MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS DURANTE OS EXPERIMENTOS	19
5.3 MANUTENÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS.....	20
5.4 PREPARO DA SOLUÇÃO DE ATRAZINA.....	21
5.5 EXPERIMENTOS EM MEIO DE CULTURA SÓLIDO – ETAPA 01.....	22
5.6 EXPERIMENTOS EM MEIO DE CULTURA SÓLIDO COM ABTS 0,02% - ETAPA 2.....	23
5.7 EXPERIMENTOS EM MEIO DE CULTURA LÍQUIDO EM CONDIÇÃO ESTÁTICA – ETAPA 03.....	24
5.7.1 Determinação da Biomassa.....	27
5.7.2 Teste de adsorção	27
5.8 EXPERIMENTOS EM MEIO DE CULTURA LÍQUIDO COM AGITAÇÃO – ETAPA 04.....	28
5.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA NOS EXPERIMENTOS EM MEIO DE CULTURA LÍQUIDO NA CONDIÇÃO ESTÁTICA E COM AGITAÇÃO	28

5.10 QUANTIFICAÇÃO DA ATRAZINA	30
5.11 EXTRAÇÃO DA ATRAZINA EM FASE SÓLIDA.....	32
5.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	33
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6.1 EXPERIMENTOS EM MEIO DE CULTURA SÓLIDO – ETAPA 01.....	34
6.1.1 Resultados dos experimentos com o fungo <i>Trametes villosa</i>.....	37
6.1.2 Resultados dos experimentos com o fungo <i>Lentinus edodes</i>.....	39
6.1.3 Resultados dos experimentos com o fungo <i>Pycnosporus sanguineus</i>.....	41
6.1.4 Resultados dos experimentos com o fungo <i>Pleurotus ostreatus</i>.....	43
6.1.5 Resultados dos experimentos com o fungo <i>Pleurotus</i> sp.....	44
6.2 EXPERIMENTOS EM MEIO DE CULTURA SÓLIDO COM ABTS 0,02% - ETAPA 02.....	46
6.2.1 Avaliação da atividade enzimática dos fungos <i>Trametes villosa</i> e <i>Lentinus edodes</i>.....	47
6.2.2 Avaliação da atividade enzimática dos fungos <i>Pycnosporus sanguineus</i>, <i>Pleurotus ostreatus</i> e <i>Pleurotus</i> sp	48
6.3 EXPERIMENTOS EM MEIO DE CULTURA LÍQUIDO NA CONDIÇÃO ESTÁTICA E SOB AGITAÇÃO - ETAPAS 03 E 04	52
6.3.1 Resultados do micro-organismo <i>Pycnosporus sanguineus</i>.....	52
6.3.2 Resultados do micro-organismo <i>Pleurotus ostreatus</i>.....	69
6.3.3 Resultados do micro-organismo <i>Pleurotus</i> sp	83
6.4 CORRELAÇÃO ENTRE AS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS NO EXPERIMENTO EM MEIO DE CULTURA LÍQUIDO COM E SEM AGITAÇÃO.....	99
7 CONCLUSÕES.....	104
8 RECOMENDAÇÕES.....	105
9 REFERÊNCIAS.....	106

1 INTRODUÇÃO

Devido aos crescimentos demográfico e socioeconômico ocorridos nas últimas décadas, os índices de poluição dos recursos hídricos têm aumentado, ocasionando perda da qualidade da água no que tange aos parâmetros físicos, químicos e bacteriológicos.

A contaminação das águas superficiais e subterrâneas por xenobióticos tem sido um dos grandes problemas da sociedade moderna e motivo de preocupação crescente devido aos riscos que tais compostos representam à biota e ao ser humano, em razão de seus efeitos deletérios associados (MINILLO et al., 2009; PEREIRA; FREITAS, 2012).

A presença de contaminantes na água pode causar sérios problemas à saúde, dependendo da sua toxicidade, podem causar graves perturbações a curto prazo. Além dos efeitos imediatos, como intoxicação e morte, os efeitos crônicos podem ocorrer meses, anos ou até décadas após a exposição, manifestando-se em várias doenças como cânceres, malformações congênitas, distúrbios endócrinos e neurológicos (RANGEL; ROSA; SARCINELLI, 2011; CARNEIRO et al., 2012;).

Os principais poluentes encontrados nos corpos hídricos são provenientes de ações antrópicas na agricultura, indústria e pecuária, os quais podem restringir o uso múltiplo, principalmente como matéria-prima na produção de água para consumo humano, manutenção da vida aquática, dessedentação de animais e lazer (PHILIPPI JR, 2005).

Entre as atividades responsáveis pela poluição destacam-se as práticas agrícolas, pela aplicação intensiva de agrotóxicos e fertilizantes (PALMA et al., 2009), segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Observatório da Indústria dos Agrotóxicos, divulgados no 2º Seminário sobre Mercado de Agrotóxicos e Regulação, realizado em Brasília (DF), em abril de 2012, informam que nos últimos dez anos o mercado mundial de agrotóxicos aumentou 93% e o mercado brasileiro em 190%. Em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior consumidor mundial de agrotóxicos, sendo que, dos produtos comercializados, cerca de 45% são herbicidas (ANVISA; UFPr, 2012).

Os herbicidas são compostos orgânicos, quimicamente sintetizados, utilizados para controle de plantas daninhas. Ambientalmente, são classificados como micropoluentes (JAVARONI; LANDGRAF; REZENDE, 1998).

Inúmeros estudos têm identificado problemas de poluição dos corpos hídricos decorrentes a lixiviação dos herbicidas, entre eles a atrazina, frequentemente detectada como principal poluente orgânico das águas superficiais, subterrâneas e de abastecimento público de

diversos países (OLIVEIRA; KOSKINEN; FERREIRA,2000; CORREIA; LANGENBACH, 2006; ROCHA, 2011).

A atrazina faz parte da família das triazinas, amplamente utilizada há mais de 45 anos em vários países, como Argentina, Estados Unidos e Brasil para controle de plantas daninhas em lavouras de milho, sorgo e cana-de-açúcar. A escolha para sua utilização se dá a sua efetividade, ação prolongada, amplo espectro de ação e baixo custo (LIMA et al., 2012).

Este herbicida é altamente tóxico para organismos aquáticos, atua como um potente disruptor endócrino e possível agente carcinogênico (HAYES et al., 2010), por isso é exigência legal o monitoramento da quantidade de atrazina na água bruta e tratada.

No Brasil, a norma que determina o padrão de potabilidade da água para consumo humano é a Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011, do Ministério da Saúde, que estabeleceu uma concentração máxima para atrazina de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ (BRASIL, 2011).

O Ministério do Meio Ambiente também exige o monitoramento da atrazina nos mananciais de superfície, pela Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente nº 357, de 17 de março de 2005 (CONAMA, 2005) e dos mananciais subterrâneos pela Resolução nº 396, de abril de 2008 (CONAMA, 2008), estabelecendo também os valores máximos de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$. Além disso, a legislação determina que os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados nos corpos de água, após o devido tratamento para não causar efeitos tóxicos.

Segundo Tundisi e Tundisi (2006), há uma necessidade de reversão do quadro atual de poluição dos corpos de água para níveis compatíveis com a sustentabilidade, em curto, médio e longo prazos, e esta ação deve ser urgente, tanto para os grandes centros urbanos como para o meio rural, tendo em vista o uso intensivo e desordenado de insumos químicos na agricultura e a expansão urbana e industrial.

A busca de soluções para remoção dos micropoluentes é um desafio atual e para futuras gerações, uma vez que os tratamentos convencionais utilizados para obter água dentro dos padrões de potabilidade nem sempre são eficientes na remoção de compostos orgânicos (BATALHA, 2009). Muitas vezes é necessário o uso de tratamentos avançados do ponto de vista tecnológico, aplicação de novos produtos químicos ou novas dosagens para obter resultados satisfatórios, tornando o processo produtivo oneroso e impraticável.

Nesse contexto, é necessário encontrar alternativas simples, ecologicamente mais adequadas e eficazes para o tratamento de águas contaminadas com moléculas orgânicas de difícil degradação (PEREIRA; FREITAS, 2012).

A biorremediação é uma alternativa tecnológica promissora para redução ou até remoção de poluentes de ambientes contaminados. A utilização de fungos para fins biotecnológicos oferece bons resultados, por serem decompositores por excelência e serem considerados principais micro-organismos degradadores da matéria orgânica na natureza (GUIMARÃES, 2009; JARDIM, 2010).

Dentre os fungos, os basidiomicetos, principalmente os fungos de decomposição branca, tem-se tornado um grupo interessante para utilização em biorremediação de compostos recalcitrantes em função da capacidade de produzir quantidades significativas de enzimas ligninolíticas, responsáveis na degradação da lignina, bem como na biorremediação de xenobióticos (GIMENES, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

A contaminação de águas superficiais e subterrâneas representa um problema socioambiental, pois o potencial hídrico de abastecimento público pode ser inutilizado e provocar danos aos seres vivos e ao ecossistema como um todo.

Segundo Finotti et al., (2009), a baixa qualidade da água dos recursos hídricos é uma consequência que pode ser observada em praticamente todas as cidades do Brasil. No último século houve um aumento da população urbana brasileira, cujo crescimento se deu de forma desordenada, com isso provocando aumento na geração de resíduos sólidos, esgotos domésticos e industriais, bem como aumento das atividades agropecuárias.

Diante da constante deterioração dos recursos hídricos por compostos orgânicos e da crescente necessidade de atender aos padrões de qualidade da água, cada vez mais exigentes pelas legislações, são necessárias várias alternativas para remoção de poluentes das águas superficiais, subterrâneas e residuárias.

Diversas técnicas físicas, químicas e biológicas vêm sendo desenvolvidas com a finalidade de transformar os poluentes presentes nas águas em produtos menos tóxicos para o meio ambiente e para o ser humano. O ideal é que essas técnicas sejam simples para serem implementadas em escala industrial a um custo técnico e econômico viável (GALVÍN et al., 2005).

Dentre as técnicas desenvolvidas, a aplicação de processos biotecnológicos envolvendo, conjuntamente, micro-organismos e/ou enzimas, com o objetivo de solucionar ou

minorar problemas de poluição ambiental, tem se tornado crescente (OLIVEIRA et al., 2008). Esta técnica também chamada de biorremediação vem se destacando como uma alternativa viável, promissora (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

A potencialidade de se empregar fungos para o tratamento de substâncias persistentes está relacionada à produção de grande número de enzimas extracelulares e à capacidade desses micro-organismos de suportar mudanças bruscas na contaminação de matéria orgânica, tolerar grandes variações de pH e de temperatura e se adequar a variações e escassez de umidade e de oxigênio, demonstrando que são indicadores da viabilidade do processo de tratamento com reatores fúngicos (RODRIGUES, 2006).

Pesquisadores têm demonstrado que a atrazina tem efeitos tóxicos em algas, plantas aquáticas, anfíbios, peixes e mamíferos. Devido à toxicidade e à persistência da atrazina no ambiente, a busca de linhagens microbianas capazes de degradá-la é fundamental para o desenvolvimento de processos de biorremediação, como uma ferramenta corretiva para solucionar problemas decorridos do uso irracional de agrotóxicos (GONZÁLEZ et al., 2003).

Diante deste contexto, a utilização da biorremediação para remoção de atrazina no meio líquido, por meio de fungos de decomposição branca, pode ser uma alternativa viável, podendo contribuir e complementar os processos biotecnológicos disponíveis para o tratamento de águas superficiais, subterrâneas e residuárias.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi o estudo da remoção da atrazina de meio líquido por meio de fungos de decomposição branca, avaliando a eficiência na redução da concentração do herbicida, com vistas a futuras aplicações em tratamento de águas residuárias ou de abastecimento.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A) Avaliar a tolerância dos fungos *Trametes villosa*, *Pycnosporus sanguineus*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus* sp., quanto à presença do herbicida atrazina em diferentes meios de cultivo sólido;

B) Avaliar e selecionar os fungos *Trametes villosa*, *Pycnosporus sanguineus*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus* sp., quanto à capacidade de produção enzimática na presença de atrazina;

C) A partir dos estudos de tolerância e avaliação da capacidade de produção de enzimas na presença da atrazina, monitorar a produção de Lcc, MnP e LiP, nas fases de crescimento dos fungos, em meio de cultura líquido, em condição estática e agitação;

D) Determinar as concentrações de atrazina nas fases de crescimento dos fungos em meio líquido e quantificar o percentual de sua remoção em condição estática e com agitação.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item serão abordados os temas: (1) Uso de agrotóxicos e contaminação dos recursos hídricos, (2) Características gerais e propriedades físico-químicas do herbicida atrazina (3) Biorremediação (4) Aplicação dos fungos de decomposição branca em biorremediação, dando ênfase à importância da pesquisa na área de saneamento no que diz respeito à necessidade de remoção de micropoluentes das águas.

4.1 USO DE AGROTÓXICOS E CONTAMINAÇÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS

Com o objetivo de aumentar a produção de alimentos, a partir dos anos 60, foi introduzido o uso intensivo de agrotóxicos: herbicidas, bactericidas, fungicidas, acaricidas, parasitocidas, inseticidas etc. O emprego desses agentes químicos resultou em produtividade, porém trouxe consequências adversas ao homem e ao meio ambiente (UETA et al., 1999).

De acordo com o Decreto 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei 7802/1989 (Lei dos Agrotóxicos), agrotóxicos são produtos e agentes de processos físico-químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las das ações danosas de seres vivos considerados nocivos (BRASIL, 2002).

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (2003), o uso de agrotóxicos está entre os principais instrumentos do atual modelo de desenvolvimento da agricultura brasileira; em consequência, com o aumento do volume de vendas e devido aos efeitos adversos que podem causar, aumenta a preocupação com a exposição humana e ambiental a esses produtos.

Segundo Carneiro et al. (2012) o consumo médio de agrotóxicos vem aumentando em relação à área plantada. No Brasil, na safra de 2011, foram plantados 71 milhões de hectares de lavoura de soja, milho, algodão, café, cítricos, frutas, eucaliptos, o que corresponde aproximadamente 853 milhões de litros de agrotóxicos pulverizados nessas culturas, representando uma média de 12 litros/hectare e exposição média ambiental/ocupacional/alimentar de 4,5 litros de agrotóxicos por habitante (IBGE, 2012).

Na safra 2010/2011, o mercado nacional de vendas de agrotóxicos movimentou 936 mil toneladas de produtos. Os herbicidas representaram a maior parte dos produtos utilizados, cerca de 45% do total de agrotóxicos comercializados (CARNEIRO et al., 2012).

Segundo a Associação Brasileira de Saúde Coletiva, a cana-de-açúcar também teve aumento importante da área plantada e continua em expansão progressiva no Brasil, principalmente nos Estados de Mato Grosso do Sul, Goiás, Espírito Santo, Bahia, Mato Grosso e Minas Gerais (CONAB, 2012). O Estado de Goiás está em terceiro lugar no cenário nacional em quantidade de usinas de álcool instaladas (CONAB, 2007; CONAB, 2008).

A expansão da cultura de cana-de-açúcar no País foi ocasionada principalmente pelo advento do Programa Nacional do Alcool - PROALCOOL, criado pelo Governo Federal por meio do Decreto 76.593, de 14/11/1975 (BRASIL, 1975). Em poucos anos, as áreas plantadas apresentaram um crescimento expressivo, visando ao atendimento das necessidades do mercado interno e externo e da política de combustíveis automotivos, determinando importantes mudanças no que se refere ao aspecto agroambiental e aumento do uso de herbicidas para controle das ervas daninhas e limpeza do terreno para plantio (AGUIAR, 2008).

Além da expansão da agricultura, outros fatores também têm contribuído para o aumento do uso de agrotóxicos no Brasil: resistência crescente das pragas e o surgimento de novas, uso de tecnologias no campo, redução dos preços, políticas governamentais de incentivo ao aumento da produtividade agrícola, falta de orientação sobre o uso correto dos produtos, eficiência da política de venda das indústrias produtoras entre outros (LONDRES, 2011).

A importância do uso de agrotóxicos na agricultura é indiscutível por fazer parte dos insumos básicos. Portanto, é fundamental a utilização de forma adequada para preservação da qualidade do produto cultivado e dos recursos naturais (ROCHA, 2011).

As atividades agrícolas apresentam alto risco de contaminação dos sistemas aquáticos, devido a mobilização dos sedimentos, nutrientes e agrotóxicos pelo escoamento superficial, provocando problemas ao suprimento de água potável por afetar a qualidade das águas superficiais e lençóis freáticos (GAMA; OLIVEIRA; CAVALCANTE, 2013).

A proteção das águas subterrâneas constitui uma prioridade da Política Ambiental da União Européia, pois uma vez contaminada, seu tratamento torna-se mais difícil do que o tratamento das águas superficiais e as consequências podem durar décadas, colocando em risco a saúde humana e o desenvolvimento das atividades na indústria e agricultura (SILVA et al., 2012).

A utilização dos agrotóxicos de forma sustentável ou substituição por compostos menos tóxicos para o meio biótico e abiótico devem ser considerados como importantes medidas de mitigação para reduzir os impactos ambientais no solo e água (SILVA et al., 2010).

No Brasil, o uso de agrotóxicos é regido pela Lei nº 7.082/1989, o cumprimento da mesma pelos fabricantes, comerciantes, órgãos fiscalizadores e agricultores, pode minimizar consideravelmente os danos por eles causados (LONDRES, 2011).

O Brasil ocupa posição de destaque no mercado mundial de agrotóxicos, sendo que o consumo de herbicidas corresponde à quase metade do volume total de vendas (PINHO et al., 2004). Dentro desse cenário, a atrazina é um herbicida bastante utilizado, principalmente, no controle de plantas daninhas associadas à cultura do milho (PEIXOTO et al., 2000).

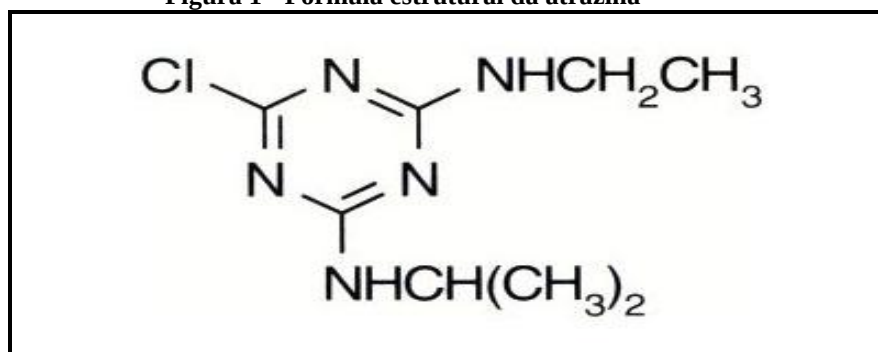
4.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO HERBICIDA ATRAZINA

A atrazina, herbicida da classe dos triazínicos, utilizada pela primeira vez em 1953, sob a forma de suspensão concentrada, é usada intensivamente no controle de plantas daninhas, tanto em aplicação de pré-emergência, logo após o plantio, como em pós-emergência, atua na inibição da fotossíntese (CAMARGO; BISPO; SENE, 2011).

É um produto registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento MAPA, conforme a Lei nº. 7.802, de 11 julho de 1989. Autorizado para uso agrícola na aplicação das plantas infestantes nas culturas de abacaxi, cana-de-açúcar, milho, pinus, seringueira, sisal e sorgo, pelo Decreto lei 98.816 de 11/01/1990, é utilizado principalmente nas culturas de milho e de cana-de-açúcar (MENEZES et al., 2012).

Seu nome químico é 6-chloro-N₂-ethyl-N₄-isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine, a fórmula bruta C₈H₁₄ClN₅, (BRASIL, 1985). A molécula é formada por um anel aromático heterocíclico clorado e N-alquilado tornando uma molécula de difícil degradação no ambiente, cuja estrutura química está apresentada na Figura 1.

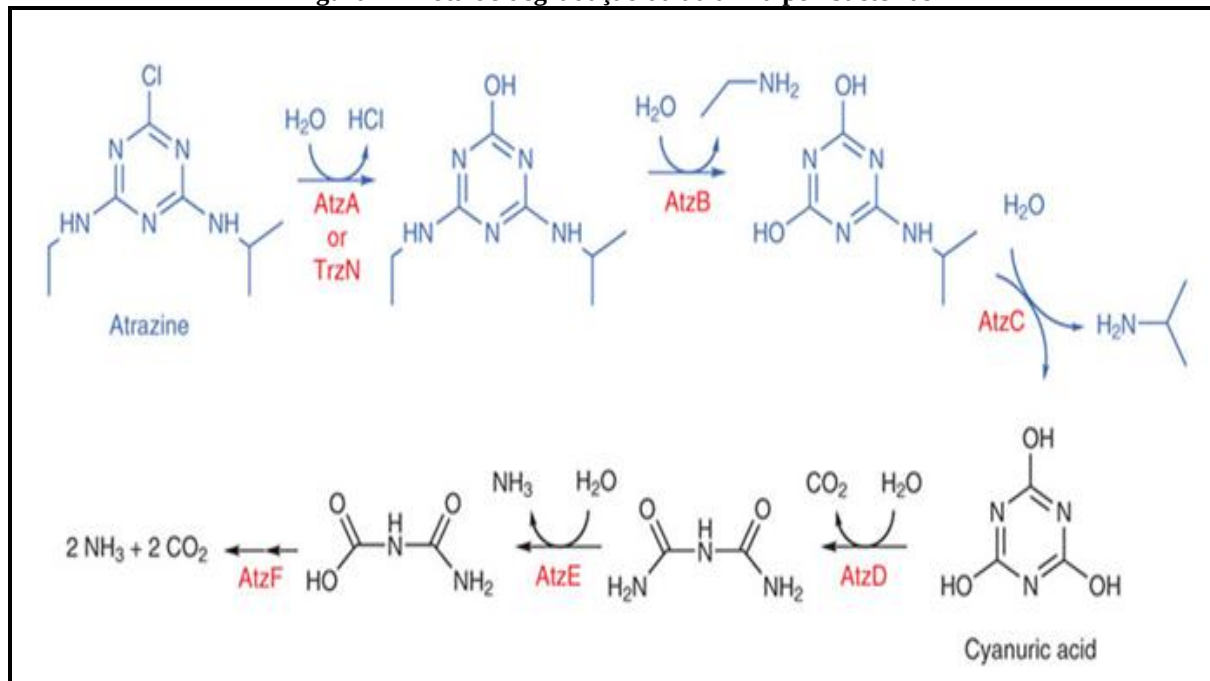
Figura 1 - Fórmula estrutural da atrazina



Fonte: [www.anvisa.gov.br/agrotóxicos e toxicologia/ monografias de agrotóxicos/A14](http://www.anvisa.gov.br/agrotóxicos_e_toxicologia/monografias_de_agrotóxicos/A14), 2012.

A degradação e mineralização da atrazina podem ocorrer por processos físico-químicos ou bioquímicos. Alguns micro-organismo, incluindo diversas bactérias como espécies de *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e agrobactérias têm demonstrado habilidade em biodegradar parcial ou totalmente a molécula, levando à formação de NH_3 e CO_2 (BOUQUARD et al., 1997; UETA et al., 1999). A Figura 2 apresenta a rota de degradação da atrazina por bactérias.

Figura 2 - Rota de degradação da atrazina por bactérias

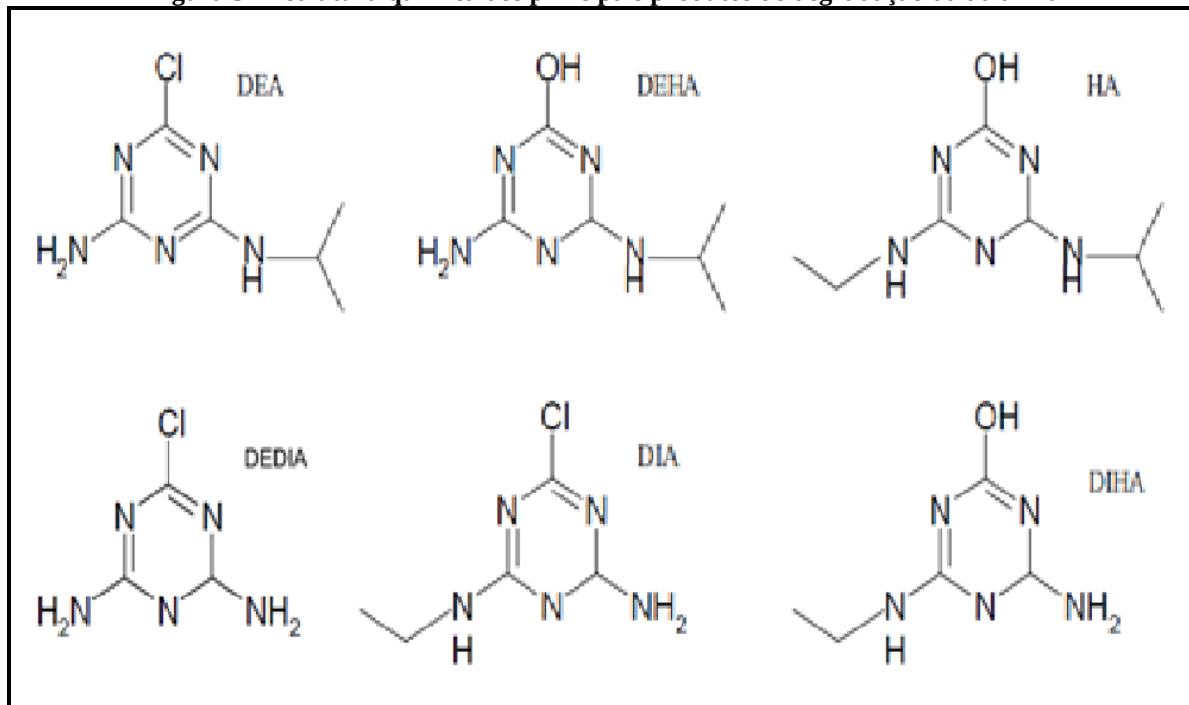


Fonte: <http://www.nature.com/nchembio/journal/v5/n8/images/nchembio.197-F1>

Mais de quinze metabólitos resultantes da degradação já foram identificados e descritos na literatura, sendo que os principais produtos de degradação são compostos hidroxilados e clorados: Desetil atrazina (DEA), Deisopropilatrizona (DIA),

Desetildeosopropilatrizona (DEDIA), Desetilhidroxiatrizona (DEHA), Deisopropilhidroxiatrizona (DIHA) e Hidroxiatrizona (HA) os quais possuem efeitos biológicos semelhantes aos da atrizona, porém menos tóxicos e normalmente estão presentes em baixas concentrações (LEVY et al., 1998; PEREIRA, 2011). As estruturas das moléculas dos principais produtos de degradação estão apresentadas na Figura 3.

Figura 3 - Estrutura química dos principais produtos de degradação da atrizona



Fonte: Adaptado de Pereira, 2011.

Segundo Khouri (2011) e informações contidas na Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ), este herbicida é classificado pelo Ministério da Saúde como medianamente tóxico (Classe III) para o ser humano e classificado pelo IBAMA como muito perigoso para o meio ambiente (Classe II).

A atrizona é altamente tóxica para organismos aquáticos, atua como potente disruptor endócrino em peixes e anfíbios quando testado em baixas concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$) e em répteis, aves e mamíferos em doses mais elevadas (HAYES et al., 2010).

Foram examinados os efeitos deste herbicida sobre o desenvolvimento sexual de rãs africanas (*Xenopus laevis*) em fase de larva e adultos e constatado que, mesmo em baixas concentrações, a atrizona induzia ao hermafroditismo, comprometendo o desenvolvimento sexual de machos e fêmeas, podendo contribuir com um fator global de declínio dos anfíbios (HAYES et al., 2002).

Alguns estudos indicam a atrazina como um possível agente carcinogênico, por aumentar a tendência de câncer de próstata, bexiga, pulmão, linfoma não-Hodgkin e mieloma múltiplo em seres humanos expostos ao herbicida. A exposição humana ocorre ocupacionalmente na agricultura e indústria por meio da água contaminada ou deriva. Foi relatada maior incidência de tumores mamários em fêmeas de ratos e de linfomas testiculares em ratos e camundongos, por meio da administração oral do herbicida (FREEMAN et al., 2011; RUSIECKI et al., 2004).

A atrazina também pode afetar o sistema reprodutivo humano, diminuindo a contagem de espermatozóides e aumentando as taxas de infertilidade (SWAN et al., 2003). Estudos epidemiológicos indicam que níveis muito baixos de exposição através da água contaminada podem interferir no desenvolvimento fetal durante o período crítico da gravidez (ACUÑA et al., 2009).

Após a aplicação, a atrazina pode tornar-se um contaminante dos corpos hídricos, por apresentar alta persistência no solo, hidrólise lenta, absorção moderada à matéria orgânica e argila, baixa pressão de vapor, alto potencial de escoamento, solubilidade baixa para moderada em água (UETA et al., 1999). No Quadro 1 estão apresentadas suas principais propriedades físico-químicas e ecológicas.

Devido a essas características físico-químicas e ao alto potencial de contaminar recursos hídricos, inclusive os sistemas de abastecimento de água, o Conselho da União Europeia, por meio da Directiva 2004/248/CE do Conselho, de 10 de março de 2004, proibiu o uso deste herbicida em alguns países, como é o caso da França, Dinamarca, Finlândia, Alemanha, Áustria, Itália e Suíça, porém foi concedida a prorrogação do uso em alguns países da Europa.

Em Portugal, a atrazina ainda faz parte da lista de produtos com venda autorizada, sendo comercializada, simples ou em mistura com outros herbicidas, sob várias designações comerciais. Devido ao uso intensivo e à propriedade de mobilidade nos solos, a atrazina é um dos herbicidas mais frequentemente detectados em águas de superfície e subterrâneas (CEREJEIRA et al., 2003).

No Sul de Portugal, no período de 2004 a 2006, durante a realização de um estudo de avaliação da qualidade da água, foi encontrado o metabólito Desetilatraxina (DEA), principal produto de degradação da atrazina, em 60% dos 103 poços analisados (SILVA et al., 2010).

QUADRO 1 - Propriedades físico-químicas e informações ecológicas da atrazina

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS e ECOLÓGICAS	REFERÊNCIA
Estado físico	líquido
Forma	leitosa
Cor	branca a bege
Odor	fraco
pH	7 a 8,5 (5% em água deionizada)
Pressão de vapor	$3,85 \times 10^{-2}$ mPa a 25°C para o produto
Densidade	1,08 – 1,12 g.mL ⁻¹ .
Solubilidade a 25°C (g.L ⁻¹)	O produto é miscível em água. Em outros solventes: a solubilidade do ingrediente ativo atrazina é de 24 em acetato de etila; 31 em acetona; 28 em diclorometano; 15 em etanol; 4 em tolueno; 0,11 em n-hexano e 8,7 em n-octanol.
Coeficiente de partição octano/água log Kow	2,5 (25°C).
Meia vida no ambiente	91 a 180 dias
Bioacumulação	O produto pode se bioacumular nos organismos aquáticos
Ecotoxicidade	Toxicidade: - Peixes: CL(I) ₅₀ ;96h = 44,53 mg.L ⁻¹ <i>Brachydanio rerio</i> .; - <i>Daphnia similis</i> CE(I) ₅₀ ;48h = 11,11 mg.L ⁻¹ ; - Abelhas (<i>Aphis mellifera</i>) - DL50 (oral) > 97 g/abelha; - Aves - DL50 = entre 940 mg.kg ⁻¹ a 4237 mg.kg ⁻¹ .

Fonte: Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos- FISPQ

Apesar de proibido o uso da atrazina na União Europeia em 2004, é o herbicida mais utilizado nos Estados Unidos e provavelmente no mundo. Este produto é frequentemente encontrado em águas norte-americanas, em torno de 80% das amostras analisadas de águas superficiais e tratadas. O estudo foi realizado em vinte bacias hidrográficas, entre 2007 e 2008, confirmando a presença generalizada da atrazina no ambiente, constituindo risco para os seres humanos, fauna e ecossistemas (WU et al., 2010).

No Brasil, a atrazina ainda faz parte da lista de produtos com venda autorizada, sendo comercializada simples ou em mistura com outros herbicidas, sob várias designações comerciais.

No Estado de Goiás é um dos agrotóxicos detectados em águas superficiais e subterrâneas de regiões agrícolas. A empresa de Saneamento do Estado de Goiás S/A (SANEAGO) faz o monitoramento da qualidade de água bruta e tratada, referente aos compostos orgânicos, de acordo com as exigências e frequências determinadas pelas Legislações e em alguns mananciais de superfície foram encontrados resíduos de atrazina, mas sempre abaixo do valor máximo permitido que é de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$, porém o fato de se detectar a presença já serve como indicador para adoção de medidas preventivas e evitar futuros impactos com uma gestão mais adequada dos recursos hídricos (SANEAGO, 2012).

4.3 BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação é uma tecnologia que utiliza o metabolismo de micro-organismos com objetivo de eliminar, transformar ou reduzir o contaminante em produtos menos tóxicos. Os micro-organismos utilizam os poluentes presentes no ambiente como fonte de nutrientes para o seu crescimento os quais podem ser integrados nos ciclos biogeoquímicos naturais (COLLA et al., 2008).

Segundo Oliveira (2008), a biorremediação pode ser definida como um conjunto de tecnologias que utilizam processos biológicos aplicados à remediação de áreas contaminadas, tratamento de compostos orgânicos tóxicos ou efluentes, contendo resíduos, que devem ser eliminados antes da liberação no ambiente.

O uso de biorremediação para o controle e remoção de micropoluentes presentes na água e solo constitui-se em uma técnica criteriosamente explorada, dentre os inúmeros processos biológicos existentes para minimizar os impactos ambientais e os efeitos indesejados promovidos por estes compostos xenobióticos ao homem (LOPEZ et al., 2005).

Desde a década de 40, o processo de biorremediação, como técnica de degradação de contaminantes orgânicos, vem sendo usado na indústria de petróleo (MESQUITA, 2004), apresentando resultados satisfatórios e economicamente viáveis quando comparados a outros métodos de remoção de hidrocarbonetos. A aplicação de processos biotecnológicos envolvendo micro-organismos, plantas e enzimas tem se tornado crescente (OLIVEIRA et al., 2008).

Geralmente, os micro-organismos utilizados são bactérias, fungos filamentosos e leveduras, que podem ser de ocorrência natural ou provenientes de bancos de culturas microbiológicas (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010). Várias pesquisas têm sido

realizadas com a finalidade de isolar, identificar e selecionar bactérias e fungos capazes de biodegradar agrotóxicos (SILVA, 2011).

A utilização de micro-organismos no tratamento de ambientes contaminados por agrotóxicos foi testada por Franco et al. (2003), quando a bactéria *Acinetobacter johnsonii* apresentou potencial remediador de solos contaminados pelos seguintes pesticidas: Diuron, Iprodione, Propanil, 3,4 Dicloroanilina, Metalaxil, Clorotalonil, Quinclorac, Atrazina e Paclobutrazol.

Silva et al. (2007) também avaliaram a capacidade degradativa de micro-organismos em 2,4D, herbicida reconhecido como cancerígeno. Os micro-organismos *Stenothrophomas maltophilia* e *Penicillium* sp., bactéria e fungo, respectivamente, apresentaram valores satisfatórios de degradação, além deste último pertencer à biota natural do solo estudado.

Campos (2009) realizou estudos de remoção e toxicidade dos pesticidas atrazina e oxifluorfem utilizando cianobactérias *Microcystis novacekii* em condições de cultivo e os resultados demonstraram certo potencial para degradação da atrazina com médias de remoção de 22,2% em 96 horas.

A biodegradação parcial do herbicida atrazina também foi relatada por Ueta et al. (1999), por meio dos fungos *Aspergillus fumigatus* e *Rhizopus stolonifer* e das bactérias do gênero *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Bacillus* e *Pseudomonas*, em que houve a degradação da atrazina após 26 dias de incubação em meio líquido, sendo a única fonte de carbono e nitrogênio a atrazina na concentração de 100 mg.L⁻¹. Wang et al. (2012) também obteve bons resultados da biodegradação da atrazina utilizando as bactérias *Rhizobium* sp e *Acinetobacter* sp. com capacidade relativamente elevada de mineralização, cerca de 96% e 99% em 72 h respectivamente.

Uma das formas de aplicação da biorremediação utilizando fungos e/ou as enzimas extracelulares é o uso de reatores biológicos. Dentre os biorreatores, os mais comuns são os filtros biológicos anaeróbios ou aeróbios, o sistema de lodos ativados e suas variações e digestores anaeróbios de fluxo ascendente (PEREIRA e FREITAS, 2012).

As vantagens da biorremediação são: apresenta um baixo custo, pode ser realizada em temperatura e pressão ambientes, utiliza metabolismos degradativos do próprio ambiente, não há transferência do problema, é segura do ponto de vista ambiental e há a transformação do contaminante até a mineralização, transformando-o em CO₂, H₂O e sais orgânicos (GIMENES, 2010; LOPES et al., 2009).

A biorremediação apresenta algumas desvantagens tais como: é um processo lento; muitos micro-organismos apresentam ser eficazes apenas em condições de laboratório; é dependente da quantidade de nutrientes disponíveis; exige controle do pH, temperatura, oxigênio e umidade (KARIGAR; RAO, 2011).

4.4 APLICAÇÃO DOS FUNGOS DE DECOMPOSIÇÃO BRANCA EM BIORREMEDIAÇÃO

Os basidiomicetos são incluídos taxonomicamente no Filo Basidiomycota do Reino Fungi e morfologicamente são caracterizados como fungos que produzem esporos de origem sexuada em estruturas especializadas chamadas basídios. Popularmente, estes fungos são conhecidos como cogumelos e orelhas-de-pau. Eles desempenham papel fundamental na ciclagem de nutrientes na natureza, principalmente no ciclo de carbono, por serem excelentes degradadores de lignina, o segundo polímero mais abundante sobre a terra (SALVI, 2011).

Estes micro-organismos são também chamados de fungos de decomposição branca, por degradarem celulose, hemicelulose e lignina, quebrando em moléculas menores CO_2 e H_2O , a partir dos quais obtêm energia para seu crescimento e reprodução, causando perda da resistência da madeira, tornando-a laminada, esponjosa, fibrosa e com uma coloração branca, que caracteriza o nome do grupo (GIMENES, 2010).

A biodegradação de materiais lignocelulósicos é um processo natural da reciclagem da matéria orgânica e neste processo atua um grupo de enzimas oxidativas que compreendem duas peroxidases (lignina peroxidase e manganês peroxidase) e uma oxidase (lacase), as quais, em geral, não são específicas do substrato, tornando possível a sua aplicação na biodegradação de uma variedade de compostos recalcitrantes como agrotóxicos clorados, dioxinas e hidrocarbonetos aromáticos (ARANTES; MILAGRES, 2009; AUST, 1995; MANSUR et al., 2003; ALEXANDRINO et al., 2007; CARVALHO et al., 2009).

Na Suécia e em alguns outros países da Europa, vários agrotóxicos como o lindano, atrazina, diuron, terbutilazina, metalaxil, dicloro-difenil-tricloroetano, gama hexaclorociclohexano, dieldrin, aldrin, heptacloro, clordano, lindano, mirex, etc foram biodegradados por meio de fungos de decomposição branca, em local onde ocorre manipulação do agrotóxico, evitando contaminação de corpos d'água (DIEZ, 2010).

Os fungos de decomposição branca têm apresentado o potencial de descolorir, degradar e mineralizar os corantes utilizados no processo de fabricação de tecidos. Vários estudos têm

apresentado resultados satisfatórios e o potencial da aplicação da biorremediação em tratamento de efluentes das indústrias têxteis.

Machado et al. (2006) analisaram o potencial dos fungos *Trametes villosa* e *Pycnoporus sanguineus* em biodegradar uma mistura de 28 corantes e os resultados deste estudo demonstraram o excelente desempenho destes micro-organismos em descolorir os efluentes. Miranda et al. (2010) também obteve resultados satisfatórios, com degradação de 100% dos corantes testados utilizando *Phanerochaete chrysosporum*, *Lentinus edodes* e *Curvularia lunata*.

Atualmente a mais importante aplicação para celulasas e hemicelulasas é o bio-branqueamento da polpa na indústria de papel, a produção da polpa dissolvida, tratamento de água residual e reciclagem de resíduos de papel (BORTOLAZZO, 2011).

Estas enzimas lignolíticas estão sendo utilizadas em várias aplicações industriais e biotecnológicas, por serem estáveis e altamente ativas, contribuindo assim para resolver os problemas ambientais (MENEZES; SILVA; DURRANT, 2009).

5 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos utilizados na execução dos experimentos estão representados no fluxograma simplificado apresentado na Figura 4.

O trabalho foi realizado utilizando as instalações e equipamentos do Laboratório de Enzimologia e Biocatálise Ambiental da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás e do Laboratório Central de Análise de Água da SANEAGO.

A partir dos objetivos propostos para esta pesquisa, a parte experimental foi desenvolvida em quatro etapas:

- Etapa 01: consistiu no cultivo de cinco espécies de fungos de decomposição branca em meio de cultura sólido, com variações nas concentrações de nutrientes e de atrazina, para avaliação e seleção pela maior capacidade de adaptação e maior taxa de crescimento nas condições testadas.

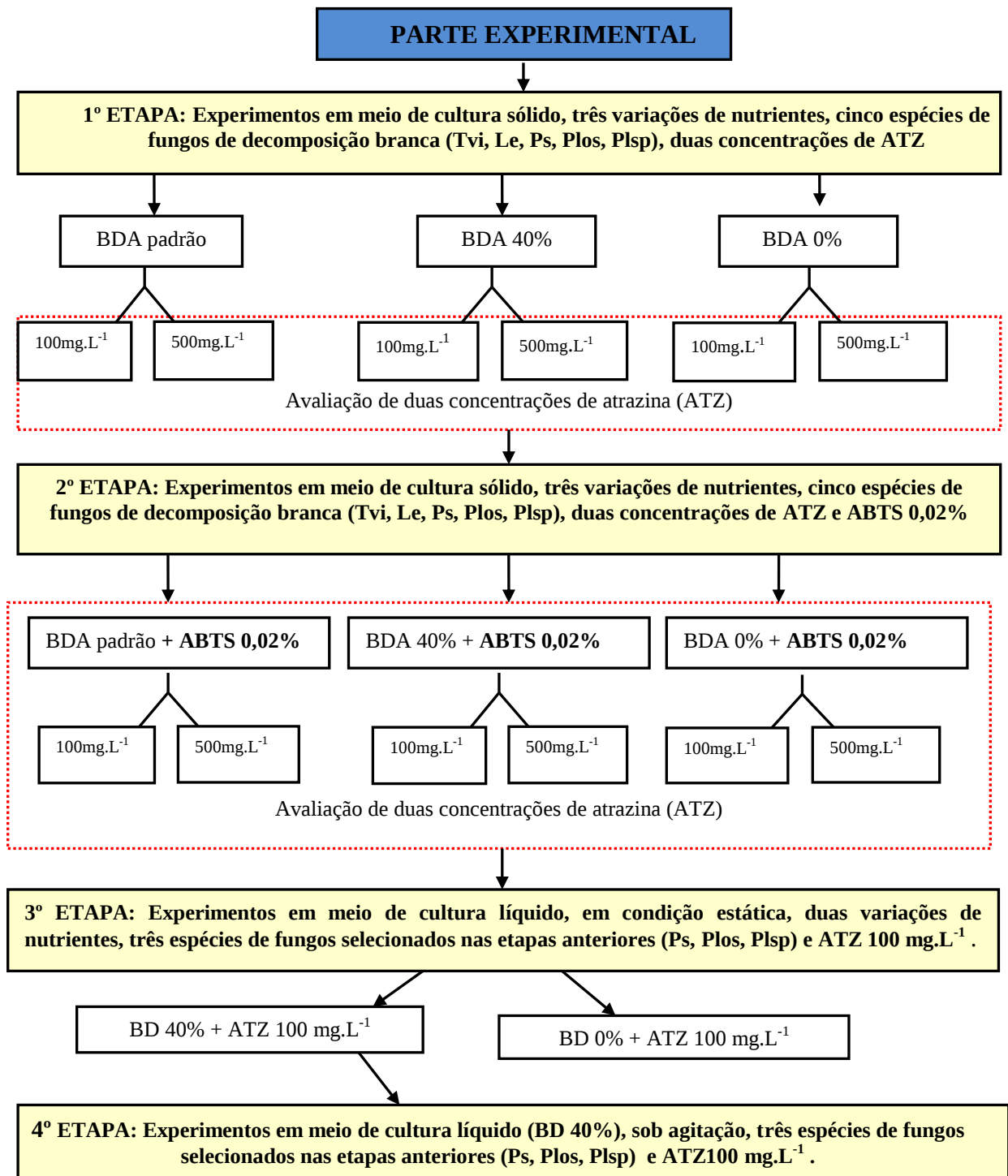
- Etapa 02: os experimentos foram realizados em meio de cultura sólido, nas mesmas condições da etapa anterior, porém com adição ABTS (2 –Azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6 – ácido sulfônico) diamônia, para avaliação qualitativa da produção de enzimas ligninolíticas dos fungos na presença de atrazina e seleção das espécies para os experimentos no meio de cultura líquido.

- Etapa 03: realizada em meio de cultura líquido, em condição estática, utilizando três fungos selecionados nas etapas anteriores, duas concentrações do meio de cultura e atrazina na concentração de 100 mg.L^{-1} .

- Etapa 04: realizada em meio de cultura líquido, sob agitação, utilizando os mesmos micro-organismos da etapa três, na condição nutricional que ocorreu maior produção de enzimas.

Nos ensaios em meio líquido foram realizadas análises da concentração de atrazina por método cromatográfico e quantificação das enzimas lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase por método espectrofotométrico.

Figura 4 - Fluxograma simplificado do roteiro utilizado na realização dos experimentos.



Legenda:

Tvi (*Trametes villosa*); **Le** (*Lentinus edodes*); **Ps** (*Pycnosporus sanguineus*); **Plos** (*Pleurotus ostreatus*); **Plsp** (*Pleurotus* sp); **ATZ** (atrazina); **ABTS** (2,2 –Azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6 – ácido sulfônico) diamônia; **BDA padrão** (Batata, Dextrose e Agar); **BD** (Batata e Dextrose).

5.1 MICRO-ORGANISMOS

Foram utilizados cinco micro-organismos para realização dos experimentos (*Trametes villosa*, *Lentinus edodes*, *Pycnoporus sanguineus*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus* sp) que fazem parte da coleção do Laboratório de Enzimologia e Biocatálise Ambiental-FF/UFG, os quais são provenientes da Fundação André Tosello, localizada em Campinas-SP e à Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP (Quadro 2).

As cepas *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus* sp foram devidamente identificadas pela Divisão de Recursos Microbianos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - DRM/CPQBA - UNICAMP, e são pertencentes ao Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana do Departamento de Ciências do Alimento - Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA/UNICAMP.

QUADRO 2 - Micro-organismos utilizados na Pesquisa

Micro-organismos	Identificação da cepa	Origem
<i>Lentinus edodes</i>	CCT - 4519	Fundação André Tosello
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	CCT- 4518	Fundação André Tosello
<i>Pleurotus ostreatus</i>	sem registro	UNICAMP
<i>Pleurotus</i> sp.	sem registro	UNICAMP
<i>Trametes villosa</i>	CCT- 5567	Fundação André Tosello

Fonte: Faculdade de Farmácia- UFG - Laboratório de Enzimologia e Biocatálise Ambiental.

5.2 MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS DURANTE OS EXPERIMENTOS

Para realização dos experimentos foram utilizados meios de cultura líquidos BD (Batata e Dextrose) e sólidos BDA (Batata, Dextrose e Agar) com variações de fonte nutricional: BDA padrão, BDA 40% caldo de batata e BDA 0% de caldo de batata. A composição dos meios de cultura encontra-se no Quadro 3.

Durante o preparo dos meios de cultura foram adotadas procedimentos de Boas Práticas de Laboratório (BPL) para manter a integridade e evitar contaminação. Os frascos contendo os meios de cultura foram armazenados na temperatura recomendada pelo fabricante de 4°C a 30°C e umidade relativa < 60%.

Após o preparo foi verificado o pH e quando necessário este foi ajustado para 5,5 com NaOH ou HCl. Posteriormente, foram esterilizados em temperatura de 121°C por 15 minutos, resfriados até 40°C e transferidos 20 mL para placas de Petri e 200 mL para frascos de *Erlenmeyer*, este procedimento foi realizado dentro da cabine de segurança biológica (CBS).

QUADRO 3 - Composição dos meios de cultura sólido e líquido

Componentes	Meio líquido	Meio sólido BDA padrão	Meio sólido BDA 40% caldo de batata	Meio sólido BDA 0% caldo de batata	Meio sólido BDA padrão com ABTS
Dextrose	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g
Caldo de batata	200 mL	4,0 g*	1,6 g**	Ausente	4,0g *
Agar	Ausente	15 g	15 g	15 g	15 g
ABTS	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	0,2 g
Água destilada qsp	1000 mL	1000 mL	1000 mL	1000 mL	1000 mL

* Equivale a 200 g de infusão de batata.

** Equivale a 80 g de infusão de batata

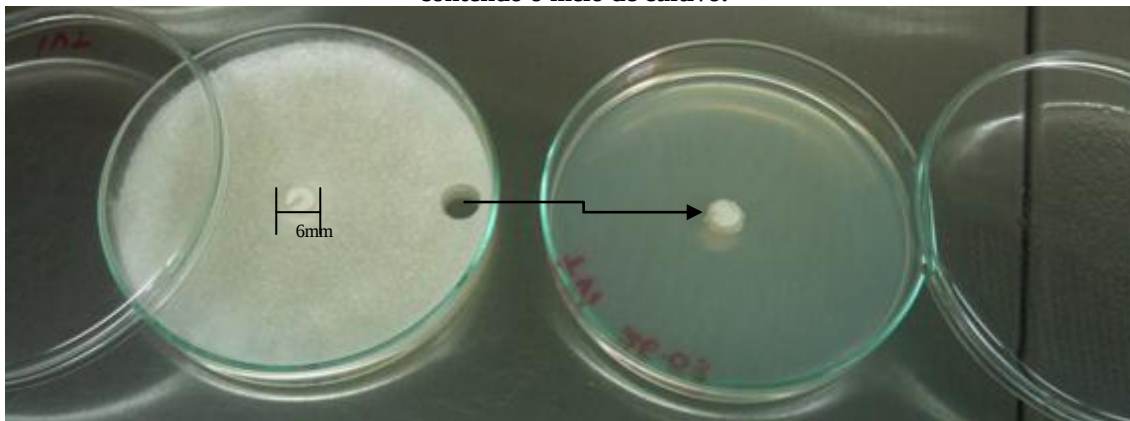
5.3 MANUTENÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS

O cultivo e a manutenção dos fungos foram realizados em meio BDA, em placas de Petri com diâmetro de 9 cm. Os inóculos contendo os micro-organismos foram transferidos sob fluxo laminar para o centro das placas contendo o meio de cultivo. O inóculo é também chamado de disco, possui 6 mm de diâmetro, corresponde à abertura maior de uma ponteira de 1 mL, este foi retirado da borda da colônia na placa de Petri, por ser a área de crescimento ativo (Figura 5).

As placas inoculadas foram incubadas em estufa microbiológica a 28°C $\pm$ 2°C, no escuro por 8 dias, tempo necessário para crescimento satisfatório dos fungos. Este período foi padronizado durante os experimentos.

Os repiques foram realizados mensalmente e as cepas foram mantidas a 4°C, em tubos de ensaio com meio BDA padrão inclinado, para preservação.

Figura 5 - Transferência do inóculo da área de crescimento ativo da colônia para o centro da placa contendo o meio de cultivo.



Fonte: Pesquisa da autora

5.4 PREPARO DA SOLUÇÃO DE ATRAZINA

A atrazina foi adquirida comercialmente, acompanhada de receita agrônômica com recomendação e observação para uso em pesquisa. O nome comercial é PROOF, fabricado pela indústria Syngenta Crop Protection, dos Estados Unidos, cujo importador é a Syngenta Proteção de Cultivos Ltda, localizada em São Paulo, sob o registro nº 02999 do Ministério da Agricultura e Abastecimento – MAPA.

O agrotóxico é comercializado em forma de suspensão concentrada com a seguinte composição:

- Ingrediente ativo:
6-chloro-N -ethyl-N -isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine.....500g/L (50% m/v)
- Ingredientes inertes.....600g/L (60% m/v)

Devido a toxicidade do produto foram adotados procedimentos de biossegurança, com utilização dos Equipamentos de Proteção Individual (EPI): luvas, toucas, jalecos com mangas compridas e máscaras.

Para realização dos experimentos em meio de cultura sólido foram utilizadas duas concentrações de atrazina, 100 mg.L^{-1} e 500 mg.L^{-1} , estas concentrações correspondem 50.000 e 250.000 vezes, respectivamente, aos valores máximos permitidos de atrazina, em água tratada e bruta (mananciais de superfície e subterrâneo), determinados pelas legislações vigentes do Ministério da Saúde e Ministério do Meio Ambiente, que especificam máximo $2 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$.

A solução estoque foi preparada utilizando a suspensão concentrada 50% por meio de diluição, utilizando água ultrapura (livre de matéria orgânica, sais e micro-organismos) e

vidrarias esterilizadas, para obter concentração de 10% do ingrediente ativo, a partir da qual as concentrações desejadas foram preparadas sob fluxo laminar para manutenção da condição estéril necessária à realização dos experimentos e adicionadas ao meio de cultura antes de sua solidificação.

5.5 EXPERIMENTOS EM MEIO DE CULTURA SÓLIDO – ETAPA 01

Os experimentos foram realizados com os micro-organismos: *Lentinus edodes*, *Pycnoporus sanguineus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus* sp, *Trametes villosa*, em três condições nutricionais: (1) BDA – padrão, (2) BDA 40% de caldo de batata, e (3) BDA 0% de caldo de batata e duas concentrações de atrazina: 100 mg.L⁻¹ e 500 mg.L⁻¹, com o objetivo de avaliar a velocidade do crescimento micelial, desenvolvimento satisfatório dos micélios e capacidade de adaptação na presença da atrazina.

Estas condições foram determinadas após ensaios preliminares com os micro-organismos acima citados, em meio de cultura sólido (BDA padrão, BDA 40% e BDA 0%). Foi verificada a curva de crescimento na ausência da atrazina e nas concentrações de 100 mg.L⁻¹ e 500 mg.L⁻¹ e o aspecto dos micélios.

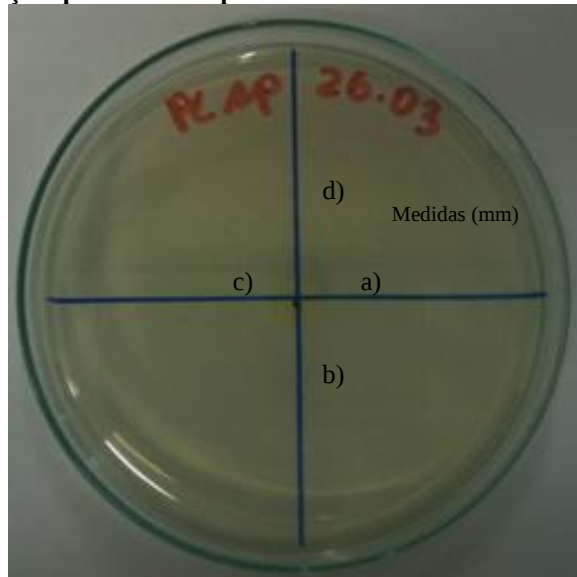
O caldo de batata fornece aos fungos quantidades de carbono, nitrogênio e sais minerais para seu desenvolvimento (JARDIM, 2010). Com a redução destes nutrientes utilizando os meios de cultura BDA 40% e BDA 0%, buscou-se avaliar se os micro-organismos iriam suprir as necessidades nutricionais por meio da degradação da atrazina.

Os ensaios foram realizados em duplicata, até a colonização completa dos fungos ou por um período máximo de 21 dias, incubados a 28°C ± 2°C e repetidos três vezes, em cada condição testada.

Após 24 h de inoculação, o tamanho das colônias foi medido diariamente, como indicador da taxa de crescimento fúngico, e os resultados foram expressos por Velocidade de Crescimento Radial (VCR mm.dia⁻¹).

As medidas foram feitas utilizando paquímetro digital, a partir do centro do disco, em quatro posições distintas e previamente marcadas no fundo da placa de Petri (a, b, c, d) (Figura 6). Posteriormente, foi calculada a média aritmética, desvio padrão da média e o coeficiente de variação (CV%).

Figura 6 - Posições pré-definidas para medidas dos raios de crescimento fúngico.



Fonte: Pesquisa da autora

O aspecto morfológico do micélio recebeu duas classificações quando comparado ao grupo-controle: Satisfatório (S) quando o aspecto apresentou similaridade ao grupo-controle e insatisfatório (I) quando apresentou diferenças tais como: fragilidade, crescimento irregular dentre outras.

Os fatores VCR (mm.dia^{-1}) e aspecto morfológico foram utilizados como indicadores de adaptação dos fungos na presença da ATZ nas concentrações de 100 mg.L^{-1} e 500 mg.L^{-1} e na variação dos nutrientes dos meios de cultura. Quanto maior a velocidade de crescimento radial maior o potencial de degradação da fonte de carbono.

5.6 EXPERIMENTOS EM MEIO DE CULTURA SÓLIDO COM ABTS 0,02% - ETAPA 2

Com o objetivo de selecionar os fungos com maior capacidade de produção enzimática na presença de atrazina, foi realizado um ensaio com os mesmos micro-organismos, as mesmas condições e os mesmos procedimentos adotados na etapa 01, porém com ajuste do pH do meio de cultura a 4,5 e com adição do substrato ABTS (2,2 –Azino-bis), (3-etilbenzotiazolina-6 – ácido sulfônico), diamônia) na concentração de 0,02%. Este substrato evidencia a presença de enzimas lignocelulolíticas com aparecimento de coloração.

A solução de ABTS 0,02% foi adicionada ao meio de cultura após esterilizado e antes de ser solidificado, sob fluxo laminar utilizando membrana filtrante de $0,22 \mu$ para eliminação de possíveis contaminantes presentes na solução.

Os ensaios foram realizados por um período máximo de 12 dias ou até a descoloração do halo indicador da presença das enzimas, incubados a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após 24 h de inoculação, foi observado visualmente e medido diariamente o crescimento fúngico e do halo indicador da atividade enzimática.

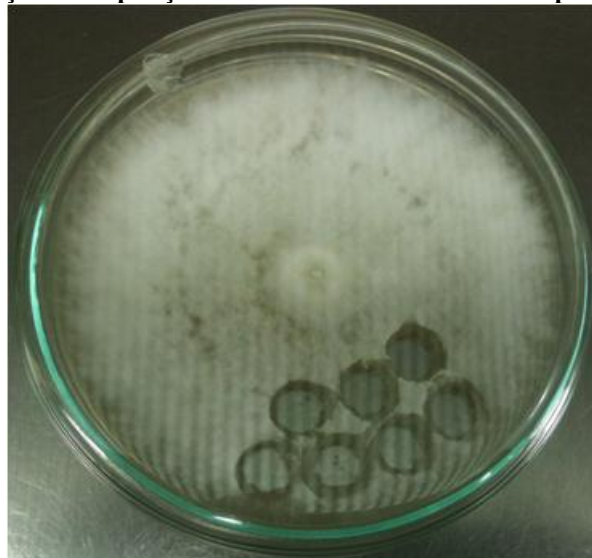
5.7 EXPERIMENTOS EM MEIO DE CULTURA LÍQUIDO EM CONDIÇÃO ESTÁTICA – ETAPA 03

Os experimentos em meio de cultura líquido, em condição estática, foram realizados utilizando duas condições nutricionais, uma com o caldo dextrose e batata a 40% e a outra com caldo dextrose e batata a 0% com adição da atrazina na concentração de 100 mg.L^{-1} .

Os micro-organismos selecionados para esta etapa foram: *Pycnoporus sanguineus*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus* sp. A escolha destas condições foi baseada nos resultados obtidos nas etapas anteriores e consistiu na avaliação da adaptação dos fungos na presença do herbicida, velocidade de crescimento, formação satisfatória do micélio e indicativo da produção de enzimas.

Foram retirados sete discos de cada espécie fúngica, cultivados a $28^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em meio de cultura BDA padrão por 8 dias e transferidos para os *Erlenmeyers* de 250 mL, contendo 200 mL do meio de cultura preparados conforme item 5.2 e para padronização, os discos foram retirados na mesma disposição (Figura 7).

Figura 7 - Padronização da disposição dos discos retirados de cada espécie de fungo analisado.



Fonte: Pesquisa da autora

Os ensaios foram realizados em duplicata por um período de 21 dias, ao abrigo da luz, mantidos em estufa bacteriológica com temperatura controlada a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Para cada experimento, foram utilizados dois grupos de controle, conforme Jardim (2010). Um grupo foi denominado Controle do Experimento (CE), sem a presença da atrazina, contendo apenas o meio de cultura e o fungo. O grupo CE serviu para o controle da atividade enzimática. O outro grupo foi nomeado de Controle de Toxicidade (CT), contendo o meio de cultura e o herbicida foi mantido nas mesmas condições apresentadas, mas sem receber o inóculo. O CT serviu para monitorar a concentração da atrazina durante os ensaios.

Os *Erlenmeyers* foram numerados e codificados para identificação e rastreabilidade dos experimentos conforme descrito no Quadro 4.

Para determinação da atividade enzimática foram retiradas 7 mL de amostra de cada experimento e do grupo CE, sob fluxo laminar a fim de manter as condições estéreis. A amostragem foi feita de 3 em 3 dias, perfazendo o total de 7 coletas.

As análises foram realizadas utilizando o sobrenadante do meio de cultura, obtido por centrifugação, com força centrífuga relativa de 257,5 g por 20 minutos. Para este procedimento, foi utilizada uma centrífuga marca Fanem, modelo 206 BL.

Para quantificação da atrazina, foram retiradas 5 mL de amostra no dia da inoculação dos micro-organismos e adição da atrazina 100mg.L^{-1} , considerado o tempo inicial (T0). As demais coletas foram realizadas juntamente com as amostras para análise enzimática. A amostragem foi realizada em cada experimento e no grupo CT, perfazendo um total de 8 coletas. As amostras foram identificadas, acidificadas $\text{pH} \leq 2$, armazenadas sob refrigeração e ao abrigo da luz, pelo prazo máximo de 14 dias, contando desde a coleta até a fase de extração em cartucho. Após a extração, as amostras foram acondicionadas a -22°C , por um período máximo de 30 dias até o momento da análise cromatográfica.

QUADRO 4 - Codificação dos experimentos para rastreabilidade dos dados

Nº do Erlenmeyer	Descrição	CÓDIGO
1	Controle do experimento (CE) com o fungo <i>Pycnosporus sanguineus</i> : contendo meio de cultura e o fungo	1 (MC + Ps)
2	Controle do experimento (CE) com o fungo <i>Pycnosporus sanguineus</i> : contendo meio de cultura e o fungo	2 (MC + Ps)
3	Experimento com <i>Pycnosporus sanguineus</i> : contendo meio de cultura, o fungo e atrazina 100 mg.L ⁻¹	3 (MC+Ps+ATZ100)
4	Experimento com <i>Pycnosporus sanguineus</i> : contendo meio de cultura, o fungo e atrazina 100 mg.L ⁻¹	4 (MC+Ps+ATZ100)
5	Controle do experimento (CE) com o fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> : contendo meio de cultura e o fungo	5 (MC + PLos)
6	Controle do experimento (CE) com o fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> : contendo meio de cultura e o fungo	6 (MC + PLos)
7	Experimento com <i>Pleurotus ostreatus</i> : contendo meio de cultura, o fungo e atrazina 100 mg.L ⁻¹	7 (MC + PLos+ATZ100)
8	Experimento com <i>Pleurotus ostreatus</i> : contendo meio de cultura, o fungo e atrazina 100 mg.L ⁻¹	8 (MC + PLos+ATZ100)
9	Controle do experimento (CE) com o fungo <i>Pleurotus</i> sp: contendo meio de cultura e o fungo	9 (MC + PLsp)
10	Controle do experimento (CE) com o fungo <i>Pleurotus</i> sp: contendo meio de cultura e o fungo	10 (MC + PLsp)
11	Experimento com <i>Pleurotus</i> sp: contendo meio de cultura, o fungo e atrazina 100 mg.L ⁻¹	11(MC + PLsp+ATZ100)
12	Experimento com <i>Pleurotus</i> sp: contendo meio de cultura, o fungo e atrazina 100 mg.L ⁻¹	12(MC + PLsp+ATZ100)
CT 1	Controle de toxicidade (CT): contendo meio de cultura e atrazina 100 mg.L ⁻¹	CT 1 (MC+ ATZ100)
CT 2	Controle de toxicidade (CT): contendo meio de cultura e atrazina 100 mg.L ⁻¹	CT 2 (MC+ ATZ100)

Fonte: Pesquisa da autora

Vários parâmetros de cultivo afetam a produção e a atividade das enzimas lignolíticas, tais como disponibilidade de oxigênio, fonte e concentração de carbono e nitrogênio, pH e temperatura, por isso durante o período de cultivo foi verificado o pH das amostras e monitorada a temperatura da estufa de incubação.

5.7.1 Determinação da Biomassa

Ao finalizar os experimentos, foram determinadas as biomassas dos fungos, conforme proposto por Jardim (2010), por meio de filtração com bomba a vácuo dos micélios em papel de filtro, seguida da secagem do mesmo em estufa a 80°C, até obter peso constante.

O valor da biomassa foi definido pela diferença de peso do papel de filtro seco e o peso da biomassa seca. A determinação da biomassa teve por objetivo avaliar a atividade microbiana que pode ser diretamente relacionada à quantidade de biomassa.

5.7.2 Teste de adsorção

Foi realizado teste de adsorção, conforme descrito por Silva (2011), para avaliar se os fungos possuem a capacidade de reduzir a concentração do herbicida pelo mecanismo de adsorção na biomassa.

O teste foi realizado nas mesmas condições avaliadas nos experimentos em meio líquido conforme item 5.7. Os fungos foram cultivados em placa de Petri, utilizando BDA padrão durante oito dias. Posteriormente, foram transferidos 7 discos para o meio de cultura líquido e incubados a 28°C $\pm$ 2°C por 14 dias e em seguida a este período esterilizados a 121°C por 20 minutos com o objetivo de matar os fungos e eliminar as atividades das enzimas. Ao resfriar a temperatura ambiente, foi adicionada atrazina na concentrações de 100 mg.L⁻¹ sob fluxo laminar para manter as condições de esterilidade. Foram retirados 5 mL de amostra para avaliar a concentração da atrazina no dia da adição, tempo inicial (T0).

Os frascos foram novamente incubados por 21 dias e ao final deste período foram retirados 5 mL da amostra para análise da concentração final da atrazina. Os resultados do teste de adsorção foram expressos em porcentagem de redução, pela diferença da média da concentração inicial da atrazina pela média da concentração final. utilizando-se a Equação 1 descrita abaixo:

$$(\overline{Ci} - \overline{Cf}) \times 100 / \overline{Ci} \quad \text{(Equação 1)}$$

Em que:

$\overline{Ci}$ = média da concentração inicial da atrazina mg.L⁻¹

$\overline{Cf}$ = média da concentração final da atrazina mg.L⁻¹

5.8 EXPERIMENTOS EM MEIO DE CULTURA LÍQUIDO COM AGITAÇÃO – ETAPA 04

Os experimentos em meio de cultura líquido, sob agitação, foram realizados seguindo os mesmos procedimentos do item 5.7, porém foi escolhido o meio de cultura caldo dextrose e batata 40%, por ter apresentado melhores resultados nos experimentos na condição estática. Os micro-organismos selecionados para esta etapa foram os mesmos utilizados na condição estática: *Pycnoporus sanguineus*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus* sp.

Os ensaios foram realizados em duplicata por um período de 18 dias, ao abrigo da luz, mantidos em misturador automático em rotação de 120 rpm, com temperatura controlada a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

5.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA NOS EXPERIMENTOS EM MEIO DE CULTURA LÍQUIDO NA CONDIÇÃO ESTÁTICA E COM AGITAÇÃO

A quantificação das enzimas ligninolíticas (lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidases) foi realizada nas fases de crescimento dos fungos em meio de cultura líquido na condição estática e com agitação.

Todas as determinações de atividade enzimática foram realizadas em triplicata, para cada condição analisada. Utilizou-se para estes ensaios um espectrofotômetro UV/VIS, marca HACH e modelo DR 5000.

A atividade da Lacase (Lcc) foi determinada de acordo com Szklarz et al. (1989) modificado, que consiste na oxidação da seringaldazina (Sigma Chemical Company) como substrato. Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,6 mL do sobrenadante dos Erlenmeyers, 0,3 mL do tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹ (pH 5,0) e 0,1 mL de seringaldazina 1,0 mmol.L⁻¹ preparada em etanol. A reação, iniciada pela adição da seringaldazina, teve sua velocidade acompanhada por 5 minutos, em temperatura ambiente. A leitura foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda de 525 nm, sendo ($\epsilon_{525\text{nm}} = 65.000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Para o branco, procedeu-se da mesma forma, porém sem o substrato.

O método utilizado para determinação da enzima Manganês Peroxidase (MnP) foi de Kuwahara et al. (1984) *apud* Jardim (2010). A mistura de reação (1,0 mL) foi constituída por 0,5 mL de sobrenadante, 0,1mL de lactato de sódio 0,25M, 0,2mL de albumina bovina 0,5%, 0,05mL de MnSO₄ 2,0 mmol.L⁻¹, 0,05mL de solução de H₂O₂ 2,0 mmol.L⁻¹ preparada em

tampão de succinato de sódio 0,2 mol.L⁻¹ (pH 4,5). O tubo de ensaio contendo a mistura foi incubado em banho-maria a 30°C durante 5 minutos, com acréscimo de 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1% . A reação foi interrompida pela adição de 0,027 mL de NaOH 0,2 M..

A leitura da atividade enzimática foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 610 nm, sendo (ϵ 610 nm = 4.460 L.mol⁻¹. cm⁻¹). O branco foi preparado seguindo o mesmo procedimento para as amostras, porém o sobrenadante foi aquecido em micro-ondas por dez segundos para desnaturação da proteína.

A determinação da atividade da Lignina Peroxidase (LiP) foi feita segundo Tien e Kirk (1984), onde foram adicionados no tubo de ensaio 0,6 mL da amostra centrifugada, 0,2 mL de álcool veratrílico 2 mmol.L⁻¹ em tampão tartarato de sódio 0,4 mol.L⁻¹ pH5,0 e 0,2mL de H₂O₂ 2,0mmol.L⁻¹. A reação foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 310 nm, sendo (ϵ 310nm = 9.300 L.mol⁻¹. cm⁻¹). O preparo do branco foi semelhante ao das amostras, exceto no final, quando foram adicionados 0,2 mL de água destilada em vez de 0,2 mL de H₂O₂ 2,0 mmol.L⁻¹.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μ mol de substrato por minuto.

As atividades das enzimas foram determinadas, a partir do cálculo da média das leituras de absorbância, conforme descrito por Menezes (2009). Os resultados foram expressos em U/L.min⁻¹ (μ moles produto/min.L). Os cálculos foram realizados a partir da Equação 2.

$$U/L = \Delta E \times 10^6 / \epsilon \times R \times \Delta t \quad \text{(Equação 2)}$$

Em que:

ΔE = Absorbância no comprimento de onda específico;

ϵ = Coeficiente de extinção molar para cada enzima;

R= Quantidade de caldo enzimático em mL;

Δt = Tempo de reação em minutos.

5.10 QUANTIFICAÇÃO DA ATRAZINA

O teor da atrazina foi verificado antes e depois do tratamento com os fungos. Para separação e quantificação foi utilizado cromatógrafo gasoso com detector de massa (GC/MS) marca Varian, modelo Saturn 2100 T, com mostrador automático tipo combi-PAL, com limite de detecção $0,20 \mu\text{g.L}^{-1}$ e limite de quantificação $0,62 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Segue abaixo, no Quadro 5, a descrição dos parâmetros e das variáveis inseridas no cromatógrafo (GC) para detecção da concentração de atrazina, as variáveis do detector de massas (MS) estão descritas no Quadro 6.

O tempo de retenção da atrazina é de 10,698 a 11,929 minutos e a identificação é por meio do íon primário 215-216, o perfil cromatográfico deste composto está apresentado na Figura 8. A curva de calibração é do tipo linear e foi inserida com dez pontos com o coeficiente $r^2 = 0,9934$ (Figura 9).

QUADRO 5 - Parâmetros e variáveis inseridas no cromatógrafo para detecção da concentração de ATZ.

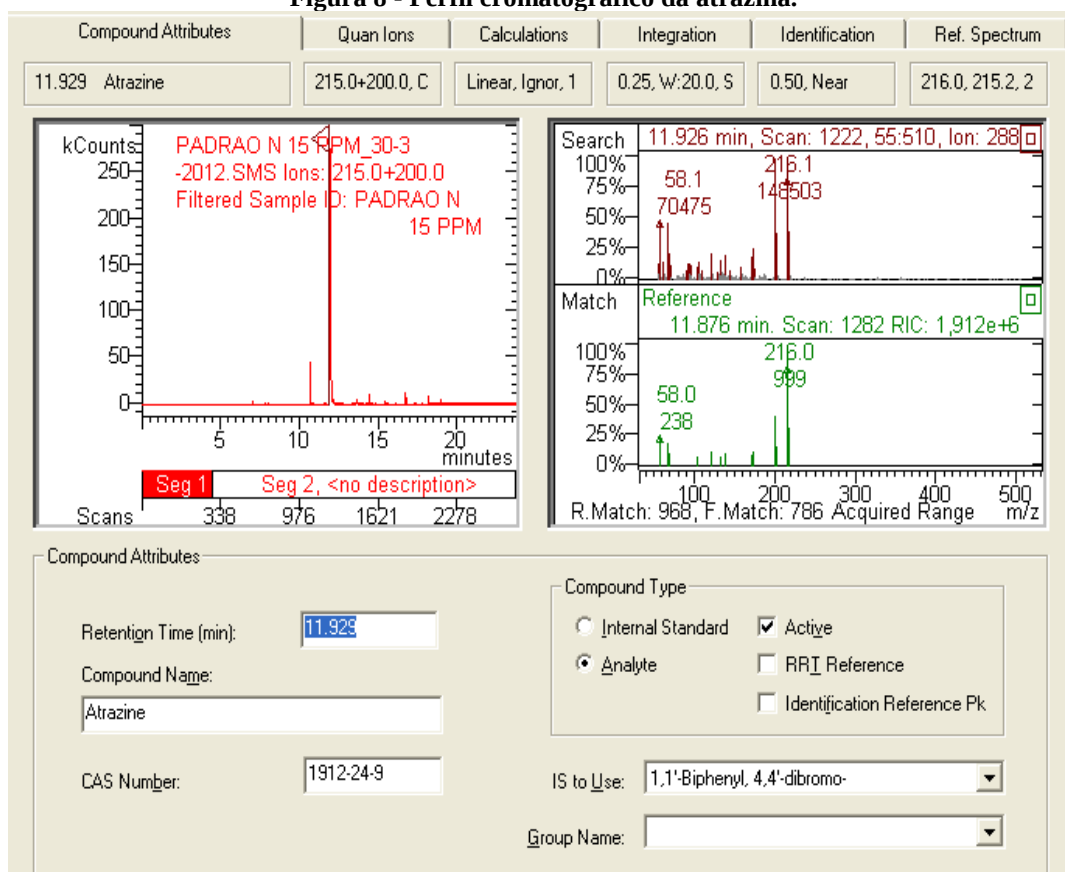
Parâmetros (GC)	Variáveis
Tipo de coluna e fase estacionária	Coluna CPSil8CB-MS, Low bleed, 30 m x 0,25 mm e 0,25 μm filme
Forma de injeção	Modo: Split/Splitless Split: Razão de split: 30L/min tempo: 0,01 min Splitless: tempo: 0,75 min Split: Razão de split: 60L/min tempo: 15 min Split: Razão de split: 30L/min tempo: restante
Temperatura do injetor	250°C
Programação de temperatura da coluna	Tempo de estabilização: 1 min 60°C manter 1,53 min 60°C para 130°C na razão de 28°C/min 130°C para 180°C na razão de 12°C/min 180°C para 240°C na razão de 7°C/min 240°C para 300°C na razão de 12°C/min 300°C manter 4 min Total da corrida 25,77 min
Fluxo da fase móvel	Fase móvel: Hélio Fluxo constante: 1,0 mL/min Pressão pulsante: Não

Fonte: Pesquisa da autora

QUADRO 6 - Parâmetros e variáveis do detector de massas para detecção da concentração de ATZ.

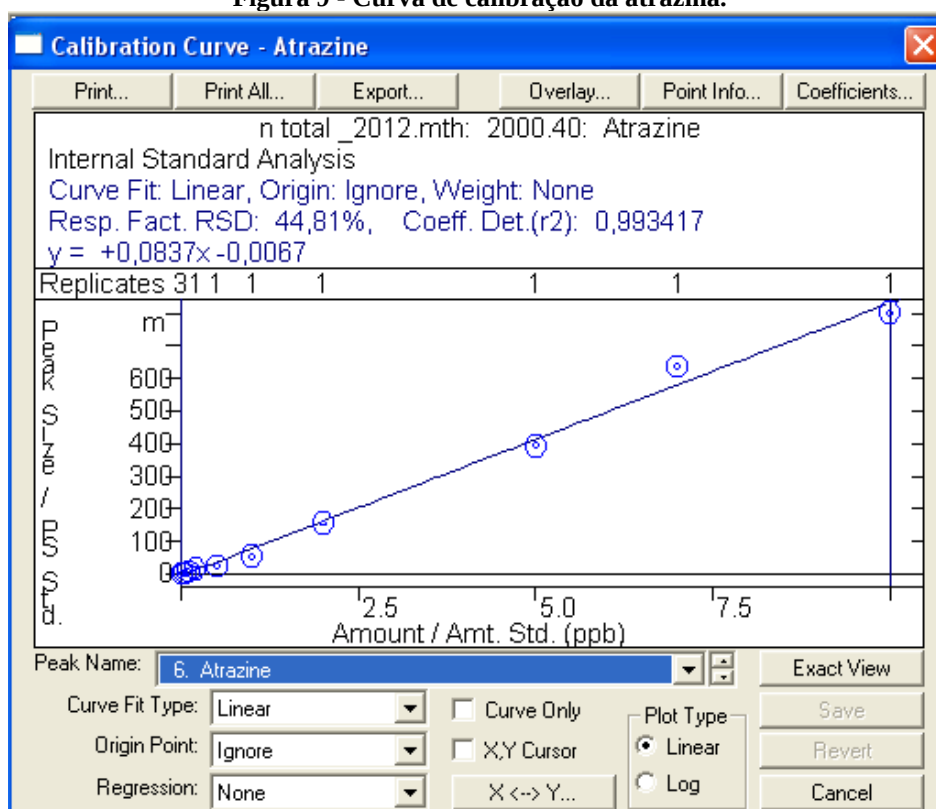
Parâmetros (MS)	Variáveis
Tempo de aquisição	Fil/Mul delay: 4,50 min Tempo de aquisição: 4,5 a 25 min
Íon scan range m/z	55 a 510
Tempo de scan	0,50 segundos por scan
Voltagem multiplier	± 1500 mV
Corrente do filamento	10 µA
Target TIC	20000 counts

Fonte: Pesquisa da autora

Figura 8 - Perfil cromatográfico da atrazina.

Fonte: Pesquisa da autora

Figura 9 - Curva de calibração da atrazina.



Fonte: Pesquisa da autora

5.11 EXTRAÇÃO DA ATRAZINA EM FASE SÓLIDA

Para extração do herbicida atrazina das amostras, foi empregada a técnica de extração em fase sólida (SPE), utilizando-se cartuchos C18 em tubo de polietileno com capacidade para 3 mL.

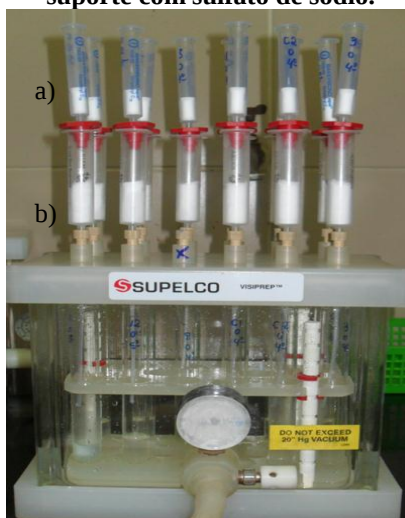
A extração consiste na interação do analito com a fase estacionária e com os solventes, realizado em três passos: retenção do analito no material adsorvente com a fase estacionária, eluição com solvente apropriado (acetato de etila e cloreto de metileno) com força suficiente para quebrar a interação dos analitos com a fase e por último a concentração da amostra para 1 mL. O eluato foi armazenado em frascos de vidro âmbar, com capacidade para 2 mL, a $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises cromatográficas.

No processo de extração foi utilizado 1 mL da amostra retirada do experimento no meio líquido, acidificada com ácido clorídrico 1:1 para pH final $\leq 2,0$ e transferida para o cartucho de extração. Logo após este processo, os cartuchos foram eluídos com 3 mL de acetato de etila e 3 mL de diclorometano, passando pelo suporte contendo sulfato de sódio PA, com o objetivo de retirar umidade e impurezas presentes na amostra (Figura 10).

Para evitar os interferentes no processo de extração da atrazina, foram utilizados solventes e reagentes com grau de pureza compatível com as análises por cromatografia.

O desempenho do método foi verificado utilizando o padrão de controle, que foi preparado utilizando padrão primário de atrazina da marca Ultra Scientific, acompanhado de certificado de análise e pela porcentagem de recuperação do padrão após o processo de extração. As contaminações provenientes da atmosfera do laboratório, vidrarias, reagentes, foram controladas com teste do reagente branco, que consiste em uma alíquota de água purificada que passa exatamente pelo mesmo procedimento da amostra, incluindo exposição a toda vidraria, equipamento, solventes e reagentes.

Figura 10 – Procedimento da extração da atrazina por meio da técnica SPE, a) cartucho de extração b) suporte com sulfato de sódio.



Fonte: Pesquisa da autora

5.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a análise dos dados obtidos nos ensaios com os meios de cultura sólido e líquido, foi aplicada a estatística descritiva e de dispersão (valores máximos, médios e desvio padrão, coeficiente de variação), da Microsoft Excel versão 97/2000/XP.

Para avaliar a relação entre a biomassa e a produção de enzimas foi aplicado a correlação de Pearson, e posteriormente uma regressão linear simples. Na verificação da remoção de atrazina entre as espécies dos fungos utilizados bem como a comparação entre a produção de enzimas foi utilizado o teste t de student e o teste F.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 EXPERIMENTOS EM MEIO DE CULTURA SÓLIDO – ETAPA 01

A Tabela 1 apresenta a média dos valores de crescimento radial (VCR mm.dia⁻¹) e a classificação do aspecto morfológico do micélio de cada espécie estudada, em diferentes condições nutricionais (BDA padrão, BDA 40% e BDA 0%) e variações na concentração da atrazina 100 mg.L⁻¹ e 500 mg.L⁻¹.

Aproximadamente 90% dos resultados das três repetições apresentaram coeficiente de variação baixo (CV%) $\leq 10\%$, demonstrando repetitividade e reprodutividade dos experimentos.

Tabela 1 - Crescimento e morfologia dos fungos submetidos a diferentes condições nutricionais na presença da atrazina (ATZ 100 e ATZ 500) e na ausência da atrazina (controle).

Fungos	Média VCR(mm.dia⁻¹)			Aspecto morfológico do micélio		
	controle	ATZ 100	ATZ 500	controle	ATZ 100	ATZ 500
BDA PADRÃO						
Tvi	15,00	11,25	4,50	S	S	S
Le	7,50	5,63	3,34	S	S	S
Ps	6,43	5,00	2,26	S	S	S
PL sp	4,10	3,20	2,80	S	S	S
PL os	5,62	4,11	1,90	S	S	S
BDA 40%	Média VCR(mm.dia⁻¹)			Aspecto morfológico do micélio		
	controle	ATZ 100	ATZ 500	controle	ATZ 100	ATZ 500
Tvi	15,00	15,00	9,00	S	S	S
Le	7,50	6,43	5,00	S	S	S
Ps	6,43	5,63	3,19	S	S	S
PL sp	3,00	3,50	2,30	S	S	S
PL os	5,00	4,50	2,80	S	S	S
BDA 0%	Média VCR(mm.dia⁻¹)			Aspecto morfológico do micélio		
	controle	ATZ 100	ATZ 500	controle	ATZ 100	ATZ 500
Tvi	15,00	15,00	6,13	I	I	I
Le	5,00	5,00	4,09	I	I	I
Ps	5,63	5,00	3,00	I	I	I
PL sp	1,90	2,40	1,80	I	I	I
PL os	3,20	3,20	2,40	I	I	I

Legenda: VCR: Velocidade de Crescimento Radial; S: Satisfatório; I: Insatisfatório; Tvi: *Trametes villosa*; Le: *Lentinus edodes*; Ps: *Pycnosporus sanguineus*; Plos: *Pleurotus ostreatus*; Plsp: *Pleurotus* sp; ATZ 100: atrazina 100 mg.L⁻¹; ATZ 500: atrazina 500 mg.L⁻¹.

Os micro-organismos cresceram em cada condição nutricional a que foram submetidos, porém a morfologia e o desenvolvimento micelial não foram satisfatórios no meio suplementado com dextrose como fonte de carbono (BDA 0%), independente da

presença ou ausência da atrazina, quando comparado ao grupo-controle (Figura 11). Resultados semelhantes foram verificados em estudos realizados por Jardim (2010) com os micro-organismos: *Trametes versicolor*, *Trametes villosa*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pycnosporus sanguineus* e *Lentinus edodes*, com BDA 0% nas concentrações de acefato de 10% e 50%.

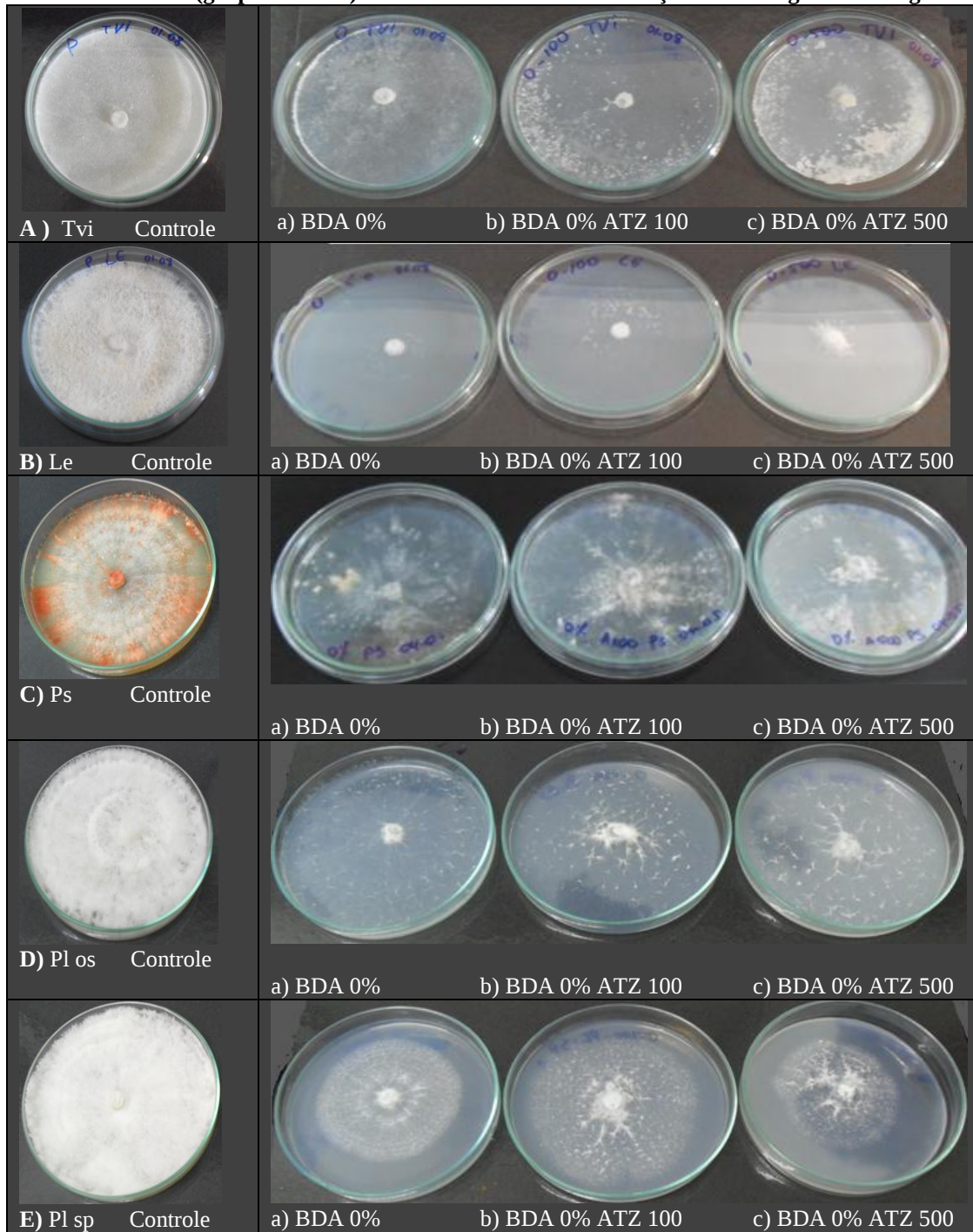
Os dados indicam que os meios de cultura contendo somente dextrose e atrazina como fonte de carbono, nitrogênio e sais minerais foram suficientes para o crescimento, porém insuficientes para o desenvolvimento satisfatório do micélio.

Os cinco micro-organismos estudados apresentaram crescimento na presença da atrazina, o que sugere, de forma geral, uma adaptação à toxicidade do herbicida nas duas concentrações avaliadas, porém o crescimento foi reduzido quando comparado com o grupo-controle. Resultados semelhantes foram obtidos por Guimarães (2009) em estudos com fungos isolados em sistema de tratamento de efluentes de indústria petroquímica, com meios de cultura suplementados com hidrocarbonetos aromáticos.

Os melhores resultados obtidos com os meios suplementados com atrazina 100 mg.L⁻¹ e 500 mg.L⁻¹ foram no meio de cultura BDA 40%, os quais apresentaram média VCR (mm.dia⁻¹) maior quando comparado aos meios BDA padrão e BDA 0%. Os mesmos demonstraram sofrer maior impacto na velocidade do crescimento na presença da atrazina 500 mg.L⁻¹, indicando que esta concentração é um interferente de crescimento, devido a toxicidade, por isso esta concentração não foi utilizada nos experimentos em meio de cultura líquido.

Colla et al. (2008) obtiveram VCRs de 1,57 mm.dia⁻¹ e 1,28 mm.dia⁻¹ com fungos *Aspergillus* e *Penicillium*, isolados de solo contaminado com atrazina 50 mg.L⁻¹ e atrazina adicionado de simazina, respectivamente, indicando esses micro-organismos como potenciais biorremediadores de solos contaminados com herbicidas triazínicos. Os valores da velocidade de crescimento radial (VCR) apresentados na Tabela 1, variaram de 1,8 mm.dia⁻¹ a 15 mm.dia⁻¹, evidenciando também a possibilidade de utilização desses fungos em biorremediação de águas contaminadas com atrazina.

Figura 11- Aspectos morfológicos dos micélios dos fungos no meio de cultura BDA 0% sem adição de atrazina (grupo controle) e com atrazina nas concentrações de 100mg.L⁻¹ e 500mg.L⁻¹.



Legenda: Tvi: *Trametes villosa*; Le: *Lentinus edodes*; Ps: *Pycnosporus sanguineus*; Pl os: *Pleurotus ostreatus*; Plsp: *Pleurotus sp*; ATZ 100: atrazina 100 mg.L⁻¹; ATZ 500: atrazina 500 mg.L⁻¹.

6.1.1 Resultados dos experimentos com o fungo *Trametes villosa*

Os resultados obtidos dos experimentos realizados com a espécie *Trametes villosa* estão apresentados na Figura 12. Este micro-organismo se destaca dos demais pela velocidade de crescimento diário. Após 72 horas de incubação, ocorreu a colonização de toda a superfície da placa contendo o meio de cultura, nas três condições nutricionais testadas, sem adição de atrazina.

A mesma velocidade de crescimento foi observada no meio de cultura BDA 40% e BDA 0% com adição de atrazina 100 mg.L^{-1} , demonstrando capacidade de adaptação do micro-organismo ao herbicida nesta concentração, já o mesmo comportamento não foi observado no meio de cultura BDA padrão com atrazina 100 mg.L^{-1} , que levou um tempo maior, aproximadamente 24 horas, para crescimento total na placa.

As maiores velocidades de crescimento foram observadas no grupo-controle, sem adição de atrazina, observada principalmente no segundo dia de cultivo, no meio BDA 40%, em seguida nos meios BDA padrão e BDA 0%. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos realizados com o gênero *Trichoderma* por Bordjiba et al. (2001), os quais observaram que o crescimento do micro-organismo foi inibido na presença de pesticidas.

Com adição de atrazina a 100 mg.L^{-1} e 500 mg.L^{-1} , os melhores resultados foram na condição nutricional BDA 40%. O crescimento foi mais lento nos meios contendo ATZ 500, principalmente no meio de cultivo BDA padrão, nesta condição o micro-organismo completou o tamanho total da placa no décimo dia de cultivo e no meio BDA 0% este tempo foi de sete dias. Estes resultados demonstram que a presença do herbicida nesta concentração interfere no crescimento independente do meio de cultivo utilizado, porém não inibe.

A Figura 13 apresenta o aspecto morfológico dos micélios do fungo *Trametes villosa*, cultivados nos meios de cultura BDA padrão e BDA 40%, sem adição de atrazina, grupo-controle, e com adição de atrazina nas concentrações de 100 mg.L^{-1} e 500 mg.L^{-1} . Observa-se o desenvolvimento micelial satisfatório, nestas condições avaliadas, demonstrando mais vez a capacidade de adaptação desta espécie na presença do herbicida.

Figura 12 - Gráfico do crescimento de *Trametes villosa* com variação dos nutrientes e da concentração da atrazina (ATZ100) e (ATZ 500).

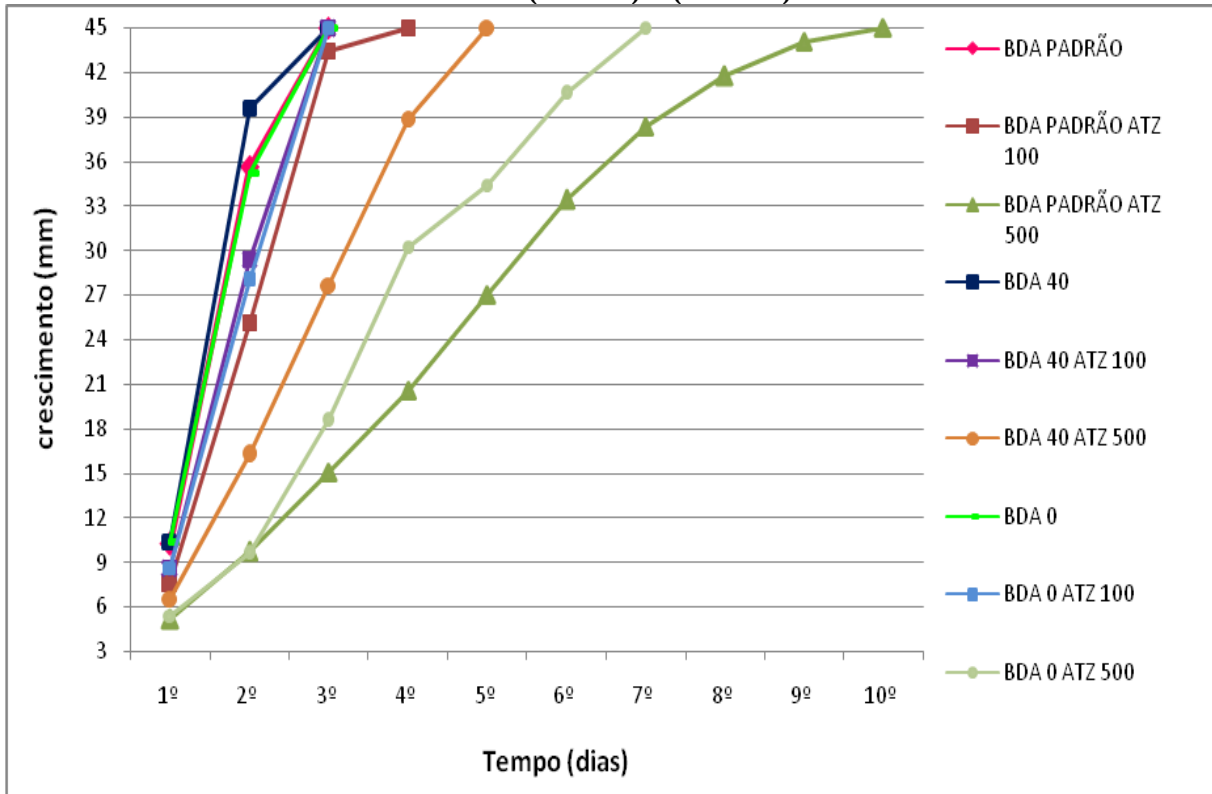
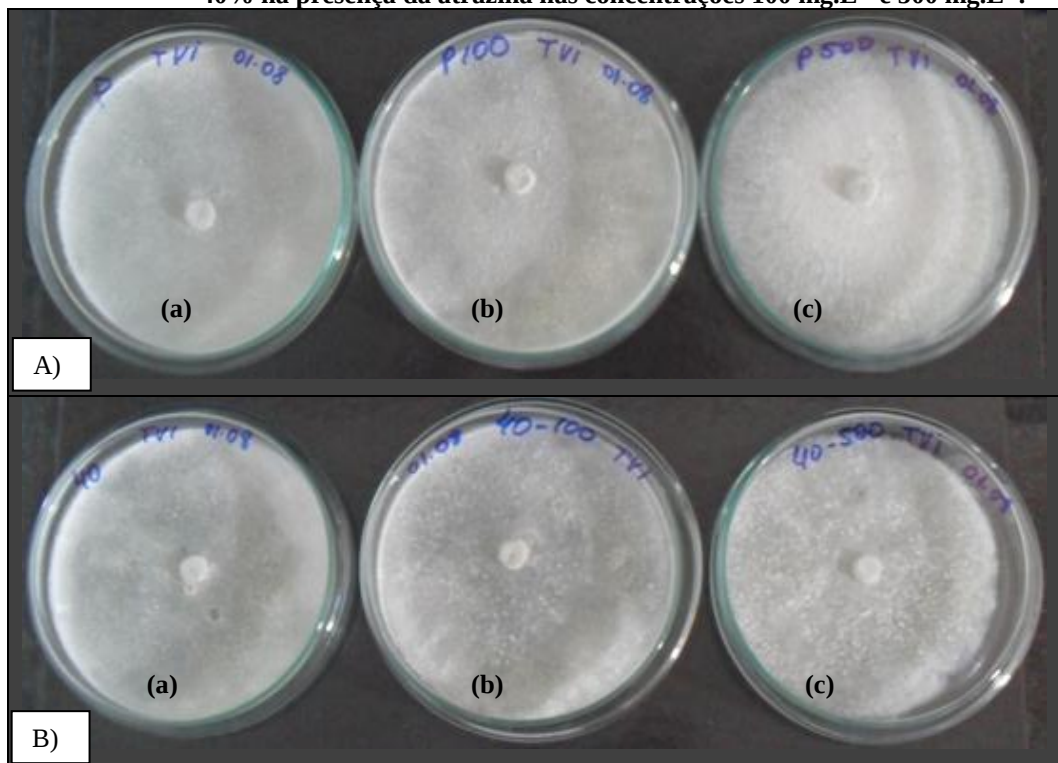


Figura 13 - Desenvolvimento micelial do fungo *Trametes villosa* nos meios de cultivo BDA padrão e BDA 40% na presença da atrazina nas concentrações 100 mg.L⁻¹ e 500 mg.L⁻¹.



Legenda: A) Condição nutricional BDA padrão; B) Condição nutricional BDA 40%; (a) controle (sem adição de atrazina); (b) ATZ 100; (c) ATZ 500.

6.1.2 Resultados dos experimentos com o fungo *Lentinus edodes*

A Figura 14 apresenta os resultados dos experimentos com o fungo *Lentinus edodes*. Nos meios de cultura BDA padrão e BDA 40%, as velocidades de crescimento do grupo controle foram semelhantes, aproximadamente em 6 dias de cultivo o micélio fúngico alcançou o tamanho total das placas. No meio de cultura BDA 0% o tempo necessário de cultivo foi de 9 dias, evidenciando que a redução de nutrientes impacta na velocidade de crescimento radial.

A espécie *Lentinus edodes* foi capaz de crescer no meio de cultivo contendo somente dextrose e atrazina como fonte de carbono e nitrogênio, entretanto, a adição de caldo de batata (BDA 40% e BDA padrão) possibilitou maior velocidade de crescimento do fungo, principalmente na condição nutricional BDA 40%. No terceiro dia de cultivo apresentou VCR de 23,30 mm.dia⁻¹, no meio BDA 40%, 20,33 mm.dia⁻¹ em BDA padrão, enquanto que no meio BDA 0% o crescimento foi de 17,69 mm.dia⁻¹.

Kodama et al. (2001) testaram o crescimento do fungo *Penicillium steckii* DS6F, em meio de cultivo contendo apenas simazina como fonte de nutriente e também observaram que o fungo desenvolveu-se nessa condição, porém com adição de extrato de levedura houve maior crescimento do fungo.

Os melhores resultados da velocidade de crescimento do fungo, com atrazina na concentração de 100 mg.L⁻¹, foram obtidos no meio de cultura BDA 40%, no sétimo dia de cultivo completou o tamanho total das placas, no meio de cultura BDA padrão este tempo foi de 8 dias e no meio BDA 0% demorou 9 dias.

Os resultados dos experimentos com atrazina na concentração de 500 mg.L⁻¹, foram semelhantes aos obtidos com o micro-organismo *Trametes villosa*, ou seja, diminuiu a velocidade do crescimento quando comparada às demais condições, principalmente com meio de cultura BDA padrão, nesta condição não foi observado o crescimento fúngico após o décimo terceiro dia de cultivo.

Em relação ao desenvolvimento micelial, os resultados também foram satisfatórios nos grupos-controle do meio de cultura BDA padrão e BDA 40% e com adição de atrazina 100mg.L⁻¹ e 500 mg.L⁻¹ (Figura 15).

Figura 14 - Gráfico do crescimento do micro-organismo *Lentinus edodes*, com variação dos nutrientes e de atrazina 100 mg.L⁻¹ e atrazina 500 mg.L⁻¹.

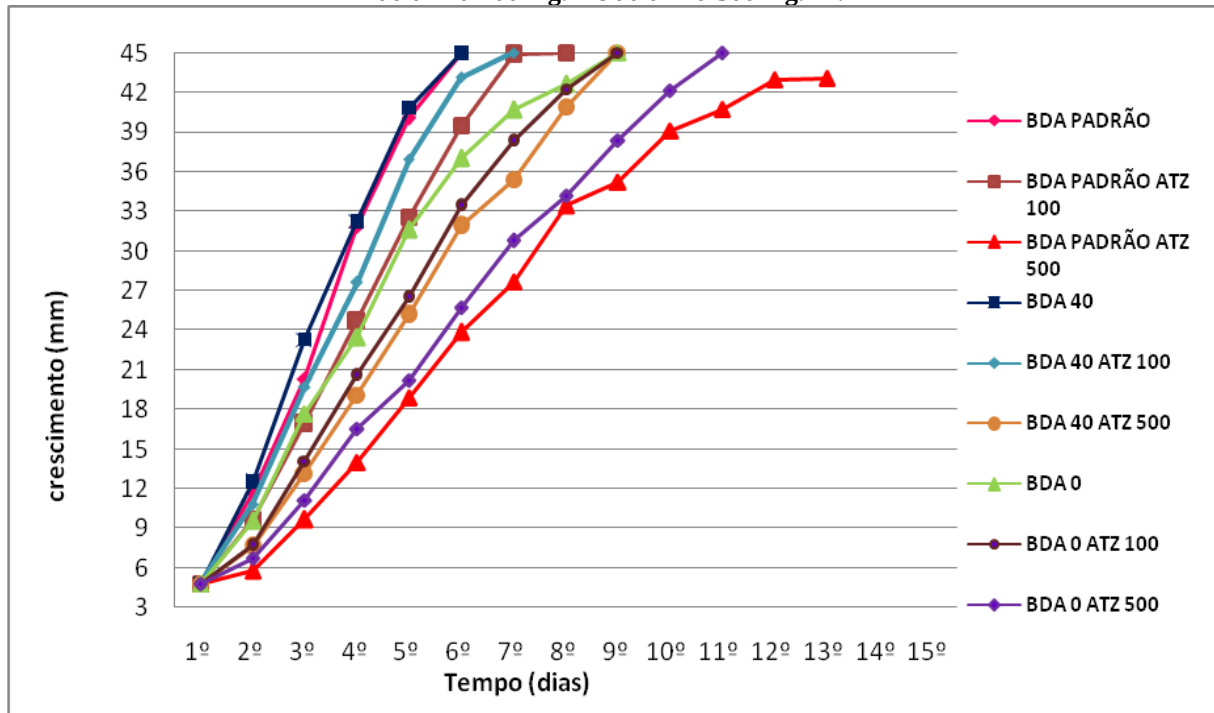
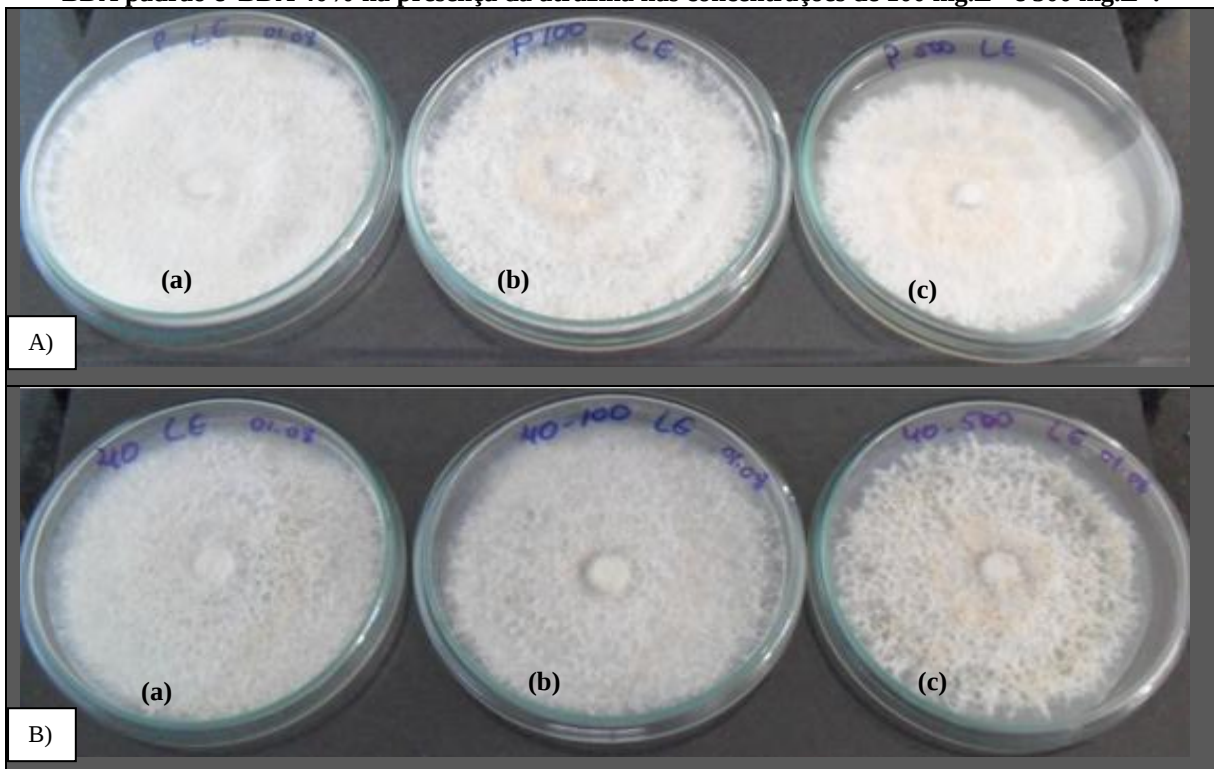


Figura 15 - Aspecto morfológico do micélio de *Lentinus edodes* no 8º dia de cultivo nos meios de cultivo BDA padrão e BDA 40% na presença da atrazina nas concentrações de 100 mg.L⁻¹ e 500 mg.L⁻¹.



Legenda: A) Condição nutricional BDA padrão; B) Condição nutricional BDA 40%; (a) controle (sem adição de atrazina); (b) ATZ 100; (c) ATZ 500.

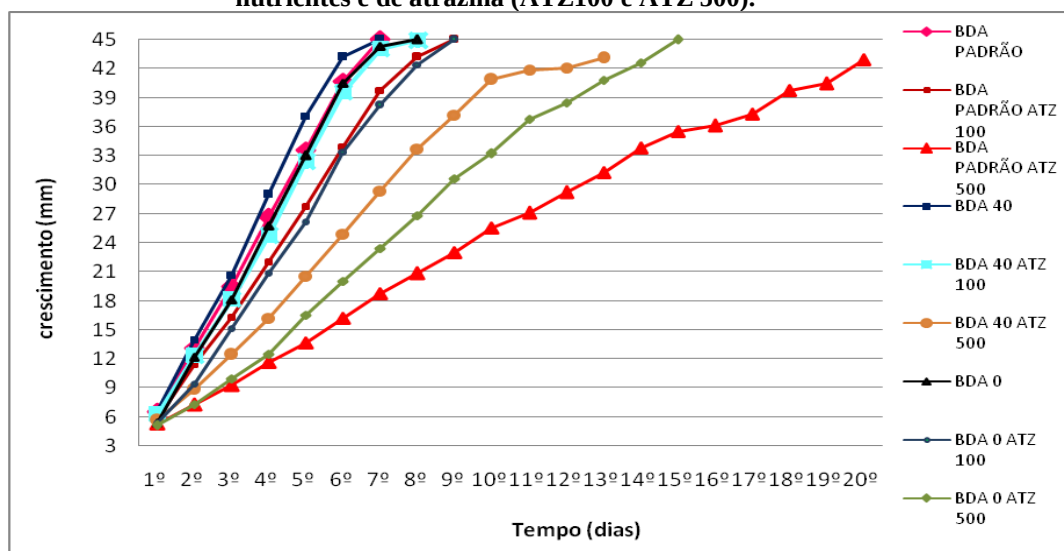
6.1.3 Resultados dos experimentos com o fungo *Pycnosporus sanguineus*

O gráfico do crescimento do micro-organismo *Pycnosporus sanguineus*, com variação dos nutrientes e de atrazina (ATZ100 e ATZ 500) está apresentado na Figura 16. Esta espécie alcançou o tamanho total das placas no oitavo dia de cultivo nos meios de cultura BDA padrão, BDA 40% e BDA 0% sem adição da atrazina, evidenciando que a redução de nutrientes não teve impacto no crescimento.

Não houve inibição do crescimento deste micro-organismo na presença do herbicida nas duas concentrações testadas (ATZ 100 e ATZ 500), apesar da resposta de crescimento ter sido diferente. Apresentou melhor VRC na concentração de atrazina 100 mg.L⁻¹ com destaque no meio BDA 40%. Resultados semelhantes foram obtidos por Garcia (2006), em estudos com quatro corantes pertencentes ao grupo azo, utilizados na indústria farmacêutica e/ou alimentícia e seus efeitos no crescimento do fungo *Pycnosporus sanguineus*, concluiu que nenhum dos corantes testados inibiram o crescimento-desenvolvimento micelial, demonstrando que este micro-organismo tem boa capacidade de adaptação em presença de compostos xenobióticos.

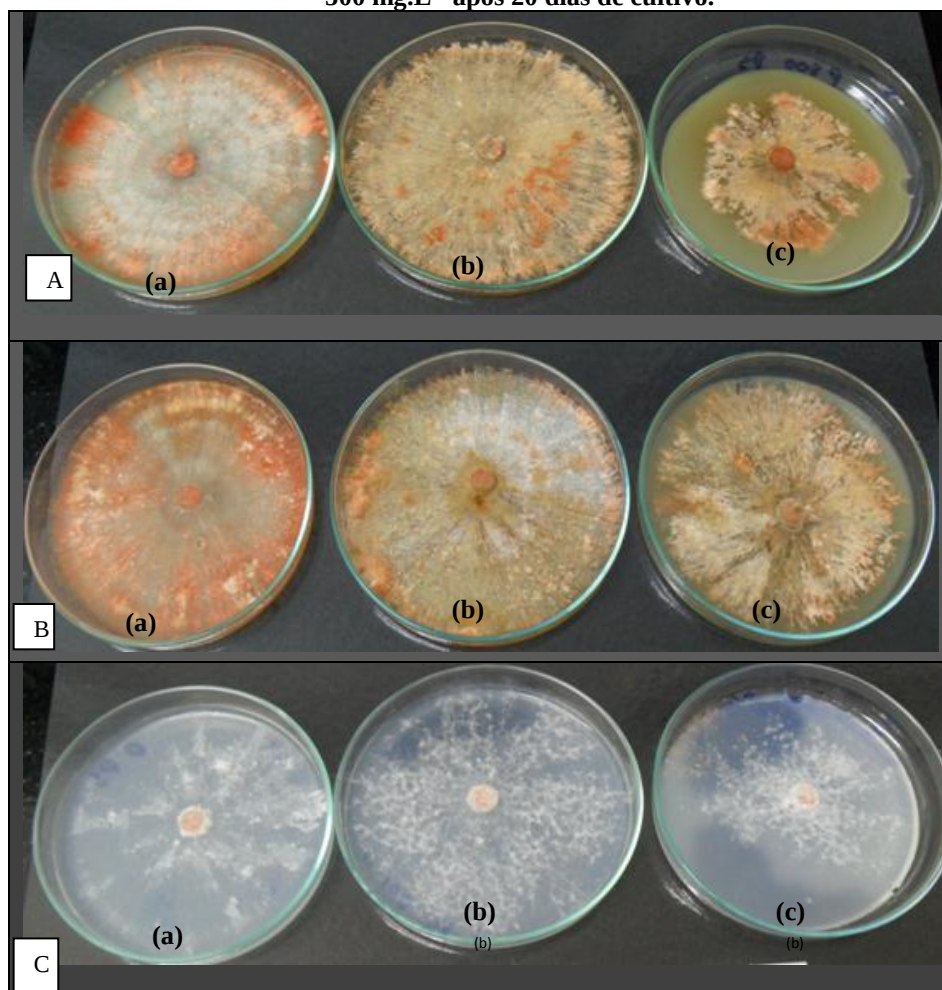
Na concentração atrazina 500mg.L⁻¹, nas três condições nutricionais (BDA padrão, BDA 40% e BDA 0%) o crescimento foi menor quando comparado ao grupo-controle e ao grupo com ATZ 100. Durante o período de avaliação, nesta concentração o fungo não alcançou o tamanho total das placas, sendo que a melhor condição avaliada foi em BDA 40% e a pior condição avaliada foi em BDA padrão.

Figura 16 - Gráfico do crescimento do micro-organismo *Pycnosporus sanguineus*, com variação dos nutrientes e de atrazina (ATZ100 e ATZ 500).



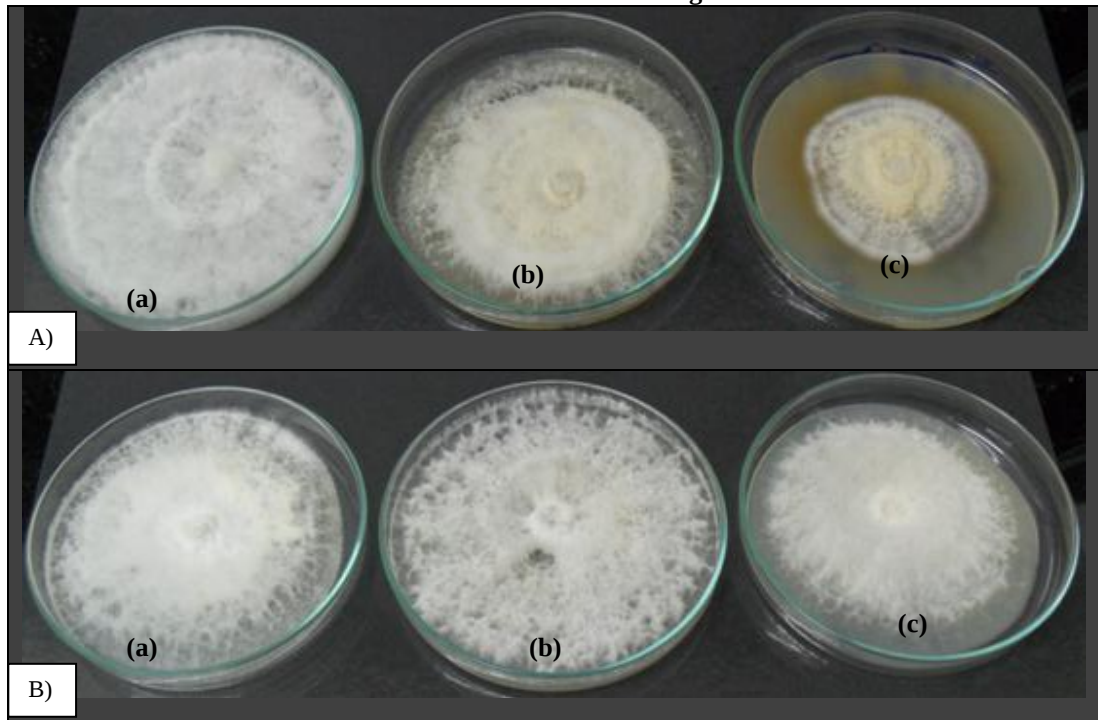
O desenvolvimento do micélio foi satisfatório na condição nutricional BDA padrão e BDA 40% tanto no grupo-controle como nos grupos com adição de atrazina 100 mg.L⁻¹ e 500 mg.L⁻¹, porém a concentração de 500 mg.L⁻¹ interferiu no crescimento do fungo, no vigésimo dia de cultivo, final do período do experimento, não apresentou a colonização em toda a superfície do meio de cultura. O crescimento do fungo ocorreu também no meio de cultivo BDA 0%, porém o aspecto do micélio fúngico foi insatisfatório no grupo controle e nos grupos ATZ 100 e ATZ 500 (Figura 17). Os resultados indicam que o fungo recebeu maior impacto no crescimento e desenvolvimento pela redução de nutrientes e não pela presença do herbicida.

Figura 17- Aspecto morfológico do micélio do fungo *Pycnosporus sanguineus* na presença da atrazina 500 mg.L⁻¹ após 20 dias de cultivo.



Legenda: A) Condição nutricional BDA padrão; B) Condição nutricional BDA 40%; C) Condição nutricional BDA 0%; (a) grupo controle; (b) ATZ 100; (c) ATZ 500.

Figura 19 - Aspecto satisfatório do micélio de *Pleurotus ostreatus* e limitação do crescimento na presença da atrazina 500 mg.L⁻¹



Legenda: A) Condição nutricional BDA padrão; B) Condição nutricional BDA 40%; (a) grupo controle; (b) ATZ 100; (c) ATZ 500.

6.1.5 Resultados dos experimentos com o fungo *Pleurotus* sp

O fungo *Pleurotus* sp foi a espécie que menos se destacou em relação à velocidade de crescimento radial quando comparada aos outros micro-organismos avaliados (Tabela 1), sendo considerado micro-organismo de desenvolvimento lento.

As Figuras 20 e 21 apresentam os resultados dos experimentos com a espécie *Pleurotus* sp. O comportamento foi semelhante ao *Pleurotus ostreatus*, ou seja, desenvolveu-se melhor na condição máxima de nutrição (BDA padrão), apresentou diminuição do crescimento com redução da oferta de nutrientes.

Este micro-organismo foi o que apresentou melhores resultados nos meios de cultura BDA padrão, BDA 40% e BDA 0% com adição de atrazina na concentração 100 mg.L⁻¹ quando comparados ao grupo-controle e com as demais espécies avaliadas, apresentou maior velocidade de crescimento, demonstrando que o fungo adaptou-se à toxicidade da atrazina e utilizou a mesma como fonte de nutriente.

Figura 20 - Gráfico do crescimento do *Pleurotus* sp, com variação dos nutrientes e de atrazina (ATZ100 e ATZ 500).

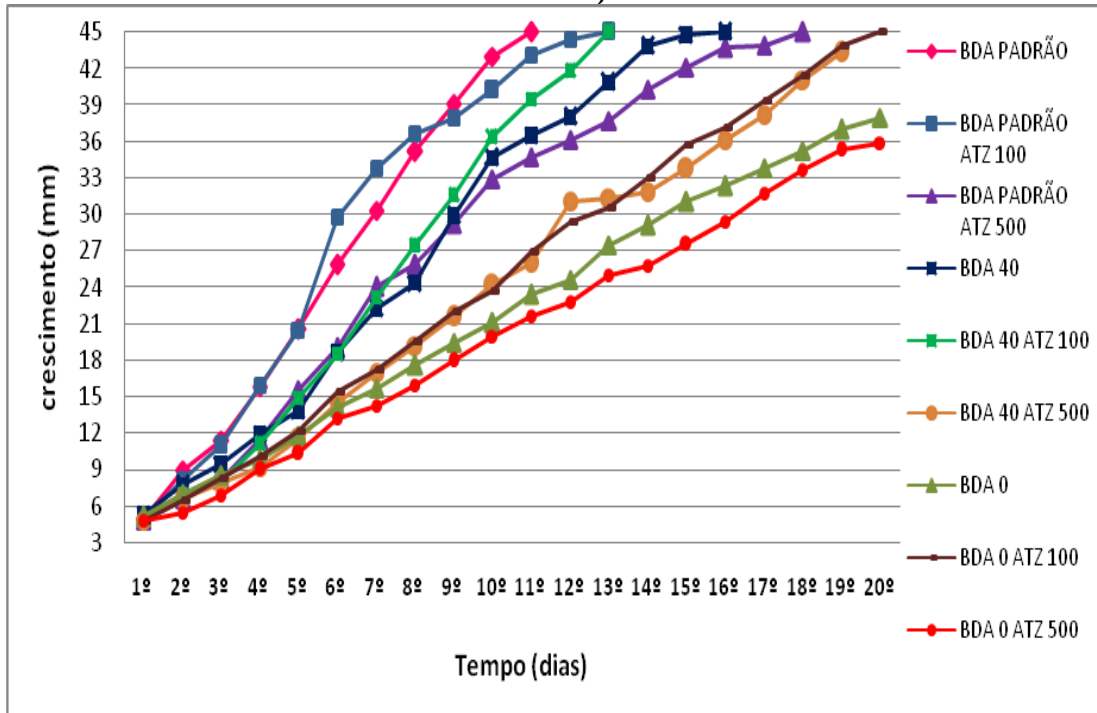
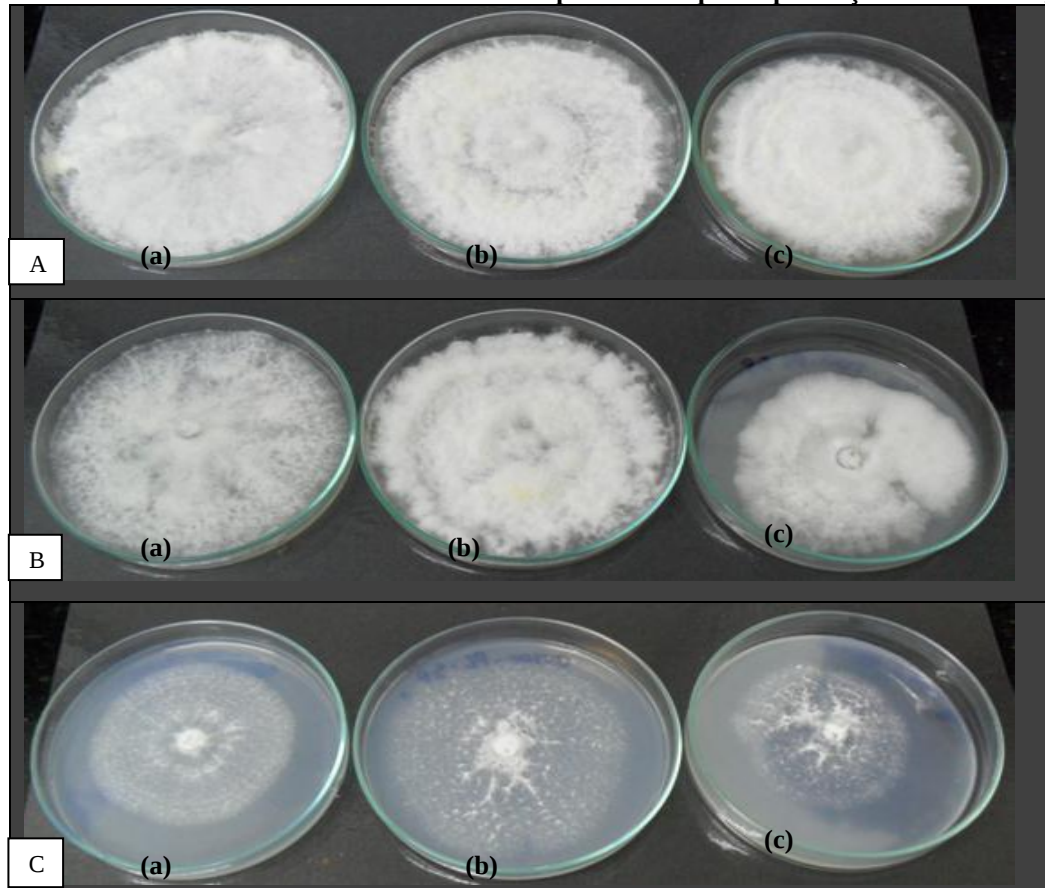


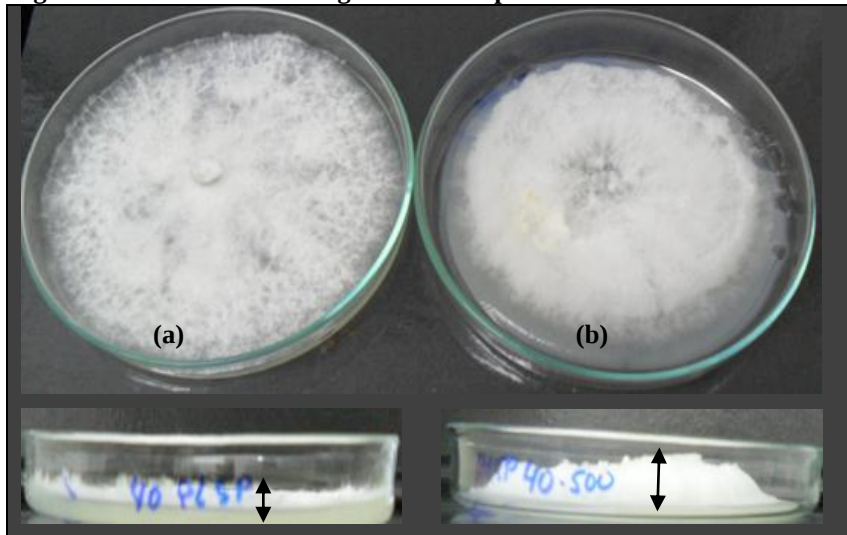
Figura 21 - Resultados do crescimento do *Pleurotus* sp com destaque na presença da ATZ 100 mg.L⁻¹.



Legenda: A) Condição nutricional BDA padrão; B) Condição nutricional BDA 40%; C) Condição nutricional BDA 0%; (a) grupo controle; (b) ATZ 100; (c) ATZ 500.

Com atrazina 500 mg.L^{-1} , os melhores resultados obtidos foram em BDA padrão, posteriormente BDA 40% e por último BDA 0%. Aparentemente, houve um aumento da biomassa em BDA 40% com ATZ 500, quando comparado a biomassa no meio BDA 40% sem adição de atrazina, demonstrando mais uma vez a capacidade de adaptação do fungo na presença do herbida em altas concentrações (Figura 22).

Figura 22 - Biomassa do fungo *Pleurotus* sp em meio de cultura BDA 40%



Legenda: (a) grupo controle; (b) grupo contendo atrazina na concentração de 500 mg.L^{-1}

6.2 EXPERIMENTOS EM MEIO DE CULTURA SÓLIDO COM ABTS 0,02% - ETAPA 02

Os micro-organismos cresceram em cada condição nutricional a que foram submetidos, pH do meio de cultura a 4,5 e com adição do substrato ABTS (2,2 –Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6 – ácido sulfônico) diamônia) na concentração de 0,02%.

Foi evidenciada a presença de enzimas lignocelulolíticas com aparecimento de coloração lilás nos meios de cultura contendo caldo de batata (BDA padrão e BDA 40%) e coloração esverdeada no meio de cultura BDA 0%.

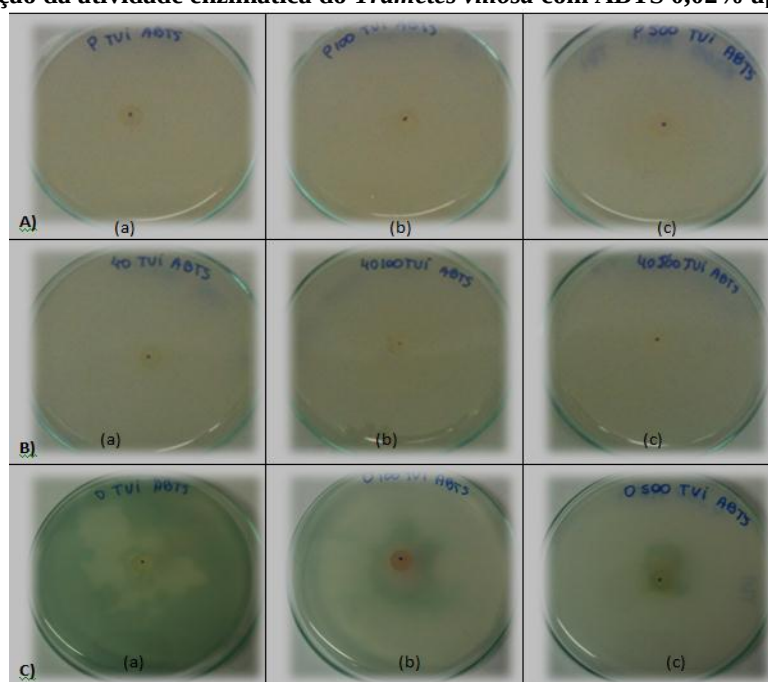
As espécies *Pycnosporus sanguineus*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus* sp, apresentaram os melhores resultados referentes à produção de enzimas ligninolíticas, por isso a escolha destes para os ensaios em meio de cultura líquido, etapa 03.

6.2.1 Avaliação da atividade enzimática dos fungos *Trametes villosa* e *Lentinus edodes*

As espécies *Trametes villosa* e *Lentinus edodes* apresentaram comportamentos semelhantes, com crescimento e desenvolvimento micelial satisfatórios nos meios de cultura contendo ABTS 0,02% (BDA padrão, BDA 40% e BDA 0%), na presença da atrazina 100 mg.L⁻¹ e 500 mg.L⁻¹. Só foi evidenciada a atividade enzimática após 4 dias de cultivo, diferindo das demais espécies avaliadas que apresentaram o halo de coloração após 24 horas, razão por que não foram selecionadas para os ensaios em meio de cultura líquido.

Segundo Yamanaka et al. (2008), o fungo *Trametes villosa* é uma linhagem com comprovado potencial biotecnológico para degradação de compostos organoclorados e de corantes têxteis, os resultados obtidos por eles, na quantificação de enzimas ligninolíticas produzidas por *Trametes villosa* (CCB176) em diferentes condições de cultivo, mostraram a atividade da lacase, durante todo o período avaliado, independente da fase de crescimento, diferindo, assim, dos resultados obtidos neste estudo com o micro-organismo *Trametes villosa* (CCT – 5567), que produziu enzimas apenas no meio de cultura BDA 0%, com melhores resultados no grupo sem adição de atrazina, durante o período avaliado não foi observada atividade enzimática nas demais condições (Figura23).

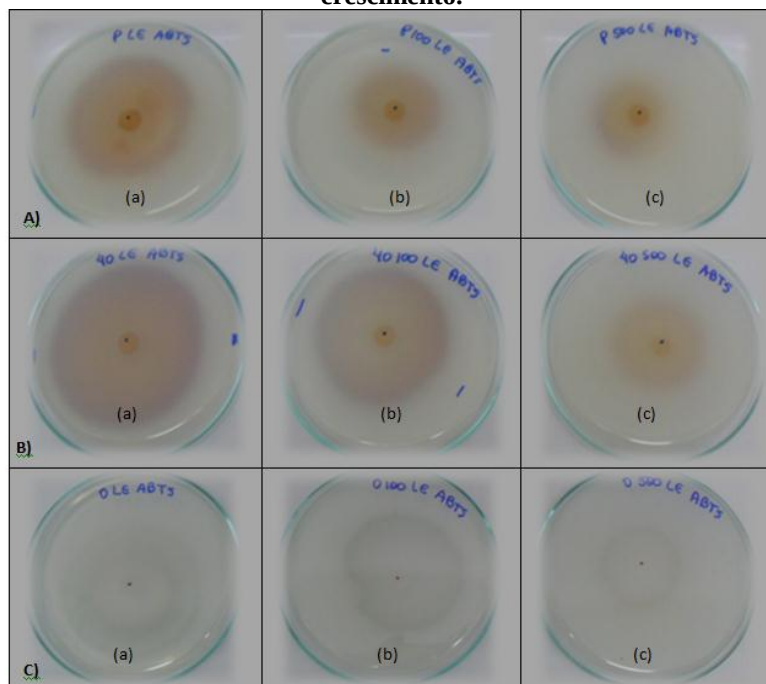
Figura 23 - Avaliação da atividade enzimática do *Trametes villosa* com ABTS 0,02% após 4 dias de cultivo.



Legenda: A) BDA padrão; B) BDA 40%; C) BDA 0%; (a) controle; (b) ATZ 100; (c) ATZ 500.

Para a espécie *Lentinus edodes*, o aparecimento da coloração ocorreu nas três condições nutricionais e na presença da atrazina 100 mg.L⁻¹ e 500 mg.L⁻¹, evidenciando-se mais nos grupo-controle e em seguida com ATZ 100. A coloração mais intensa foi observada no meio de cultura BDA 40%, após 6 dias de incubação (Figura 24). No grupo-controle, o tamanho dos halos de coloração no meio de cultura BDA padrão foram menores (26,5 mm) que nos meios de cultura BDA 40% (34,6 mm) e BDA 0% (31,6 mm). O mesmo foi observado nos grupos contendo atrazina 100 mg.L⁻¹, com as seguintes medidas: BDA padrão (20,5 mm), BDA 40% (30,5 mm) e BDA 0% (26,4 mm).

Figura 24 - Avaliação da atividade enzimática do *Lentinus edodes* com ABTS 0,02% após 6 dias de crescimento.



Legenda: A) BDA padrão; B) BDA 40%; C) BDA 0% ; (a) controle; (b) ATZ 100; (c) ATZ 500.

6.2.2 Avaliação da atividade enzimática dos fungos *Pycnosporus sanguineus*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus* sp

Foi evidenciado o complexo enzimático dos fungos *Pycnosporus sanguineus*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus* sp após 24 horas de incubação em estufa a 28°C $\pm$ 2°C nos meios de cultura (BDA padrão, BDA 40% e BDA 0%) acrescido do substrato ABTS 0,02% com ajuste do pH a 4,5.

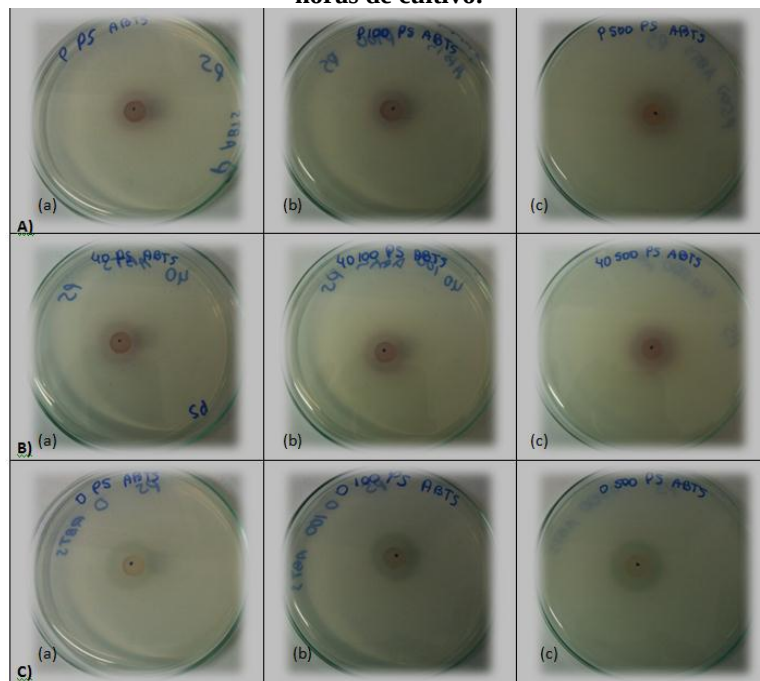
O aparecimento da coloração foi observado nos grupos-controle e com adição de atrazina 100 mg.L^{-1} e 500 mg.L^{-1} , com destaque da espécie *Pycnosporus sanguineus* que após 24 horas de cultivo apresentou o diâmetro do halo indicador da presença de enzimas maior (10,1 mm) que os diâmetros das espécies *Pleurotus ostreatus* (8,2 mm) e *Pleurotus* sp (8,2 mm) Figuras 25 e 26.

A coloração mais intensa dos halos foi observada nos experimentos com *Pycnosporus sanguineus*, principalmente com o meio de cultura BDA 40% com atrazina 500 mg.L^{-1} (28,2 mm), porém os maiores diâmetros foram observados, em BDA 40% grupo-controle (45 mm) e atrazina 100 mg.L^{-1} (41,2 mm) . Após 6 dias de crescimento, a coloração atingiu o tamanho total das placas (Figura 27). Resultados semelhantes foram obtidos por Jardim (2010), que também verificou o aparecimento de forte coloração em experimentos realizados com ABTS 0,02% com *Pycnosporus sanguineus* na presença de acefato 10% e 50%.

As espécies *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus* sp apresentaram atividade enzimática nas três condições nutricionais com ou sem a presença da atrazina, sendo que a primeira espécie, tanto no grupo-controle como no grupo contendo atrazina 100 mg.L^{-1} , apresentou o diâmetro da coloração maior e mais intenso, após oitavo dia de cultivo, nos meios BDA padrão (40,5 mm) e BDA 40% (41,2 mm), BDA padrão com ATZ100 (28,8) e BDA 40% com ATZ100 (32,8 mm) quando comparado a espécie *Pleurotus* sp, BDA padrão (28,9 mm) e BDA 40% (27 mm), BDA padrão com ATZ100 (25,4 mm) e BDA 40% com ATZ100 (25,5 mm), com destaque de produção no meio de cultivo BDA 40% (Figura 28).

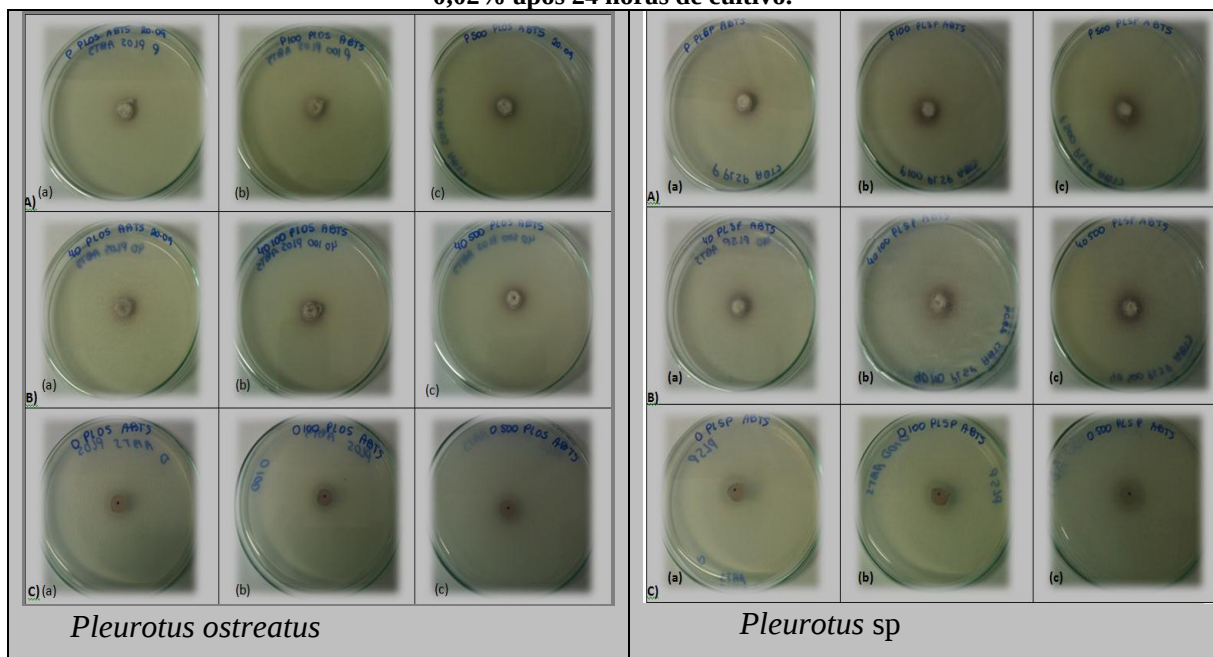
O gênero *Pleurotus* é um produtor natural de lacase e devido à capacidade de produzir enzimas é agente potencial de digestão de compostos recalcitrantes (MANTOVANI et al., 2012).

Figura 25 - Avaliação da atividade enzimática do *Pycnosporus sanguineus* com ABTS 0,02% após 24 horas de cultivo.



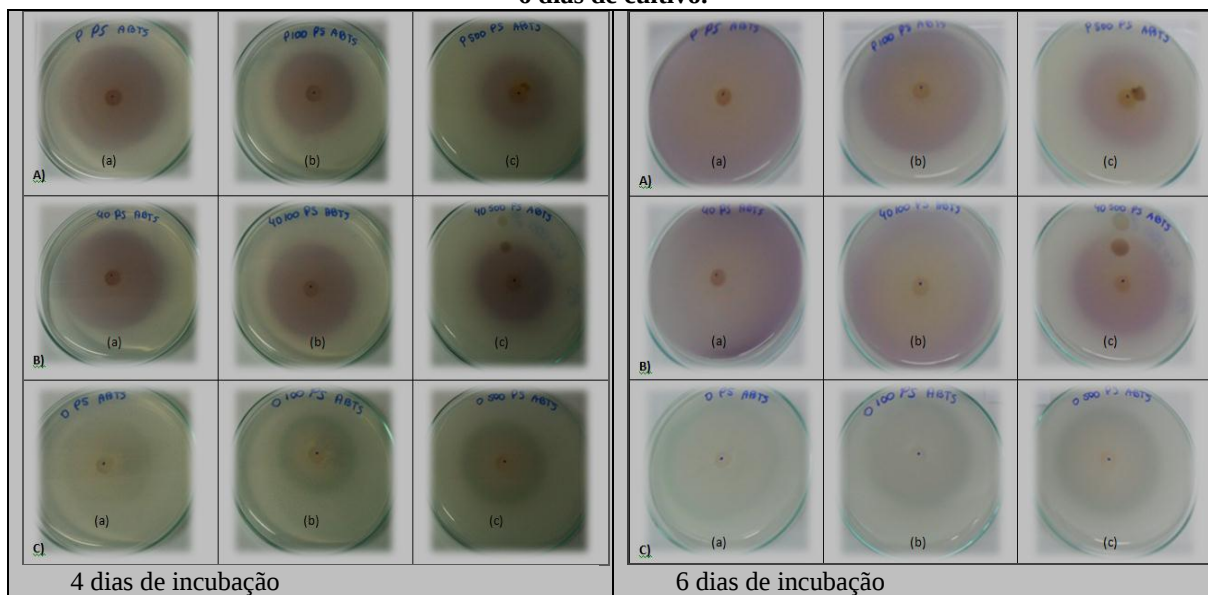
Legenda: A) BDA padrão; B) BDA 40%; C) BDA 0%; (a) controle; (b) ATZ 100; (c) ATZ 500.

Figura 26 - Avaliação da atividade enzimática dos fungos *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sp* com ABTS 0,02% após 24 horas de cultivo.



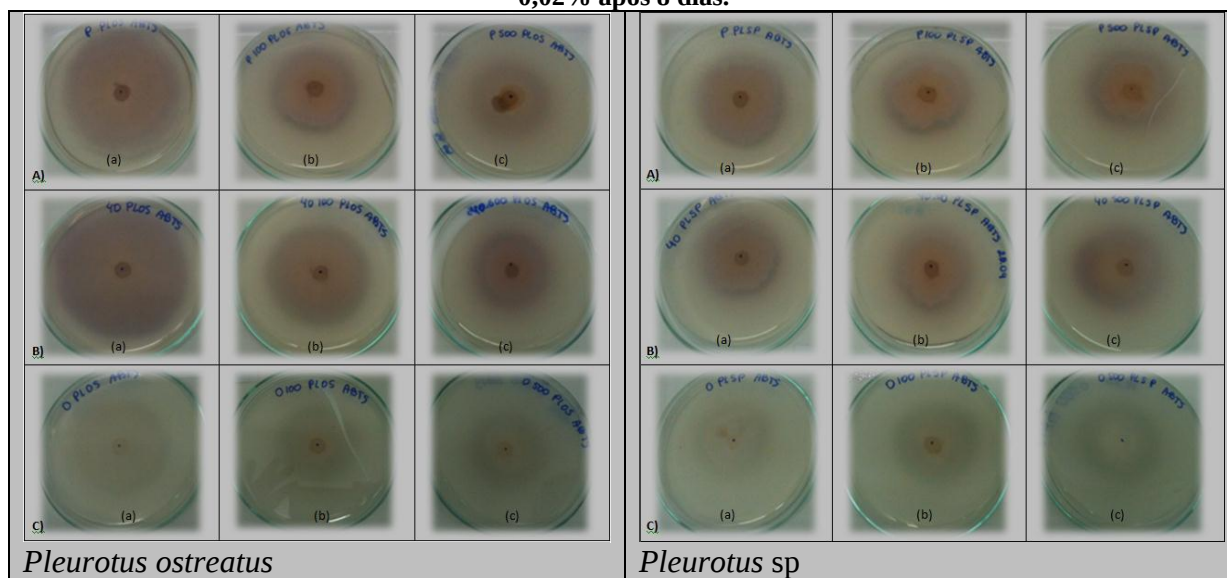
Legenda: A) BDA padrão; B) BDA 40%; C) BDA 0%; (a) controle; (b) ATZ 100; (c) ATZ 500.

Figura 27 - Avaliação da atividade enzimática do *Pycnosporus sanguineus* com ABTS 0,02% após 4 dias e 6 dias de cultivo.



Legenda: A) BDA padrão; B) BDA 40%; C) BDA 0%; (a) controle; (b) ATZ 100; (c) ATZ 500.

Figura 28 - Avaliação da atividade enzimática dos fungos *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus* sp com ABTS 0,02% após 8 dias.



Legenda: A) BDA padrão; B) BDA 40%; C) BDA 0%; (a) controle; (b) ATZ 100; (c) ATZ 500.

6.3 EXPERIMENTOS EM MEIO DE CULTURA LÍQUIDO NA CONDIÇÃO ESTÁTICA E SOB AGITAÇÃO - ETAPAS 03 E 04

Os resultados obtidos nos experimentos com os micro-organismos *Pycnosporus sanguineus*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus* sp, nos meios de cultura líquido na condição estática (BD 40% e BD 0%) e sob agitação (BD 40%), referentes à produção de biomassa, produção de enzimas, redução de concentração da atrazina e o teste de adsorção serão apresentados por espécie e, posteriormente, no item 6.4, serão apresentadas as correlações entre os resultados de todas as condições avaliadas.

A dosagem das enzimas Lacase (Lcc), Lignina peroxidase (LiP) e Manganês peroxidase (MnP) foi realizada conforme descrito no item 5.9 e para a elaboração dos gráficos foi utilizada a média dos valores encontrados.

A quantificação da atrazina seguiu o procedimento descrito no item 5.10, sendo utilizada a média geral dos valores encontrados no grupo-controle de toxicidade (CT) para a visualização da redução da atrazina com vistas à comparação com a média dos valores encontrados na duplicata.

O teste de adsorção foi realizado de acordo com o item 5.7.2. Os valores foram expressos, em porcentagem de redução, pela diferença entre a média inicial (T0) e a média final após 21 dias de incubação. Os resultados encontram-se no Apêndice A.

6.3.1 Resultados do micro-organismo *Pycnosporus sanguineus*

6.3.1.1 Produção de biomassa pelo micro-organismo *Pycnosporus sanguineus* nos meios de cultura BD 0% e BD 40% nas condições estática e sob agitação

A espécie *Pycnosporus sanguineus* desenvolveu-se nos meios de cultura líquido, BD 0% BD 40% na condição estática e sob agitação, na presença e na ausência de atrazina na concentração de 100 mg.L⁻¹. O crescimento e o aspecto morfológico dos micélios foram semelhantes nas duas condições nutricionais avaliadas na condição estática, tanto no grupo-controle como no grupo contendo atrazina 100 mg.L⁻¹ (Figura 29).

Os pesos encontrados dos micélios secos, nos experimentos sem agitação, também foram semelhantes com discreto aumento de peso no grupo-controle. Em baixa condição nutricional BD 0%, o peso seco do grupo-controle foi 0,10g e 0,09 g com ATZ 100, em BD

40% o peso do grupo-controle foi 0,12g e 0,10g com ATZ 100, demonstrando pouco impacto da atrazina no desenvolvimento micelial.

A formação da biomassa nos estudos em meio de cultura BD 40% sob agitação, tanto no grupo-controle como no grupo contendo o herbicida, foi visivelmente maior quando comparado ao estudo na condição estática (Figura 30).

O grupo contendo ATZ 100 apresentou peso 29,4% maior que o grupo-controle, no meio de cultivo BD 40% sob agitação, indicando que nesta condição o herbicida estimulou o crescimento do fungo. Resultados semelhantes foram obtidos por Machado et al. (2006), com observância de aumento da biomassa do *P.sanguineus* de aproximadamente 0,5 g superior em relação ao grupo-controle, em estudos com efluente contaminado com corantes têxteis que promoveram esse estímulo.

Durante os experimentos, observou-se, ainda, o aspecto límpido, transparente e sem odores do sobrenadante.

Figura 29 - Aspecto morfológico dos micélios do fungo *Pycnosporus sanguineus* nas duas condições nutricionais (BD 0% e BD 40%) sem agitação no 12º dia de crescimento.

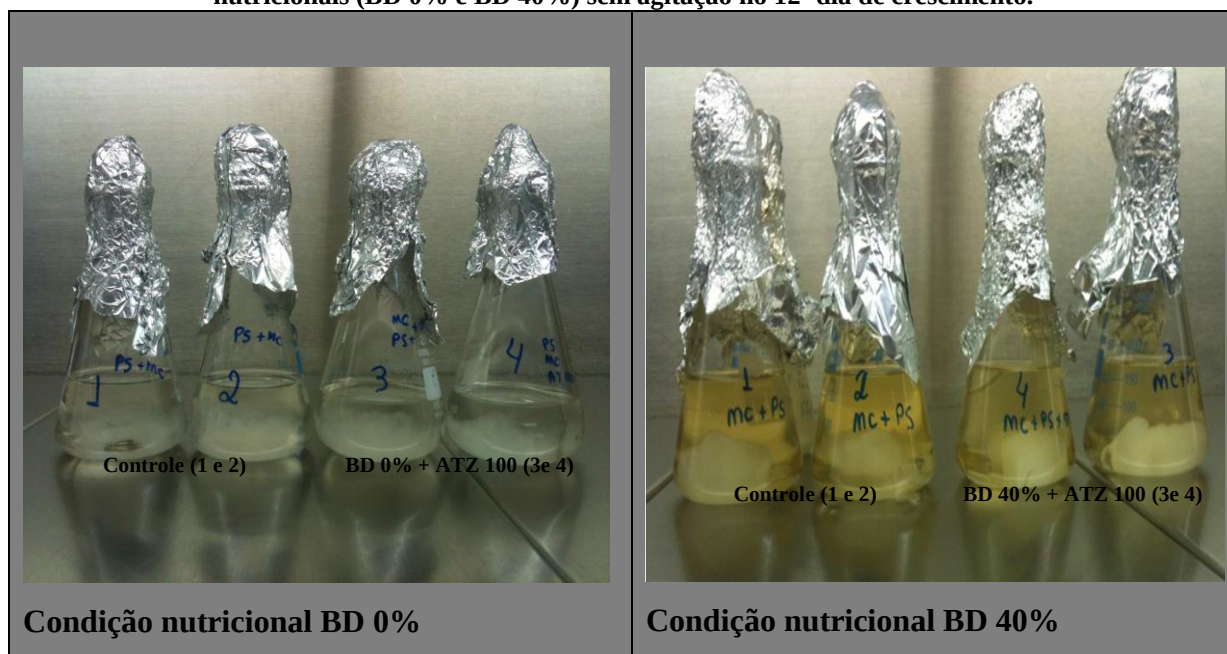
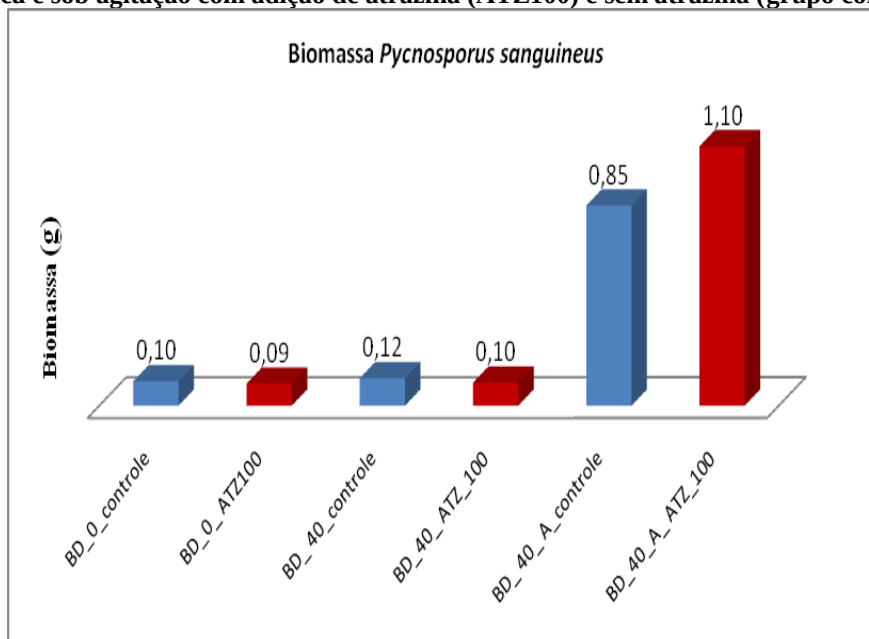


Figura 30 - Biomassa do *Pycnosporus sanguineus* no meio de cultura BD 0% e BD 40% nas condições estática e sob agitação com adição de atrazina (ATZ100) e sem atrazina (grupo controle).



6.3.1.2 Atividade enzimática do *Pycnosporus sanguineus* em BD 0% em condição estática

Os resultados da atividade enzimática, em condição estática com o meio de cultura líquido contendo apenas dextrose como fonte de nutriente no grupo-controle, e com adição de 100 mg.L^{-1} de atrazina no grupo experimental, estão apresentados nas Figuras 31 e 32, respectivamente. A maior quantidade de enzimas produzidas foi observada no grupo controle, ou seja, sem a presença do herbicida.

Após 21 dias de cultivo, tanto no grupo-controle como no grupo experimental a enzima que mais se destacou em quantidade foi a manganês peroxidase, com picos ($6,68 \text{ U.mL}^{-1}$ e $5,20 \text{ U.mL}^{-1}$) nos 3º e 9º dias de cultivo no grupo contendo ATZ 100, e picos ($5,05 \text{ U.mL}^{-1}$ e $8,51 \text{ U.mL}^{-1}$) no grupo-controle nos 6º e 12º dias, evidenciando antecipação do pico na presença do herbicida. O gráfico da Figura 33 mostra a produção da MnP de forma irregular durante os dias avaliados, verificando-se que, a partir do 15º dia de cultivo, a produção desta enzima foi quase inexistente.

A Figura 34 apresenta a baixa produção de LiP nos dois grupos, porém com melhores resultados no grupo-controle quando comparado ao grupo contendo o herbicida, com pico ($1,21 \text{ U.mL}^{-1}$) no 9º dia de cultivo.

A Lacase foi evidenciada a partir do 6º dia de cultivo e foi detectada até o final do experimento, nos dois grupos (controle e experimental), com melhores resultados no grupo-controle, porém com concentrações inferiores a $0,51 \text{ U.mL}^{-1}$ (Figura 35), sendo considerada

produção muito baixa. O contrário foi encontrado por Jardim (2010), em que a produção de lacase pelo fungo *Pycnosporus sanguineus* apresentou valores expressivos com pico de 30,74 U.mL⁻¹ (grupo-controle) e 31,65 U.mL⁻¹ na presença de acefato 10% e produção de LiP e MnP quase inexistente.

Durante o período de cultivo, foi monitorado o potencial hidrogeniônico do meio de cultura, que apresentou pouca variação, o pH inicialmente foi 5,5 e a partir do 9º dia de cultivo diminuiu para 5,0 tanto no grupo-controle como no grupo experimental.

Figura 31- Atividade enzimática do fungo *Pycnosporus sanguineus* em condição estática no meio BD 0% sem adição de atrazina (grupo-controle).

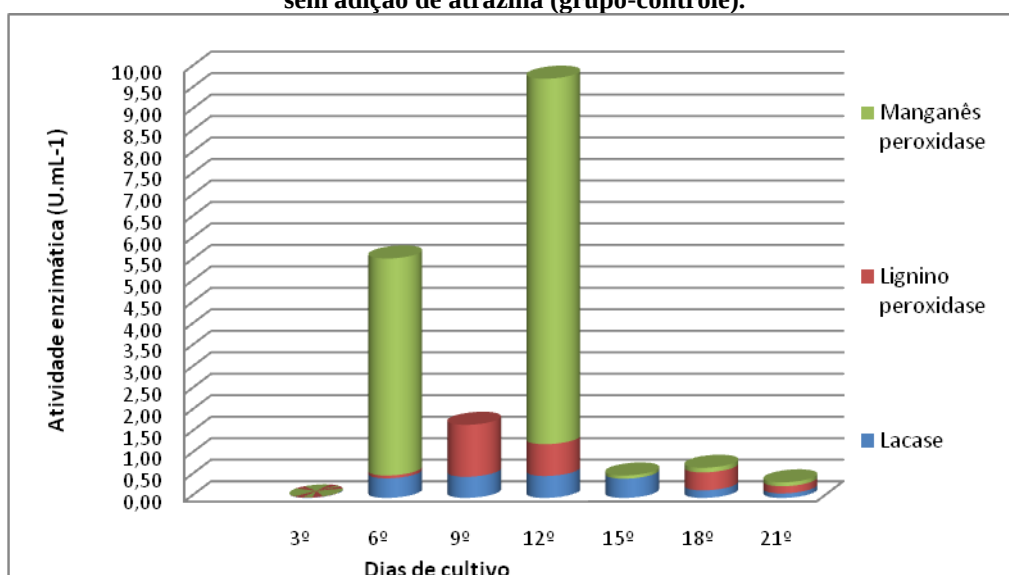


Figura 32 - Atividade enzimática do fungo *Pycnosporus sanguineus* em condição estática no meio BD 0% com ATZ100.

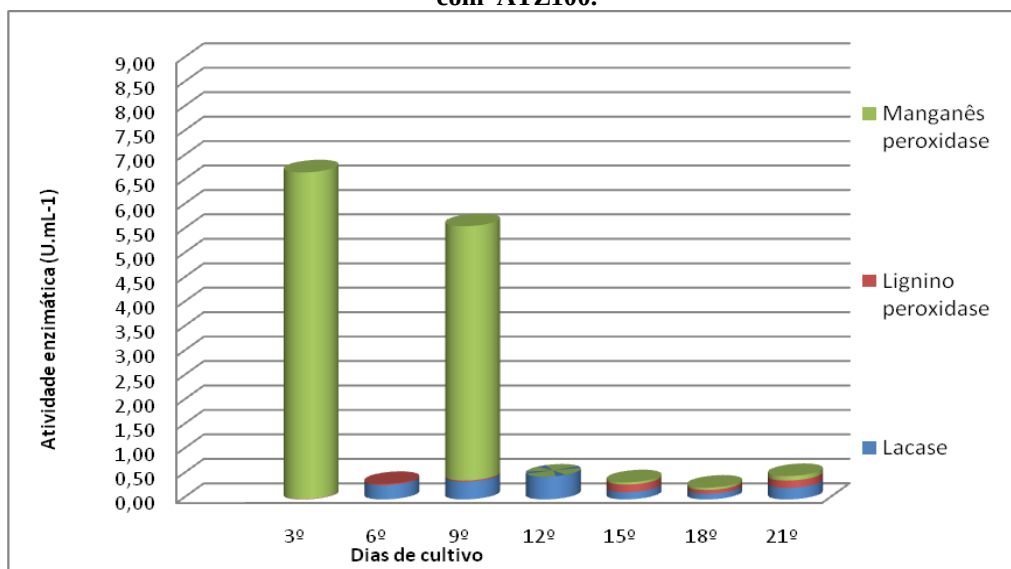


Figura 33 - Produção de MnP pelo *Pycnosporus sanguineus* no meio BD 0% em condição estática.

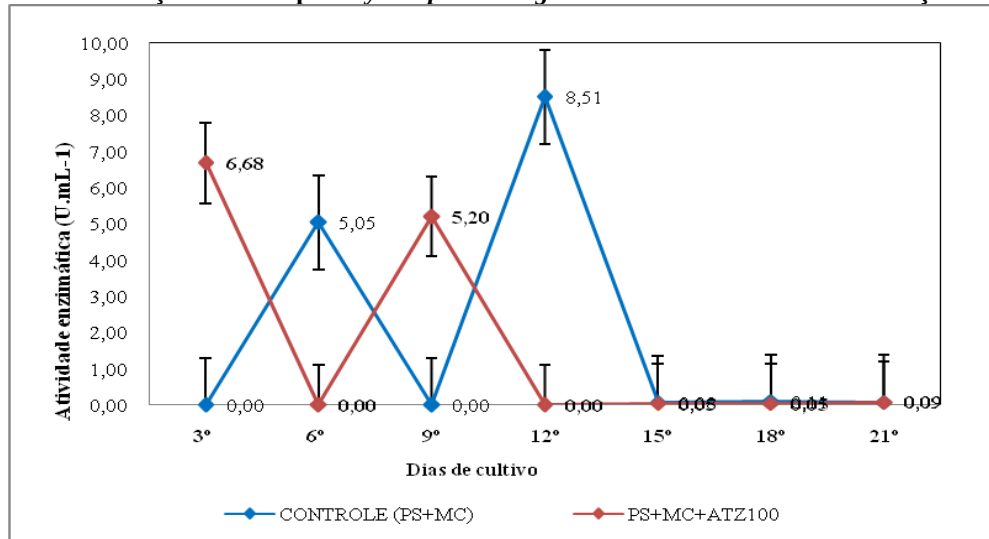


Figura 34 - Produção de LiP pelo *Pycnosporus sanguineus* no meio BD 0% em condição estática.

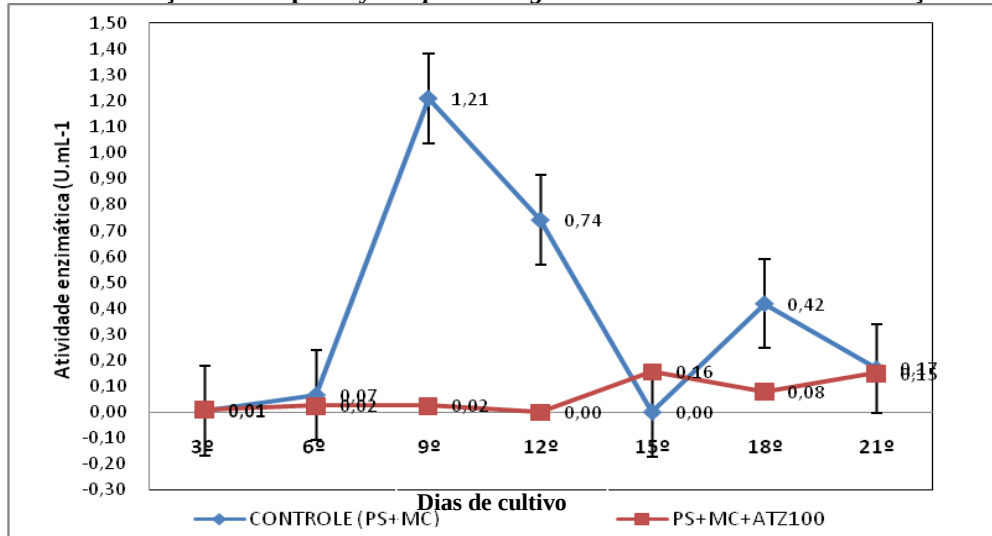
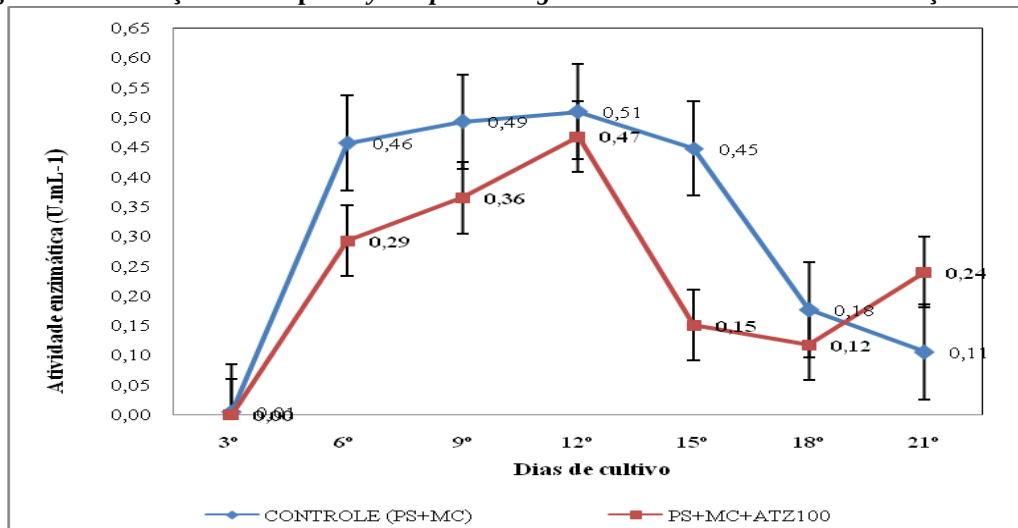


Figura 35 - Produção de Lcc pelo *Pycnosporus sanguineus* no meio BD 0% em condição estática.



6.3.1.3 Redução da concentração da atrazina nos experimentos com *Pycnosporus sanguineus* em meio de cultura BD 0% em condição estática

Durante o período de cultivo, foram retiradas amostras do grupo-controle de toxicidade (CT) e do grupo experimental no dia da inoculação (T0) e depois com frequência de 3 em dias, ou seja, nos mesmos dias da amostragem para as análises das enzimas. A média geral da concentração da atrazina do grupo (CT) foi 119,4 mg.L⁻¹ (Tabela 2), valor este que serviu de parâmetro para comparação com os valores encontrados das duplicatas da parte experimental.

Os resultados da Tabela 3 e Figura 36, mostram as concentrações da atrazina das duplicatas e média dos valores, no decorrer dos 21 dias de cultivo. Houve uma redução gradativa do herbicida, no final do experimento foi encontrado 61 mg.L⁻¹ de atrazina, correspondente a 47,2% de remoção.

A Figura 37 apresenta os cromatogramas da atrazina do grupo CT e do grupo experimental, tanto no início (T0) como no final do experimento. O tempo de retenção foi o mesmo 10,701 minutos. A altura dos picos evidenciam a redução da concentração da atrazina no final dos 21 dias de cultivo.

O resultado do teste de adsorção demonstrou que o fungo tem a capacidade de reduzir a quantidade do herbicida pelo mecanismo de adsorção na biomassa. A concentração inicial da atrazina foi 121 mg.L⁻¹, após vinte e um dias de incubação foi encontrado a concentração de 96,3 mg.L⁻¹, corresponde a uma redução de 20,4% (Tabela A1 – Apêndice A).

Diante dos resultados, verificou-se que a redução total da concentração da atrazina nas condições avaliadas deu-se tanto pela atividade enzimática (26,8%) como pelo mecanismo de adsorção (20,4%).

Tabela 2 - Concentração de atrazina do grupo controle de toxicidade (CT) no meio de cultura Batata Dextrose 0% em condição estática

Dias de cultivo	CT 1 ATZ (mg.L ⁻¹)	CT 2 ATZ (mg.L ⁻¹)	Média ATZ (mg.L ⁻¹)	Média geral ATZ (mg.L ⁻¹)
0	118,9	126,1	122,5	
3	129,8	132,2	131,0	
6	125,7	118,9	122,3	
9	116,4	122,8	119,6	
12	131,6	100,0	115,8	
15	118,4	114,0	116,2	
18	101,2	98,4	99,8	
21	124,2	132,0	128,1	119,4

Legenda: CT 1: Frasco nº 1 do grupo controle de toxicidade; CT 2: Frasco nº 2 do grupo controle de toxicidade; ATZ: atrazina

Tabela 3 - Concentração de atrazina no experimento com o fungo *Pycnosporus sanguineus* (Ps) no meio de cultura Batata Dextrose 0% em condição estática.

Dias de cultivo	Frasco 3 ATZ (mg.L ⁻¹)	Frasco 4 ATZ (mg.L ⁻¹)	Média ATZ (mg.L ⁻¹)	% Remoção
0	119,9	111,0	115,5	
3	87,0	72,8	79,9	
6	72,6	79,0	75,8	
9	77,0	79,0	78,0	
12	66,0	70,4	68,2	
15	70,6	68,4	69,5	
18	58,0	66,0	62,0	
21	58,0	64,0	61,0	47,2

Legenda: Frasco 3: meio de cultura BD 0% + Ps + ATZ 100; Frasco 4: meio de cultura BD 0% + Ps + ATZ 100; ATZ: atrazina.

Figura 36 - Redução da concentração de atrazina por meio do fungo *Pycnosporus sanguineus* no meio BD 0% em condição estática.

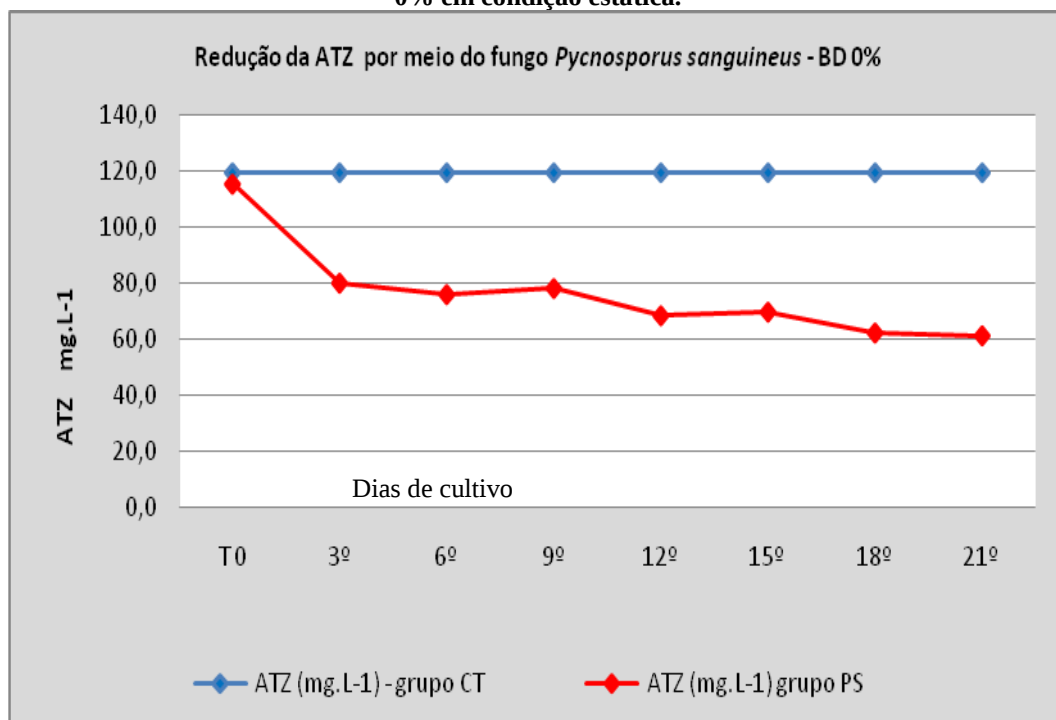
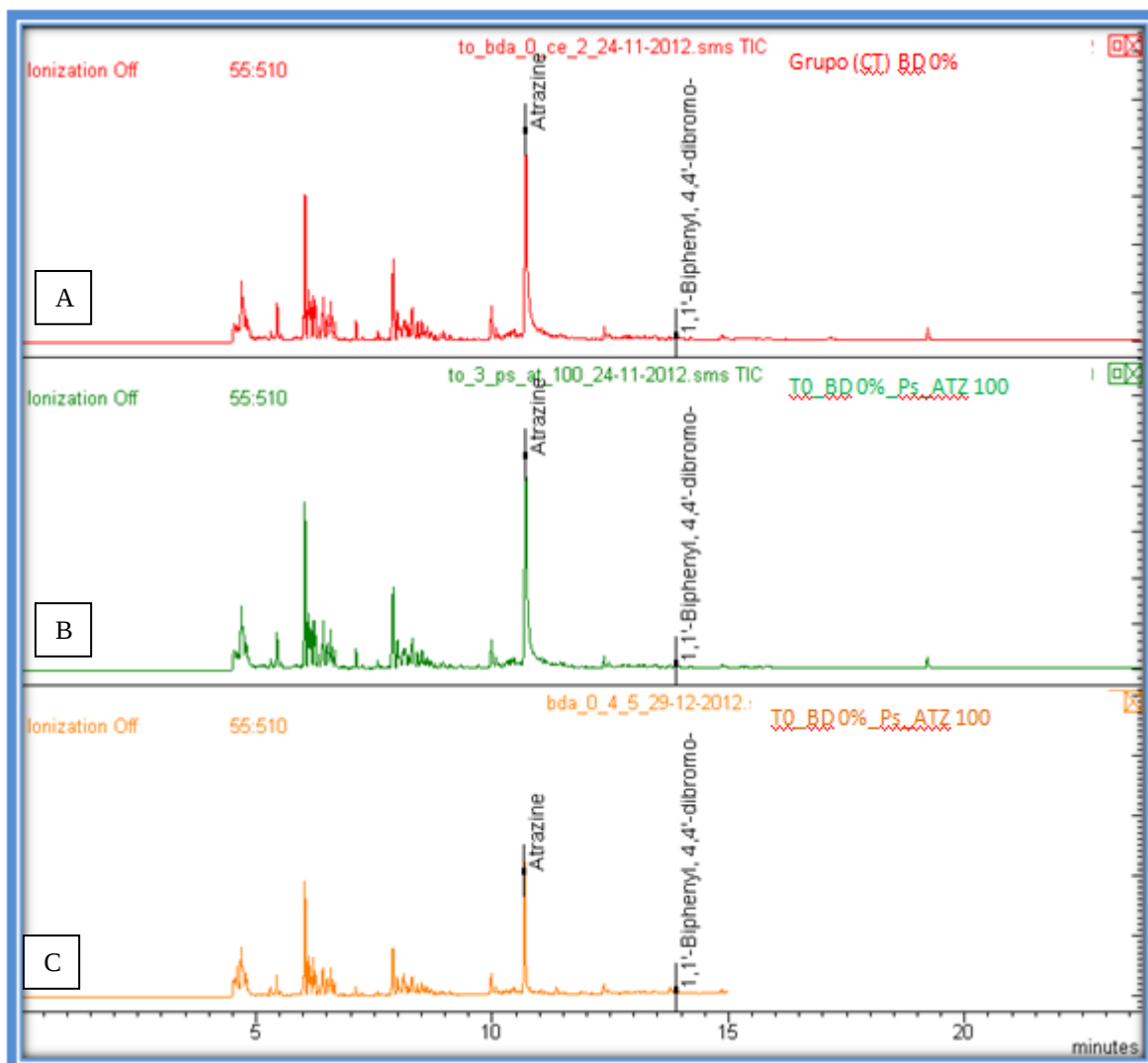


Figura 37 – Cromatogramas da atrazina dos experimentos no meio BD 0% sem agitação com o micro-organismo *Pycnosporus sanguineus*



Legenda: A (Grupo controle de toxicidade); B (Meio de cultura+Ps+ATZ no tempo T0); C(Meio de cultura+Ps+ATZ após 21 dias de cultivo)

6.3.1.4 Atividade enzimática do *Pycnosporus sanguineus* em BD 40% em condição estática

Nas Figuras 38 e 39 estão representados os valores médios das atividades das enzimas Lcc, MnP e LiP do grupo-controle e do grupo experimental. De forma geral, houve maior produção de enzimas no grupo contendo atrazina 100 mg.L⁻¹, mostrando que o herbicida exerceu forte influência no desempenho de seu complexo enzimático.

A produção de lacase foi praticamente inexistente, porque somente no 6º dia houve um pico de 0,79 U.mL⁻¹ no grupo-controle (Figura 40). Estudos realizados por Vikineswary et al. (2005), utilizando resíduos agroindustriais como meio de cultivo, revelou que o fungo

Pycnosporus sanguineus é grande produtor de lacase, mas nesta pesquisa em meio de cultivo BD 40% sem agitação os valores encontrados foram abaixo de $0,21 \text{ U.mL}^{-1}$.

No 3º dia de cultivo, a enzima que mais se destacou foi a manganês peroxidase, com pico de $7,21 \text{ U.mL}^{-1}$ no grupo experimental e $5,5 \text{ U.mL}^{-1}$ no grupo-controle e também nos demais dias de cultivo esta enzima esteve presente, principalmente no grupo contendo o herbicida, porém com valores baixos (Figura 41).

Os valores da LiP foram insignificantes no grupo-controle, com pico ($0,71 \text{ U.mL}^{-1}$) no 3º dia de cultivo e nos demais os resultados ficaram abaixo de $0,23 \text{ U.mL}^{-1}$, embora no grupo contendo ATZ 100, a produção tenha sido dez vezes maior quando comparada à produção sem a presença do herbicida, com picos $2,37 \text{ U.mL}^{-1}$ e $2,42 \text{ U.mL}^{-1}$ (Figura 42).

Durante o período monitorado, houve alteração do pH de forma semelhante no grupo-controle e no grupo experimental. O pH inicialmente foi 5,5, depois do 3 ao 6º dias de cultivo diminuiu para 5,0. A partir do 9º dia permaneceu em ácido pH 4,0.

Figura 38 - Atividade enzimática do fungo *Pycnosporus sanguineus* em condição estática no meio BD 40% sem adição de atrazina (grupo-controle).

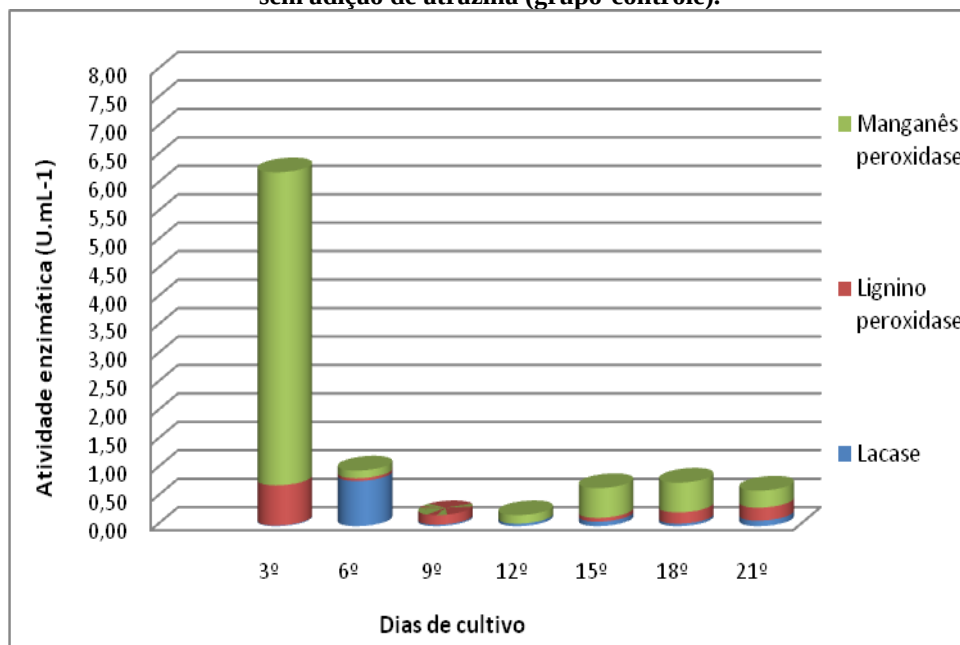


Figura 39 - Atividade enzimática do fungo *Pycnosporus sanguineus* em condição estática no meio BD 40% com ATZ100.

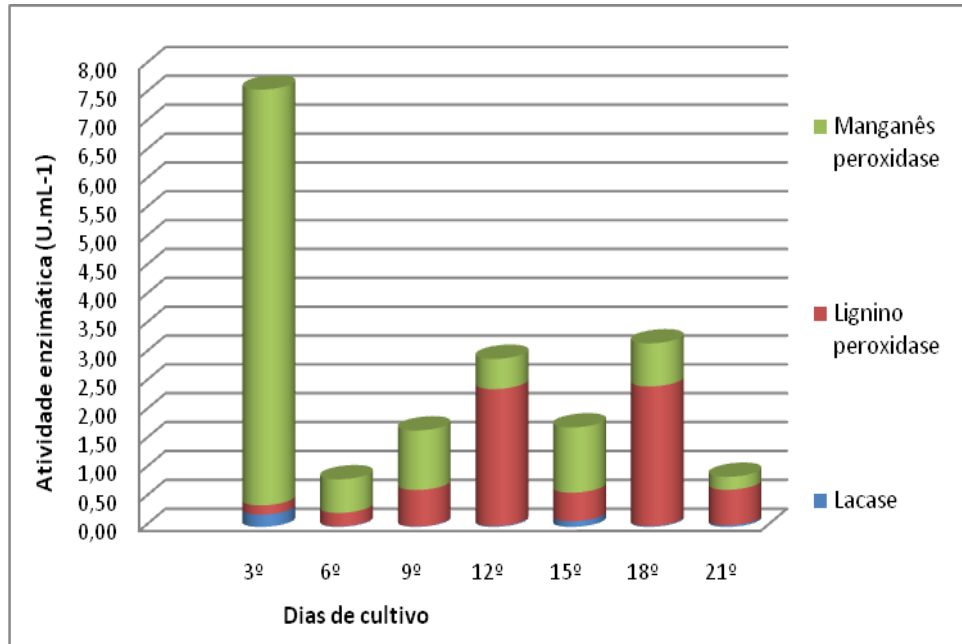


Figura 40 - Produção de Lacase pelo *Pycnosporus sanguineus* no meio BD 40% em condição estática.

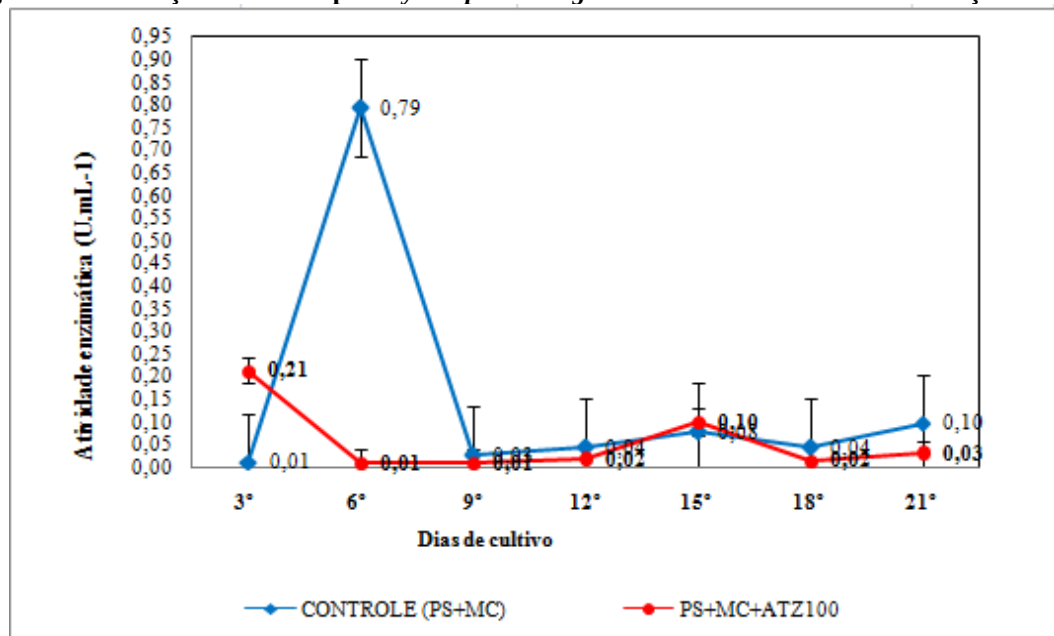


Figura 41 - Produção de Manganês peroxidase pelo *Pycnosporus sanguineus* no meio BD 40% em condição estática.

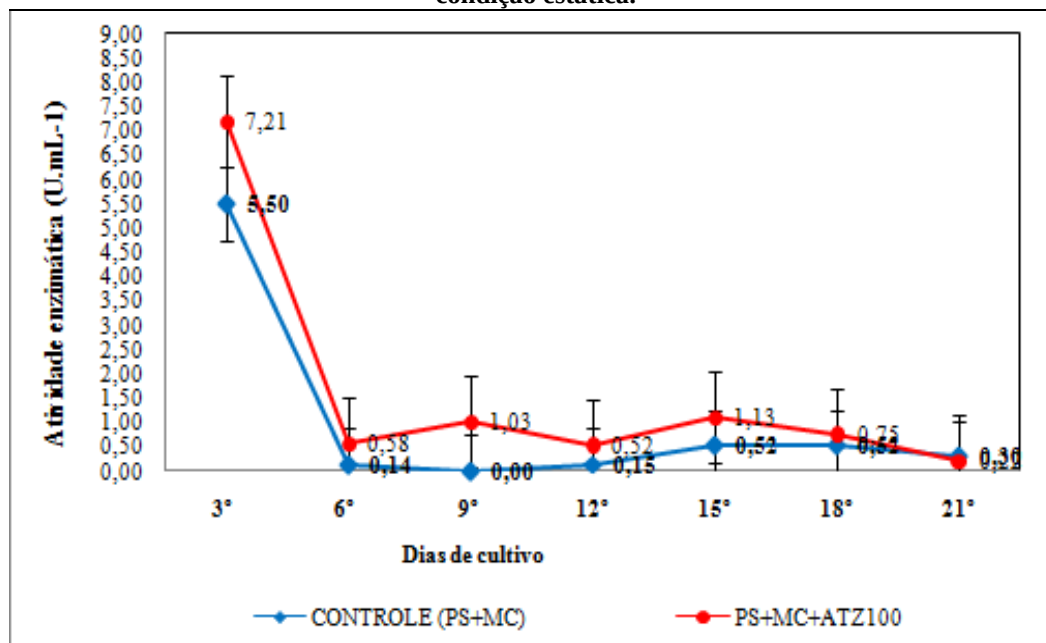
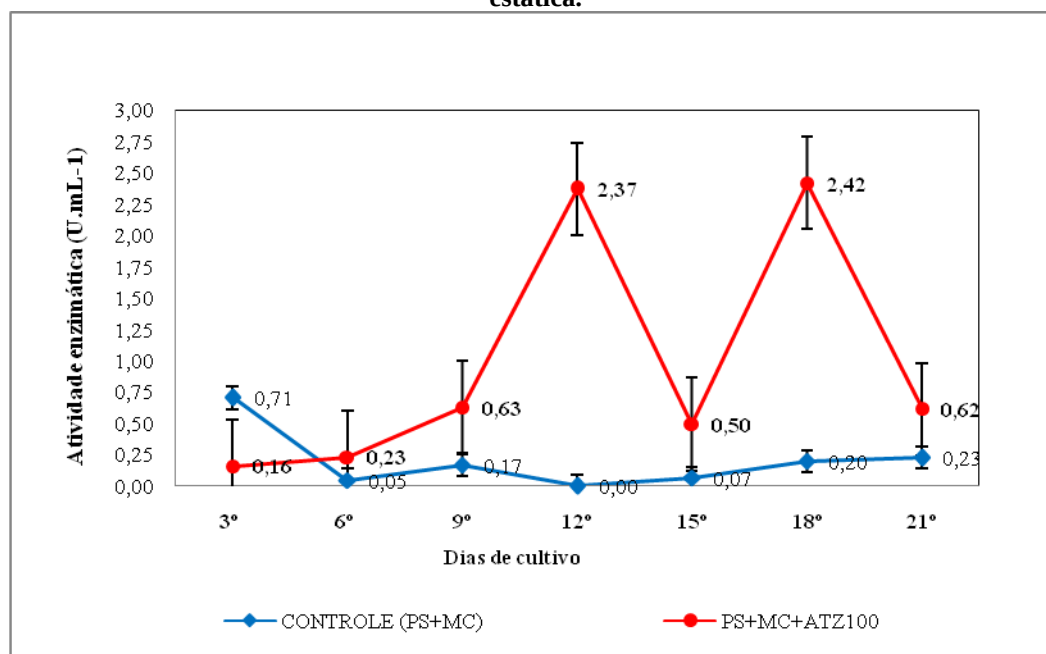


Figura 42 - Produção de Lignina peroxidase pelo *Pycnosporus sanguineus* no meio BD 40% em condição estática.



6.3.1.5 Redução da concentração da atrazina nos experimentos com *Pycnosporus sanguineus* em meio de cultura BD 40% em condição estática

Na condição avaliada, a média geral da concentração da atrazina do grupo-controle da toxicidade foi de $110,4 \text{ mg.L}^{-1}$ (Tabela 4), que serviu de parâmetro para comparação com os valores encontrados nas duplicatas.

A Tabela 5 e Figura 43 apresenta os resultados da concentração do herbicida durante o período experimental. No início (T0) o valor médio encontrado de atrazina foi 102,3 mg.L⁻¹ e no final detectou-se 14,6 mg.L⁻¹ deste composto, demonstrando remoção total de 85,7% .

Os resultados do teste de adsorção (Tabela A 1 – Apêndice A), demonstram que a redução da concentração da atrazina no meio de cultivo deu-se também pelo mecanismo de adsorção na biomassa. Inicialmente a média de atrazina foi 110,7 mg.L⁻¹ e no final do período de incubação o valor foi de 76,2 mg.L⁻¹. Por este mecanismo a remoção foi 31,2% do valor total.

Os resultados obtidos indicam que o principal mecanismo de redução da concentração da atrazina foi a atividade enzimática, principalmente das enzimas manganês peroxidase e lignina peroxidase.

Tabela 4 - Concentração de atrazina do grupo Controle de Toxicidade (CT) no meio de cultura BD 40% em condição estática.

Dias de cultivo	CT 1 ATZ (mg.L ⁻¹)	CT 2 ATZ (mg.L ⁻¹)	Média ATZ (mg.L ⁻¹)	Média geral ATZ (mg.L ⁻¹)
0	96,5	100,1	98,3	
3	87,9	96,3	92,1	
6	117,8	119,8	118,8	
9	129,8	131,6	130,7	
12	125,9	131,3	128,6	
15	94,2	90,8	92,5	
18	105,0	102,8	103,9	
21	126,0	110,4	118,2	
				110,4

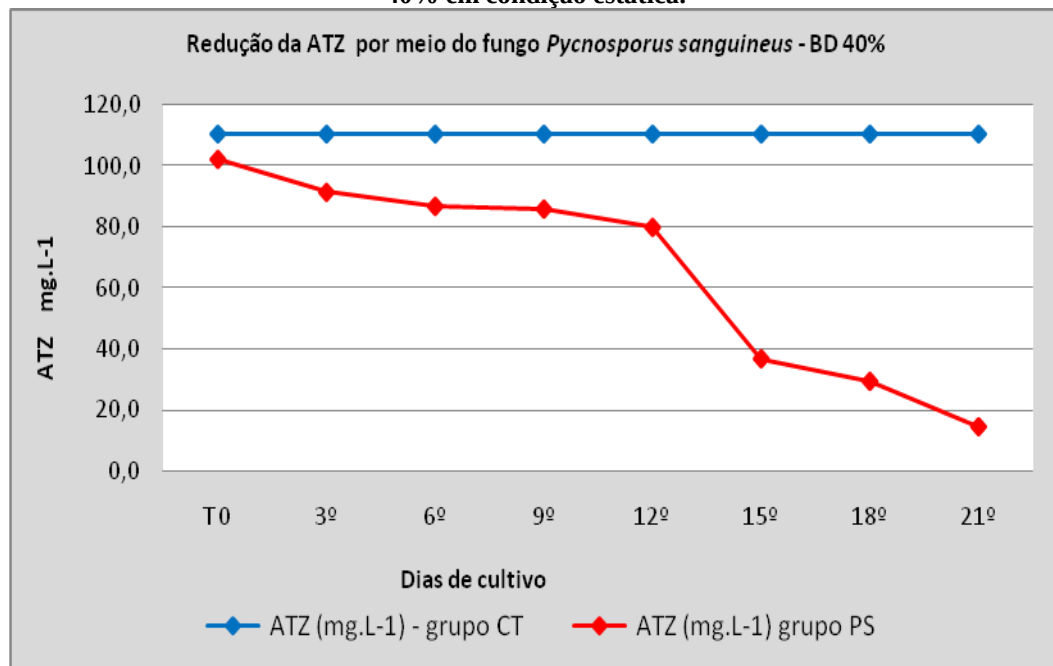
Legenda: CT 1: Frasco nº 1 do grupo controle de toxicidade; CT 2: Frasco nº 2 do grupo controle de toxicidade; ATZ: atrazina

Tabela 5 - Concentração de atrazina no experimento com o fungo *Pycnosporus sanguineus* no meio de cultura Batata Dextrose 40 em condição estática

Dias de cultivo	Frasco 3 ATZ (mg.L ⁻¹)	Frasco 4 ATZ (mg.L ⁻¹)	Média ATZ (mg.L ⁻¹)	% Remoção
0	104,5	100,1	102,3	
3	103,2	79,8	91,5	
6	91,2	82,5	86,9	
9	79,3	92,7	86,0	
12	89,0	71,0	80,0	
15	38,6	35,2	36,9	
18	29,0	30,0	29,5	
21	17,3	11,9	14,6	
				85,7

Legenda: Frasco 3: meio de cultura BD 40% + Ps + ATZ 100; Frasco 4: meio de cultura BD 40% + Ps + ATZ 100; ATZ: atrazina.

Figura 43 - Redução da concentração de atrazina por meio do fungo *Pycnosporus sanguineus* no meio BD 40% em condição estática.



6.3.1.6 Atividade enzimática do *Pycnosporus sanguineus* em BD 40% sob agitação

O fungo *Pycnosporus sanguineus* apresentou, de forma geral, baixa produção enzimática no meio de cultura BD 40% sob agitação, inversamente proporcional na formação da biomassa. Esperava-se que em tais condições a produção de enzimas seria melhor quando comparada com os experimentos sem agitação. Esse comportamento também foi encontrado por Jardim (2010) em estudos com *Trametes villosa* nos ensaios com acefato 50% e por Rezende et al. (2005) em estudos com *Pleurotus ostreatus* nos ensaios com o herbicida imazaquin.

O grupo-controle produziu maior quantidade de enzimas que no grupo experimental (Figuras 44 e 45), ao contrário do que ocorreu no grupo BD 40% em condição estática.

Figura 44 - Atividade enzimática do fungo *Pycnosporus sanguineus* no meio BD 40% sob agitação – grupo-controle.

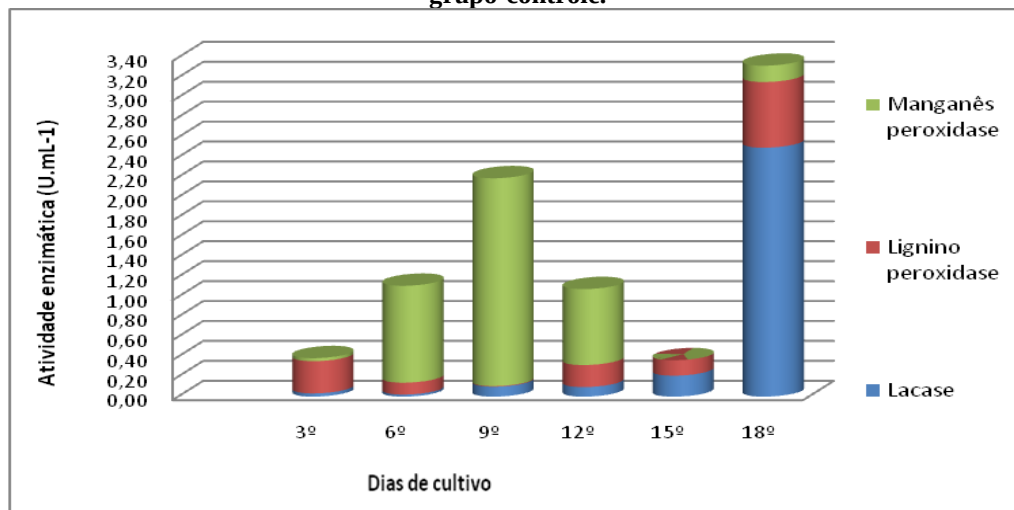
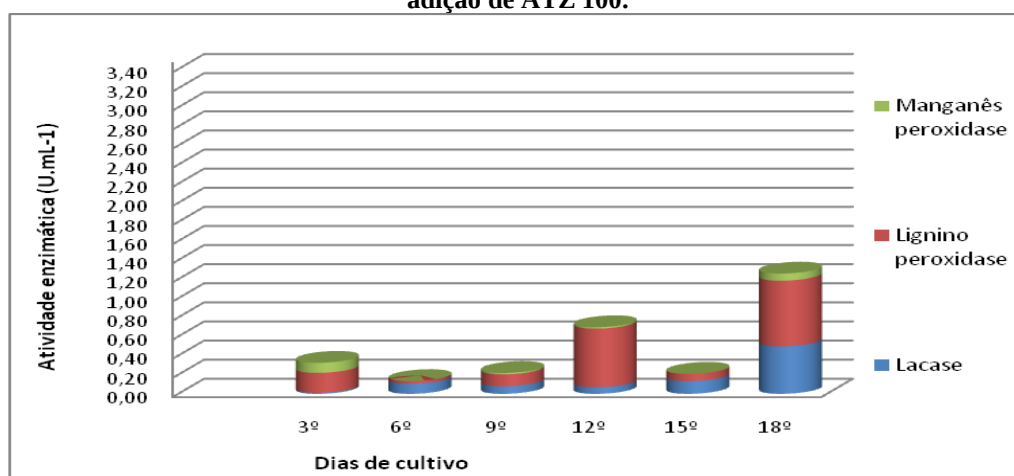


Figura 45 - Atividade enzimática do fungo *Pycnosporus sanguineus* no meio BD 40% sob agitação com adição de ATZ 100.



O pico de lacase ocorreu no 18º dia de cultivo no grupo sem adição de atrazina ($2,50 \text{ U.mL}^{-1}$), os demais picos ficaram abaixo de $0,50 \text{ U.mL}^{-1}$ nos dois grupos (controle e experimental), conforme apresentado na Figura 46. O meio de cultura tornou-se pigmentado de cor alaranjada com o passar do tempo e o aumento da pigmentação coincidiu com o pico de produção da lacase. Esta alteração da coloração coincidente com a produção de lacase também foi observada por Garcia (2006) em estudos com *P. sanguineus* cultivados em meio de produção de lacase (MPL) por um período de 96 horas, a 28°C sob agitação.

A produção da enzima MnP ocorreu somente no grupo-controle, com pico de $2,09 \text{ U.mL}^{-1}$ no 9º dia de cultivo, sendo que na presença da atrazina a quantidade produzida foi insignificante com valores abaixo de $0,11 \text{ U.mL}^{-1}$ (Figura 47).

Em presença da atrazina, a produção da enzima lignina peroxidase foi maior, sendo no 12º dia o valor do pico $0,62 \text{ U.mL}^{-1}$ contra $0,22 \text{ U.mL}^{-1}$ do grupo-controle, conforme

apresentado na Figura 48. Este resultado infere que a atrazina pode exercer a função de indutor da produção da LiP, tanto nesta condição como na condição anteriormente apresentada (BD 40% - estático).

Durante o experimento, houve mudança do pH do meio de cultura que, inicialmente, estava em 5,5, a partir do 3º dia de cultivo baixou para 4,5 e no final do experimento, 18º dia o valor encontrado foi 4,0.

Figura 46 - Produção de Lacase pelo *Pycnosporus sanguineus* em meio BD 40% sob agitação.

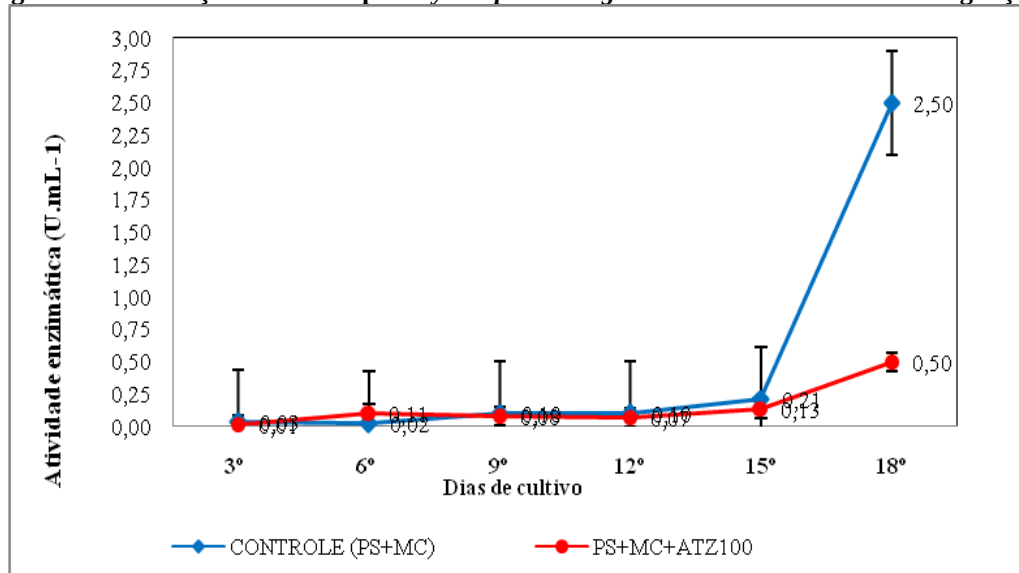


Figura 47 - Produção de Manganês peroxidase pelo *Pycnosporus sanguineus* em meio BD 40% sob agitação.

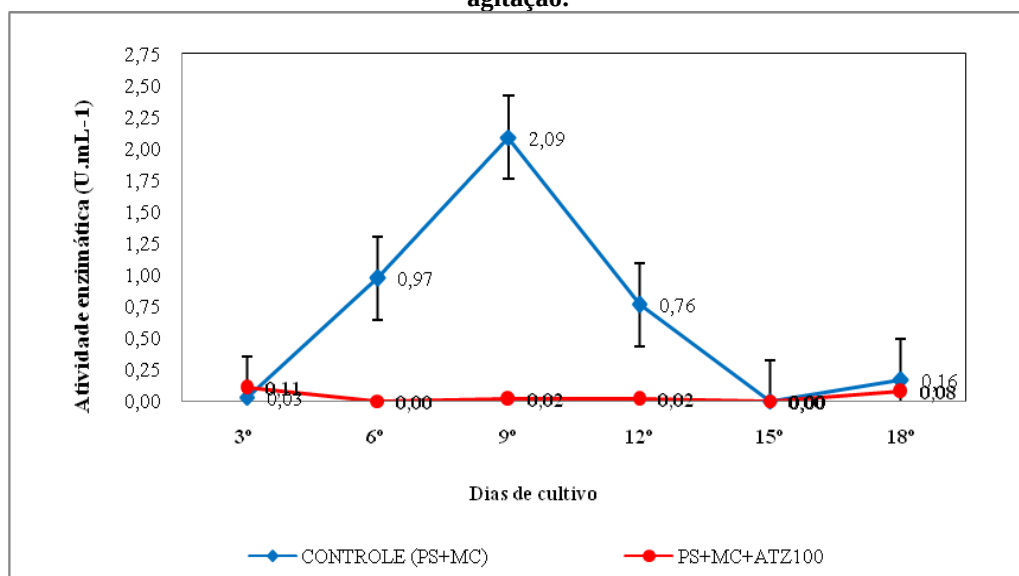
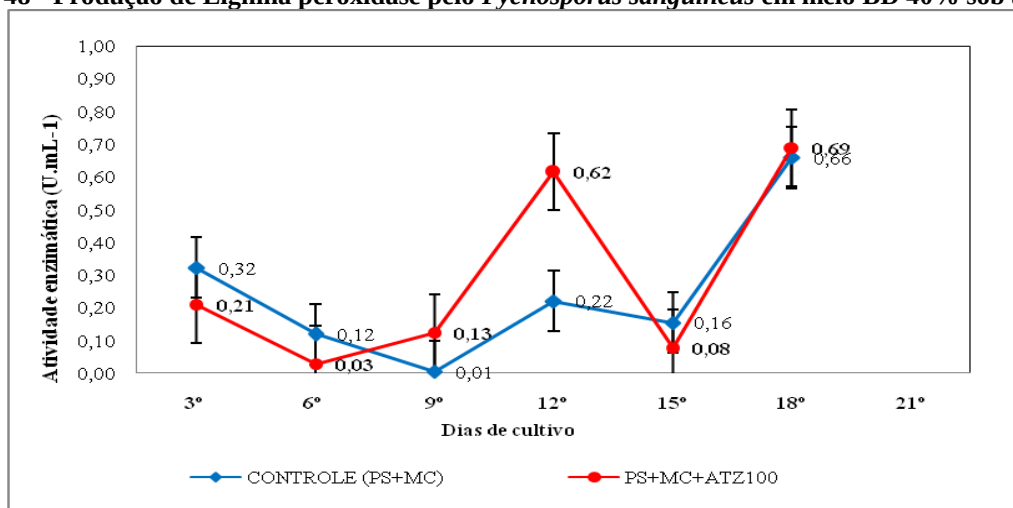


Figura 48 - Produção de Lignina peroxidase pelo *Pycnosporus sanguineus* em meio BD 40% sob agitação.



6.3.1.7 Redução da concentração da atrazina nos experimentos com *Pycnosporus sanguineus* em meio de cultura BD 40% sob agitação

A Figura 49 apresenta o cromatograma da atrazina do grupo controle de toxicidade, após 21 dias de cultivo, o tempo de retenção foi 10,698 min. A média geral da concentração da atrazina do grupo (CT) foi 107,4 mg.L⁻¹ (Tabela 6).

Durante o período de cultivo houve redução gradativa do herbicida, com remoção mais acentuada no 6º dia. A Tabela 7 e Figura 50 apresentam os resultados da concentração da atrazina durante o experimento, cujo menor valor encontrado foi 28,7 mg.L⁻¹ corresponde a uma redução de 72,1%.

A remoção deu-se também pelo mecanismo de adsorção pela biomassa que contribuiu com uma diminuição do valor total em 40,4%, no início do teste de adsorção o valor médio da concentração da atrazina foi 120,1 mg.L⁻¹ e no final 71,6 mg.L⁻¹ (Tabela A1- Apêndice A).

Tabela 6 - Concentração de atrazina no grupo Controle de Toxicidade (CT) no meio de cultura BD 40% sob agitação

Dias de cultivo	CT 1 ATZ (mg.L ⁻¹)	CT 2 ATZ (mg.L ⁻¹)	Média ATZ (mg.L ⁻¹)	Média geral ATZ (mg.L ⁻¹)
0	108,0	122,0	115,0	107,4
3	114,0	100,0	107,0	
6	94,0	68,8	81,4	
9	104,3	115,1	109,7	
12	101,0	100,0	100,5	
15	122,0	110,8	116,4	
18	114,6	129,4	122,0	

Legenda: CT 1: Frasco nº 1 do grupo controle de toxicidade; CT 2: Frasco nº 2 do grupo controle de toxicidade; ATZ: atrazina

Tabela 7 - Concentração de atrazina no experimento com o fungo *Pycnosporus sanguineus* no meio de cultura BD 40% sob agitação

Dias de cultivo	Frasco 3 ATZ (mg.L ⁻¹)	Frasco 4 ATZ (mg.L ⁻¹)	Média ATZ (mg.L ⁻¹)	% Remoção
0	99,2	106,8	103,0	
3	82,7	99,1	90,9	
6	63,0	55,4	59,2	
9	54,0	62,2	58,1	
12	56,0	54,2	55,1	
15	39,8	44,4	42,1	
18	27,5	29,9	28,7	72,1

Legenda: Frasco 3: meio de cultura BD 40% + Ps + ATZ 100; Frasco 4: meio de cultura BD 40% + Ps + ATZ 100; ATZ: atrazina.

Figura 49 – Cromatograma da atrazina do grupo (CT) após 21 dias de cultivo no meio BD 40% sob agitação

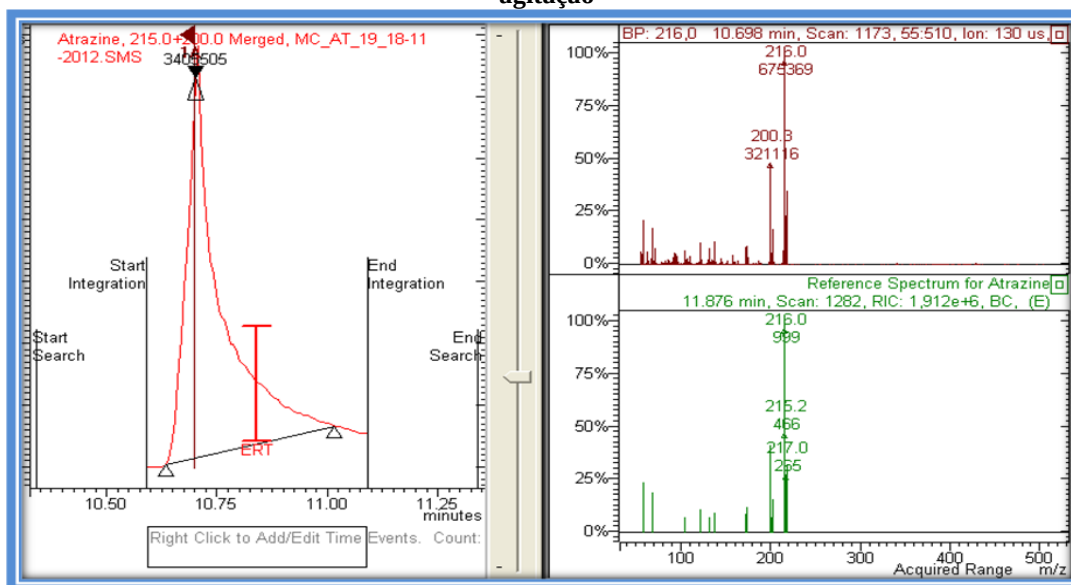
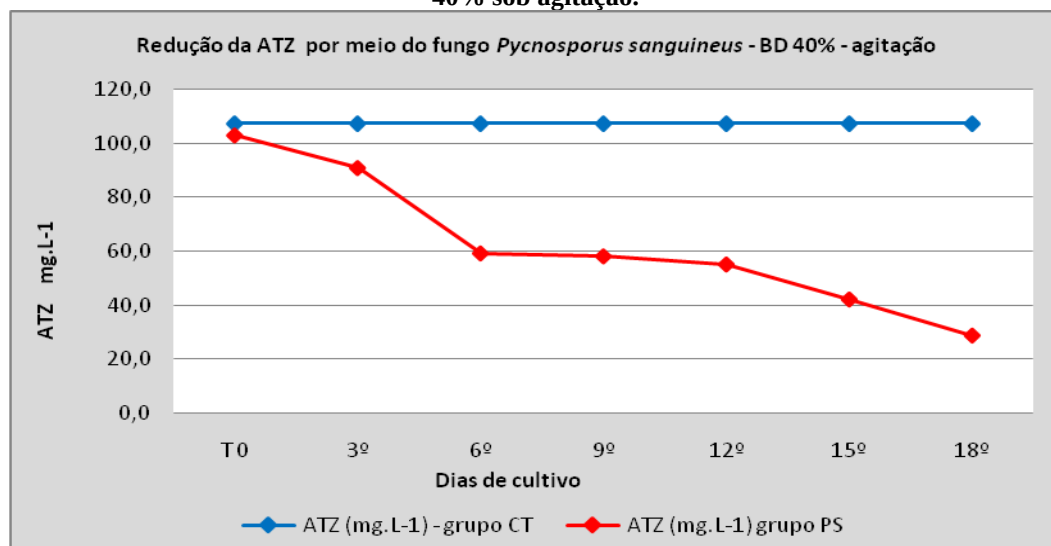


Figura 50 - Redução da concentração de atrazina por meio do fungo *Pycnosporus sanguineus* no meio BD 40% sob agitação.



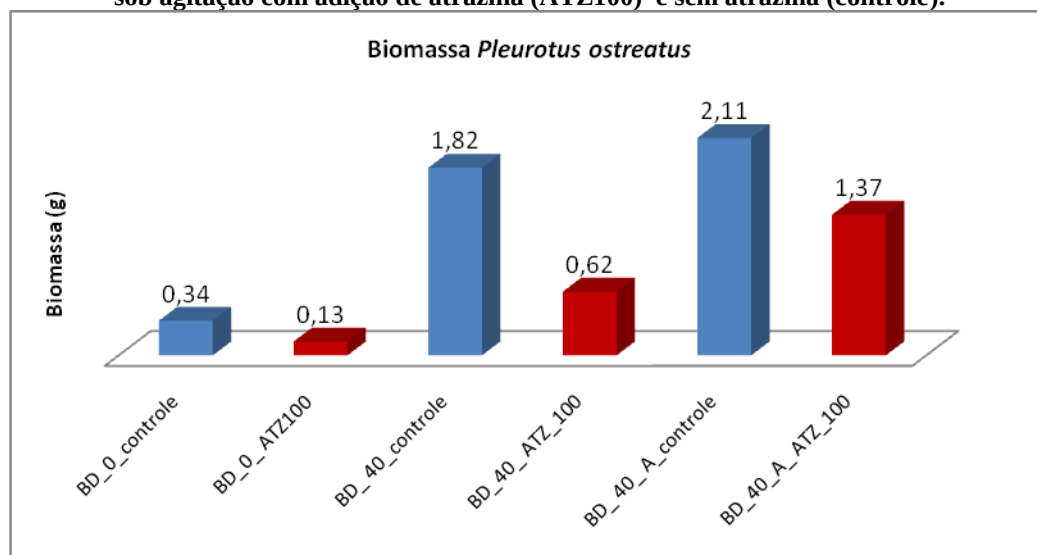
6.3.2 Resultados do micro-organismo *Pleurotus ostreatus*

6.3.2.1 Produção de biomassa pelo micro-organismo *Pleurotus ostreatus* nos meios de cultura BD 0% e BD 40% nas condições estática e sob agitação

O crescimento e desenvolvimento da biomassa (Figura 51), mostra aumento crescente no grupo-controle e no grupo experimental diretamente proporcional ao acréscimo de nutrientes no meio de cultura (BD 0%, BD 40%) e mudança para condição com agitação.

Observa-se também que a presença da atrazina interferiu na formação da biomassa, pois foram apresentados pesos (g) do micélio seco mais baixos quando comparados aos do grupo-controle, efeito este que pode ser observado principalmente na condição estática, com menor impacto nos experimentos sob agitação.

Figura 51 - Biomassa do *Pleurotus ostreatus* no meio de cultura BD 0% e BD40% nas condições estática e sob agitação com adição de atrazina (ATZ100) e sem atrazina (controle).



6.3.2.2 Atividade enzimática do *Pleurotus ostreatus* em BD 0% em condição estática

A Figura 52 mostra os resultados da atividade enzimática do fungo *Pleurotus ostreatus*, no meio de cultura BD 0% sem adição de atrazina (grupo-controle), dentre as enzimas presentes a manganês peroxidase e lacase sobressaíram em relação à lignina peroxidase, apresentando no 6º dia de cultivo picos de 5,11 U.mL⁻¹ e 5,78 U.mL⁻¹, respectivamente. O mesmo pôde ser observado no grupo experimental, contendo atrazina 100

mg.L^{-1} , mas com apresentação de picos com valores menores que o grupo-controle Lcc ($1,68 \text{ U.mL}^{-1}$) e MnP ($4,75 \text{ U.mL}^{-1}$) (Figura 53).

A biomassa formada nesta condição avaliada, durante o tempo de cultivo, apresentou relação direta com a produção enzimática, ou seja, maior biomassa no grupo-controle produziu maior quantidade de enzimas, menor biomassa no grupo contendo atrazina, menor atividade enzimática.

O gráfico da Figura 54 mostra a produção da Lcc durante os dias avaliados, cuja maior produção foi observada no grupo-controle, somente no terceiro dia de cultivo os picos foram semelhantes ($1,00 \text{ U.mL}^{-1}$). A partir do décimo oitavo dia de cultivo houve baixa produção desta enzima tanto na presença como na ausência do herbicida.

A produção da enzima manganês peroxidase foi baixa nos dois grupos (controle e experimental), com pico no sexto dia de cultivo $5,11 \text{ U.mL}^{-1}$ no grupo controle e $4,75 \text{ U.mL}^{-1}$ no experimento contendo atrazina. A partir do 9º dia houve redução da produção enzimática nos dois grupos (Figura 55).

A Figura 56 mostra a produção de LiP, todos os resultados foram menores que $0,29 \text{ U.mL}^{-1}$ por isso a produção desta foi considerada inexistente.

Durante o experimento, monitorado o pH do meio de cultura, foi observada pouca variação: no início (T0) foi registrado pH 5,5 e após o 18º dia diminuiu para pH 5,0.

Figura 52 - Atividade enzimática do fungo *Pleurotus ostreatus* no meio BD 0% em condição estática (grupo-controle).

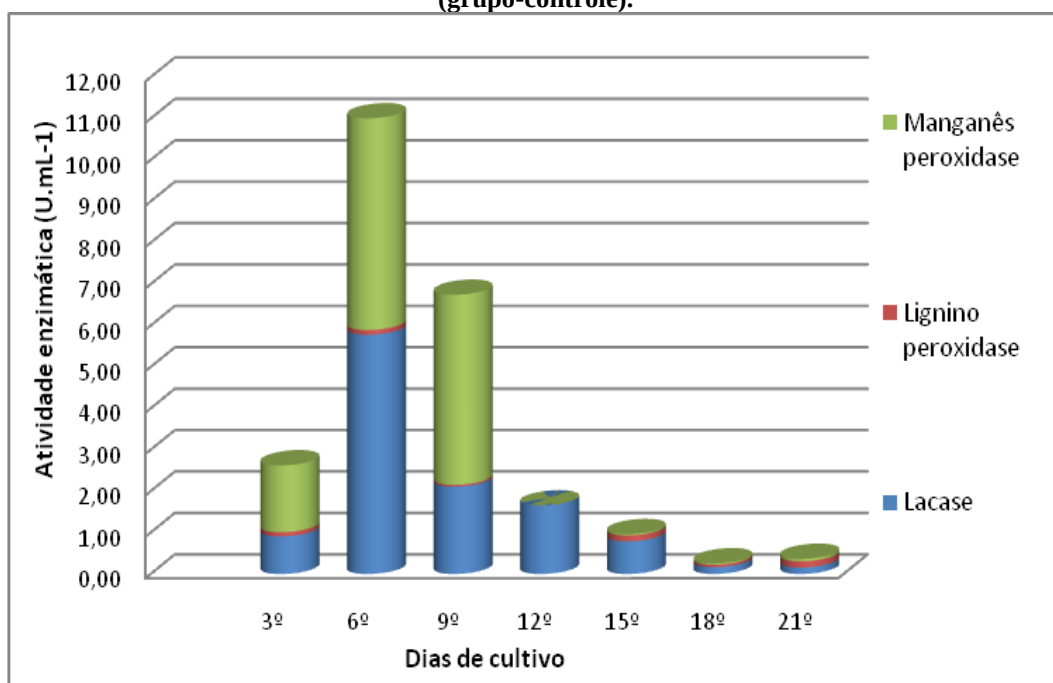


Figura 53 - Atividade enzimática do fungo *Pleurotus ostreatus* no meio BD 0% com ATZ 100 em condição estática

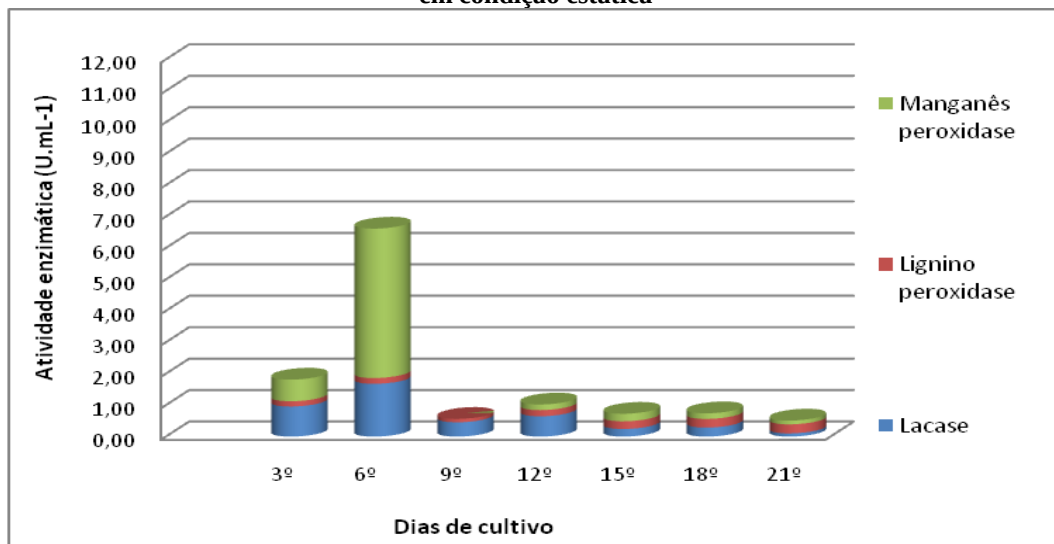


Figura 54 - Produção de Lacase pelo *Pleurotus ostreatus* no meio BD 0% em condição estática.

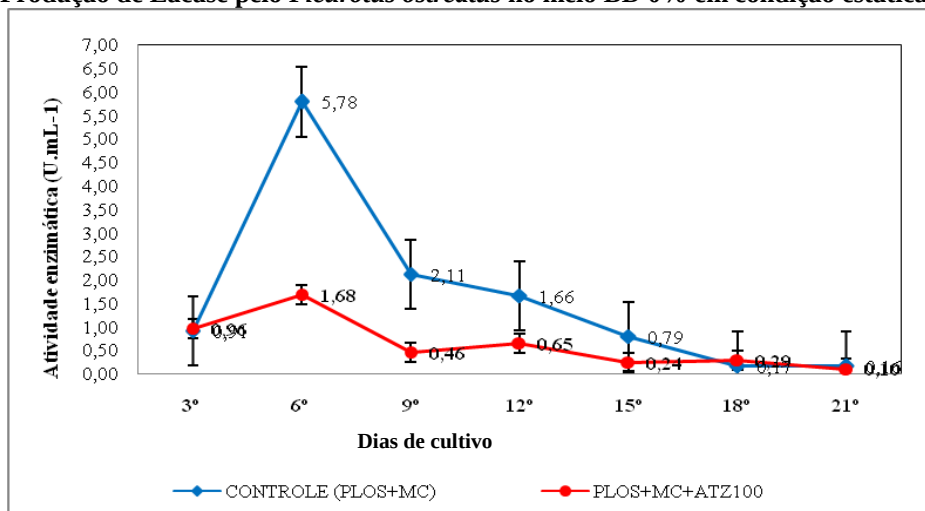


Figura 55 - Produção da enzima MnP pelo *Pleurotus ostreatus* no meio BD 0% em condição estática.

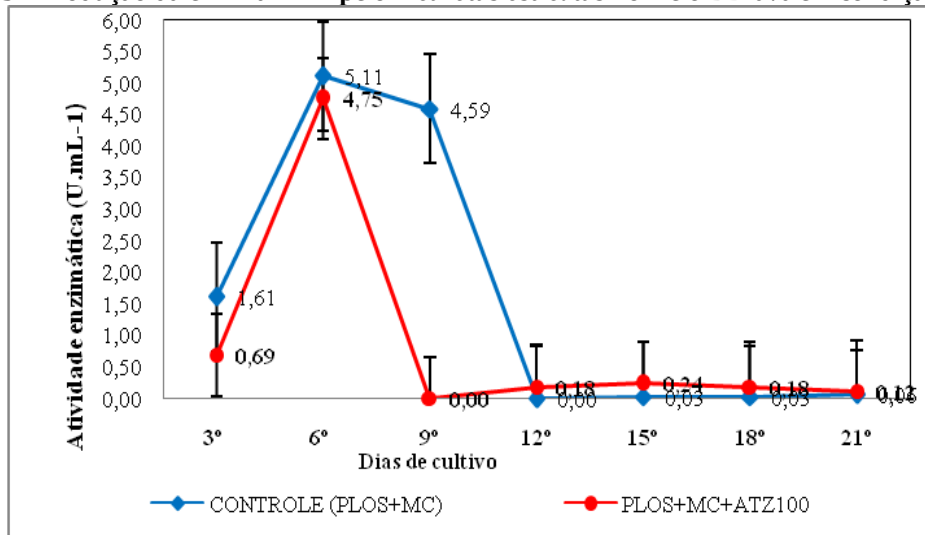
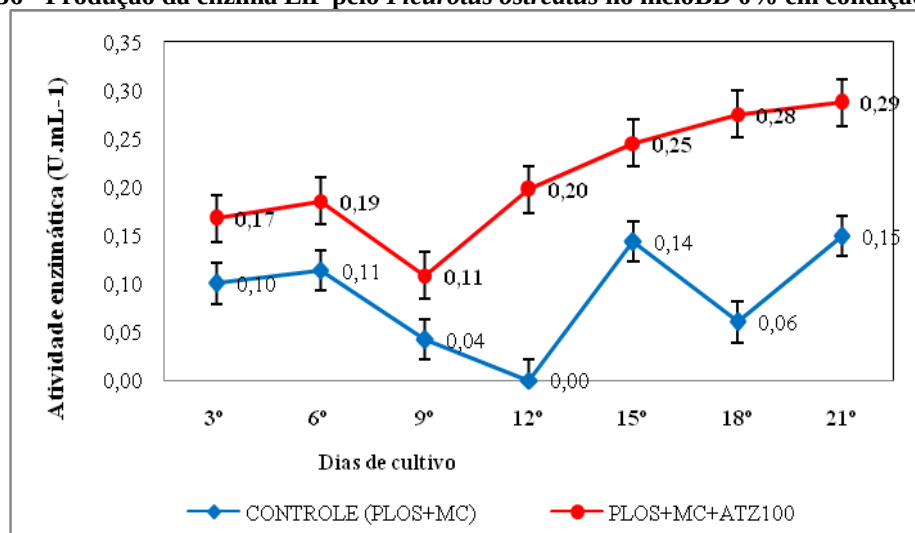


Figura 56 - Produção da enzima LiP pelo *Pleurotus ostreatus* no meio BD 0% em condição estática.



6.3.2.3 Redução da concentração da atrazina nos experimentos com *Pleurotus ostreatus* em meio de cultura BD 0% em condição estática

A média geral da concentração da atrazina do grupo controle de toxicidade, no meio de cultivo BD 0% foi $119,4 \text{ mg.L}^{-1}$ (Tabela 2), este valor foi utilizado para comparação dos demais valores encontrados no decorrer do experimento.

A Tabela 8 e Figura 57 apresentam os resultados da concentração do herbicida durante o período do experimento. Inicialmente (T0) a média dos valores da concentração de atrazina foi $125,2 \text{ mg.L}^{-1}$ e no final do 21º dia de cultivo foi encontrado 39 mg.L^{-1} de atrazina, correspondente a 68,8% de redução.

O resultado do teste de adsorção demonstrou que o micro-organismo teve a capacidade de reduzir em 22,5% a quantidade do herbicida pelo mecanismo de adsorção na biomassa, inicialmente a concentração de atrazina foi $117,1 \text{ mg.L}^{-1}$ e no final do experimento, após 21 dias de incubação o resultado foi $90,7 \text{ mg.L}^{-1}$ (Tabela A 2 – Apêndice A).

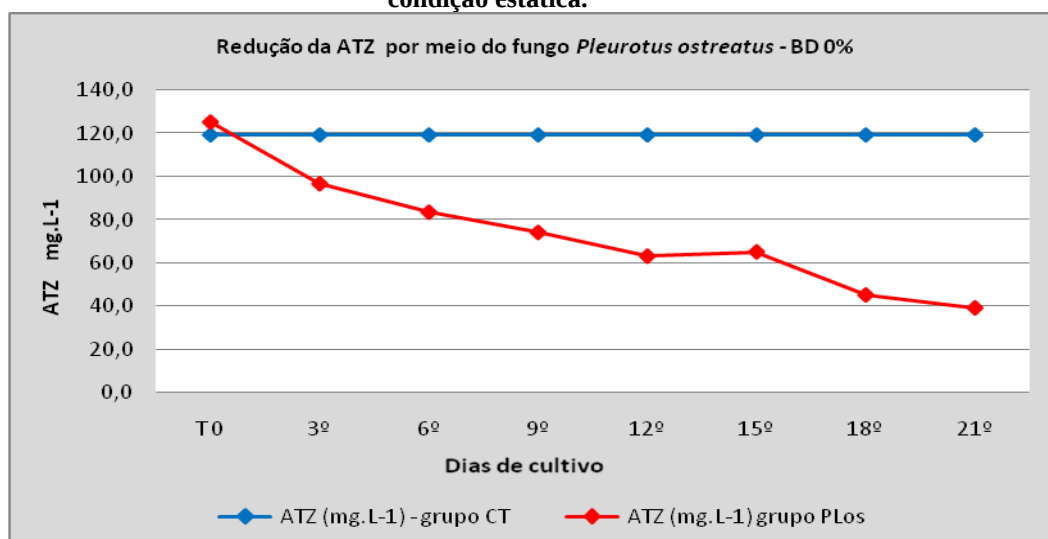
Diante dos resultados obtidos, verificou-se que a redução da concentração da atrazina nas condições avaliadas deu-se principalmente pela atividade enzimática (48,4%), provavelmente pela atividade das enzimas manganês peroxidase e lacase.

Tabela 8 - Concentração de atrazina no experimento com o fungo *Pleurotus ostreatus* no meio de cultura (BD 0%) em condição estática.

Dias de cultivo	Frasco 7 ATZ (mg.L ⁻¹)	Frasco 8 ATZ (mg.L ⁻¹)	Média ATZ (mg.L ⁻¹)	% Remoção
0	128,0	122,4	125,2	
3	94,1	99,1	96,6	
6	83,3	83,5	83,4	
9	69,0	79,0	74,0	
12	65,0	61,0	63,0	
15	56,0	74,0	65,0	
18	46,8	43,8	45,0	
21	35,0	43,0	39,0	68,8

Legenda: Frasco 7: meio de cultura BD 0% + PLos + ATZ 100; Frasco 8: meio de cultura BD 0% + PLos + ATZ 100; ATZ: atrazina.

Figura 57- Redução da concentração de atrazina por meio do fungo *Pleurotus ostreatus* no meio BD 0% na condição estática.



6.3.2.4 Atividade enzimática do *Pleurotus ostreatus* em BD 40% em condição estática

O fungo *Pleurotus ostreatus* apresentou excelentes resultados de produtividade enzimática no meio de cultura BD 40%, quando comparados com os resultados em meio BD 0% e com os resultados dos demais micro-organismos utilizados nesta pesquisa.

As Figuras 58 e 59 mostram o perfil da produtividade das enzimas no grupo-controle e no grupo experimental, respectivamente, onde pode ser observado o predomínio da enzima lacase durante todo o período de estudo. As quantidades foram mais relevantes no grupo-controle apresentando relação com a quantidade de biomassa formada que também foi maior neste grupo.

Figura 58 - Atividade enzimática do fungo *Pleurotus ostreatus* no meio BD 40% em condição estática (grupo-controle).

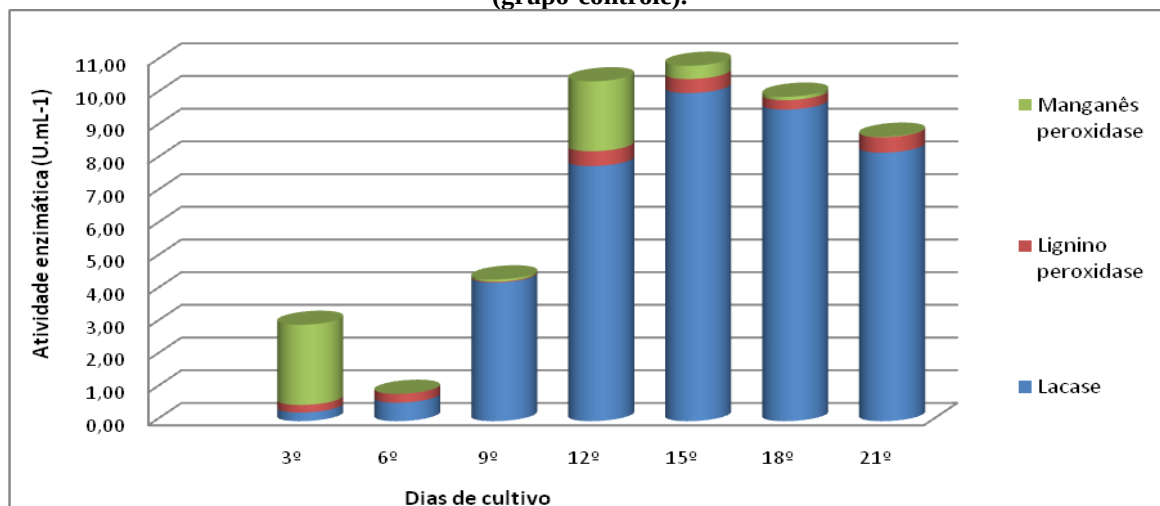
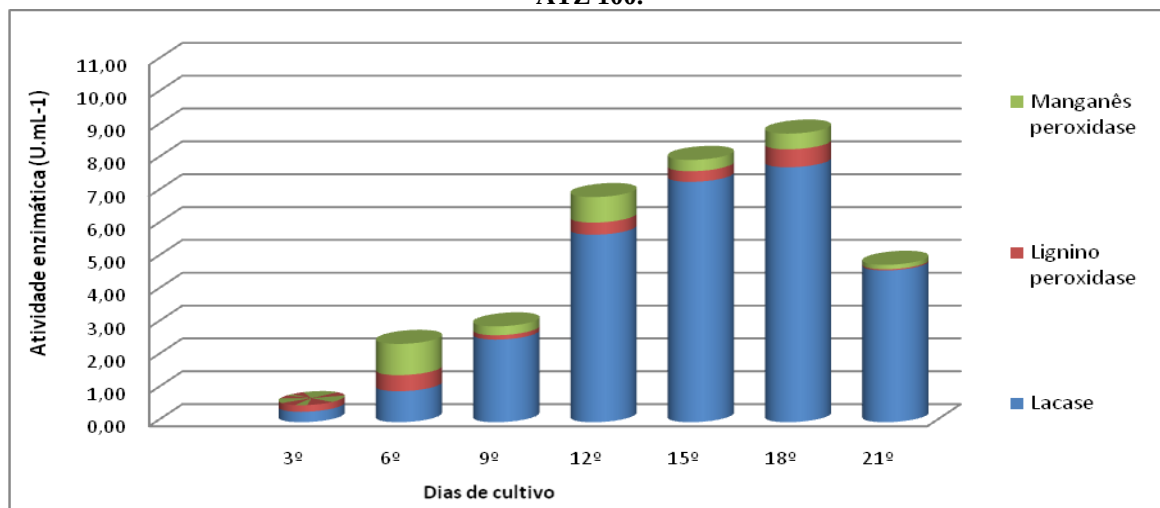


Figura 59 - Atividade enzimática do fungo *Pleurotus ostreatus* no meio BD 40% em condição estática com ATZ 100.



A produção da enzima lacase foi semelhante nos dois grupos, sendo crescente durante o período analisado e redução da quantidade a partir do 18º dia de cultivo. Os maiores picos foram observados no 15º dia (Figura 60), sendo $10,04 \text{ U.mL}^{-1}$ no grupo-controle e $7,32 \text{ U.mL}^{-1}$ no grupo contendo o herbicida.

Foi evidenciada também pouca produção da enzima manganês peroxidase (Figura 61), com picos no grupo-controle de $2,45 \text{ U.mL}^{-1}$ e $2,14 \text{ U.mL}^{-1}$ no 3º e 12º dias de cultivo e picos menores no grupo contendo atrazina $0,95 \text{ U.mL}^{-1}$ e $0,78 \text{ U.mL}^{-1}$ no 6º e 12º dias de cultivo. Desta forma é possível afirmar que a enzima predominante é a lacase.

A enzima lignina peroxidase apresentou valores muito pequenos, considerado inexistente, com resultados abaixo de $0,55 \text{ U.mL}^{-1}$, tanto no grupo-controle como grupo contendo atrazina (Figura 62).

Durante o período de estudo, houve pequena alteração do pH do meio de cultura nos dois grupos, inicialmente 5,5 e a partir do 12º dia diminuiu para 4,5.

Figura 60 - Produção de Lacase pelo *Pleurotus ostreatus* no meio BD 40% em condição estática.

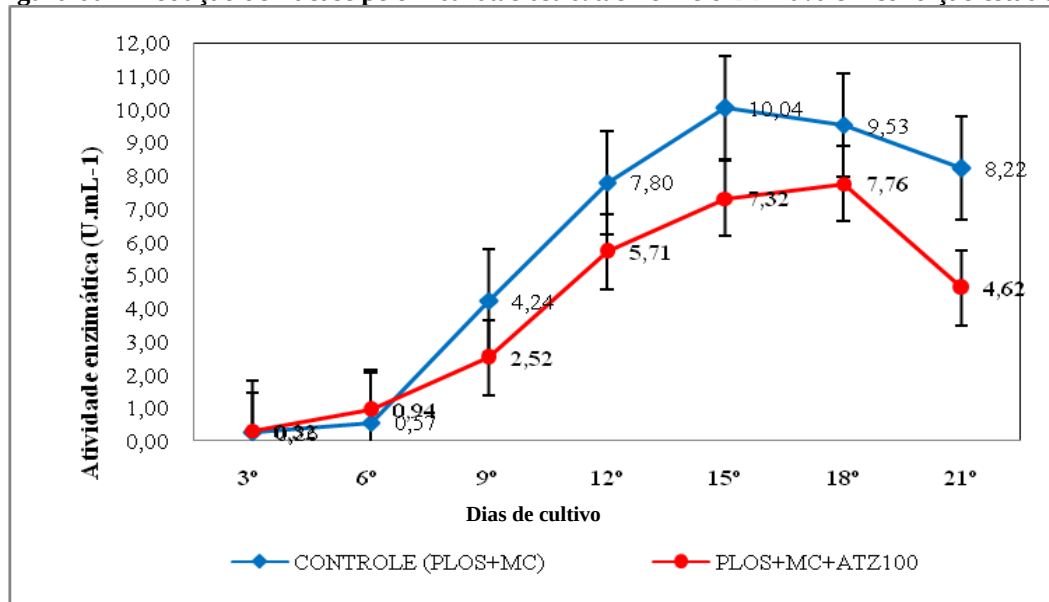


Figura 61 - Produção de MnP pelo *Pleurotus ostreatus* no meio BD 40% em condição estática.

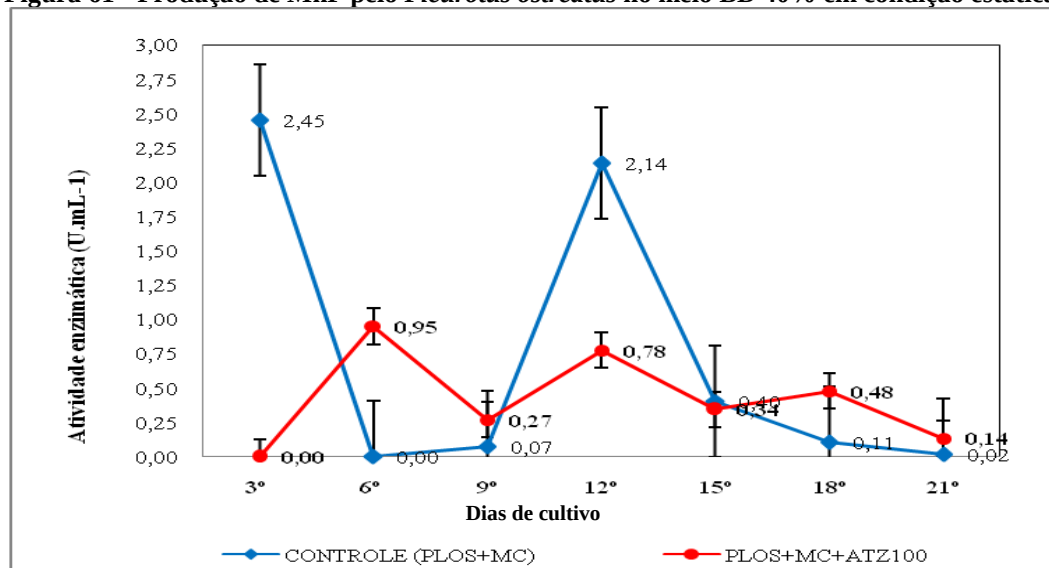
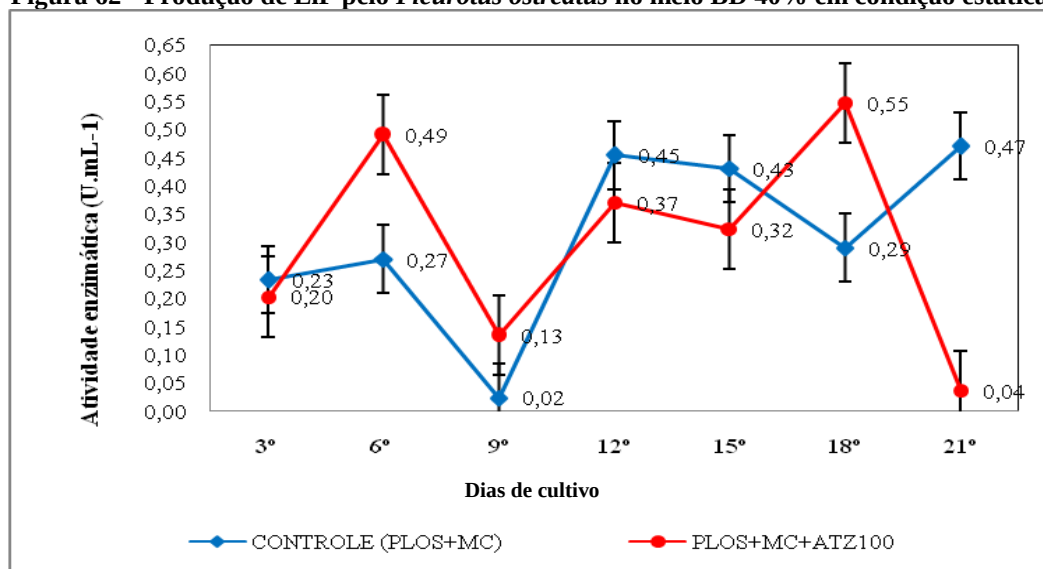


Figura 62 - Produção de LiP pelo *Pleurotus ostreatus* no meio BD 40% em condição estática.



6.3.2.5 Redução da concentração da atrazina nos experimentos com *Pleurotus ostreatus* em meio de cultura BD 40% em condição estática

A média da concentração da atrazina do grupo CT, no meio de cultivo BD 40% foi 110,4 mg.L⁻¹ (Tabela 4), este valor foi utilizado como referência para comparação dos demais valores encontrados durante o período de cultivo.

Houve diminuição da concentração da atrazina de forma gradativa durante o período do experimento. No início (T0) a média da concentração de atrazina foi 103,5 mg.L⁻¹ e o menor valor encontrado 12,9 mg.L⁻¹ no 21º dia, correspondente a 87,5% de redução (Tabela 9 e Figura 63).

As análises cromatográficas foram realizadas com frequência de 3 em 3 dias de cultivo. A Figura 64 apresenta os cromatogramas das análises realizadas no dia da inoculação (T0) do grupo controle da toxicidade, do grupo experimental e no final do período de incubação. O tempo de retenção da atrazina foi 10,698 minutos.

A concentração inicial da ATZ no início de teste de adsorção foi 109,0 mg.L⁻¹ e no final 81,0 mg.L⁻¹, ocorreu uma diminuição de 25,7% do herbicida (Tabela A 2 – Apêndice A) logo pode-se inferir que o principal mecanismo envolvido na redução da quantidade atrazina, nestas condições, foi o enzimático, principalmente pela atividade da lacase que esteve presente em maior quantidade durante os experimentos.

Tabela 9 - Concentração de atrazina no experimento com o fungo *Pleurotus ostreatus* no meio de cultura BD 40% em condição estática

Dias de cultivo	Frasco 7 ATZ (mg.L ⁻¹)	Frasco 8 ATZ (mg.L ⁻¹)	Média ATZ (mg.L ⁻¹)	% Remoção
0	107,2	99,8	103,5	
3	83,1	75,5	78,3	
6	53,1	50,3	51,7	
9	42,3	49,3	45,8	
12	39,7	50,7	45,2	
15	22,3	32,3	27,3	
18	18,4	16,8	17,6	
21	15,7	10,1	12,9	87,5

Legenda: Frasco 7: meio de cultura BD 40% + PLos + ATZ 100; Frasco 8: meio de cultura BD 40% + PLos + ATZ 100; ATZ: atrazina.

Figura 63 - Redução da concentração de atrazina por meio do fungo *Pleurotus ostreatus* no meio BD 40% na condição estática.

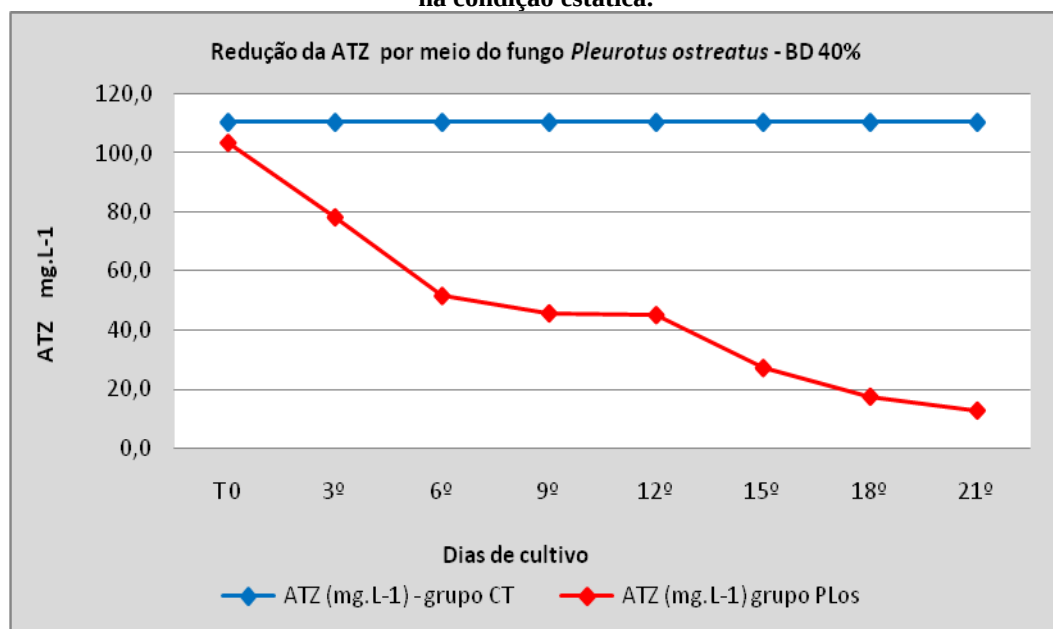
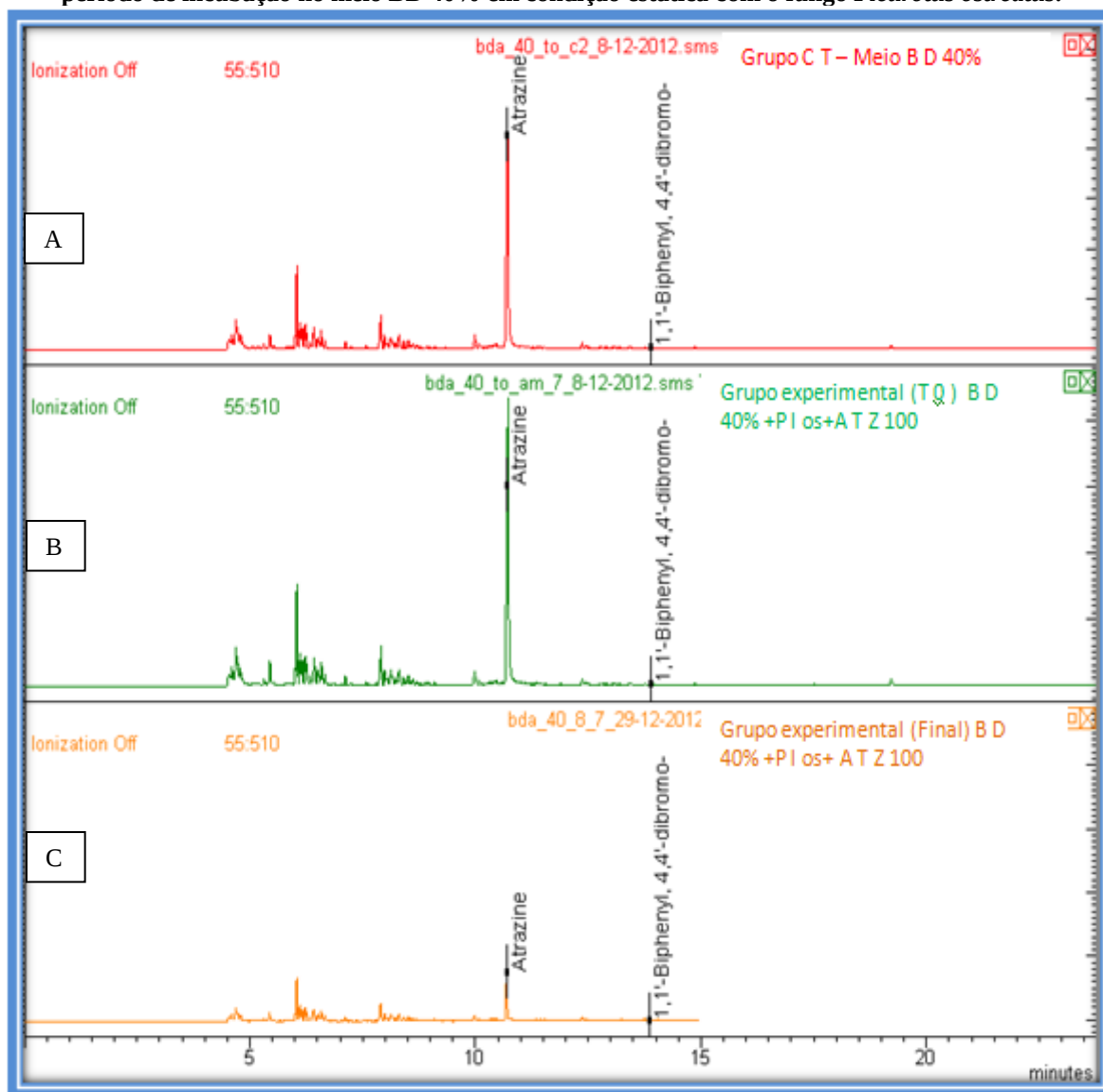


Figura 64- Cromatograma da atrazina no tempo (T0) do grupo CTe grupo experimental e no final do período de incubação no meio BD 40% em condição estática com o fungo *Pleurotus ostreatus*.



Legenda: A (Grupo controle de toxicidade no tempo T0); B (Meio de cultura+PLos+ATZ no tempo T0); C (Meio de cultura+PLos+ATZ após 21 dias de cultivo)

6.3.2.6 Atividade enzimática do *Pleurotus ostreatus* em BD 40% sob agitação

Em meio de cultura BD 40% sob agitação, o fungo *Pleurotus ostreatus* também apresentou excelentes resultados de produtividade enzimática, com predomínio da lacase, semelhante ao encontrado com os experimentos no meio de cultura BD 40% em condição estática. As Figuras 65 e 66 mostram os resultados do grupo-controle e do grupo experimental, respectivamente.

As quantidades de enzimas foram mais relevantes no grupo-controle, apresentando relação direta com a quantidade de biomassa formada, exceto no 3º dia em que o pico da lacase foi 20 vezes maior no grupo contendo atrazina, sugere-se que este herbicida induz à produção de Lcc.

Figura 65- Atividade enzimática do fungo *Pleurotus ostreatus* no meio BD 40% sob agitação (grupo-controle).

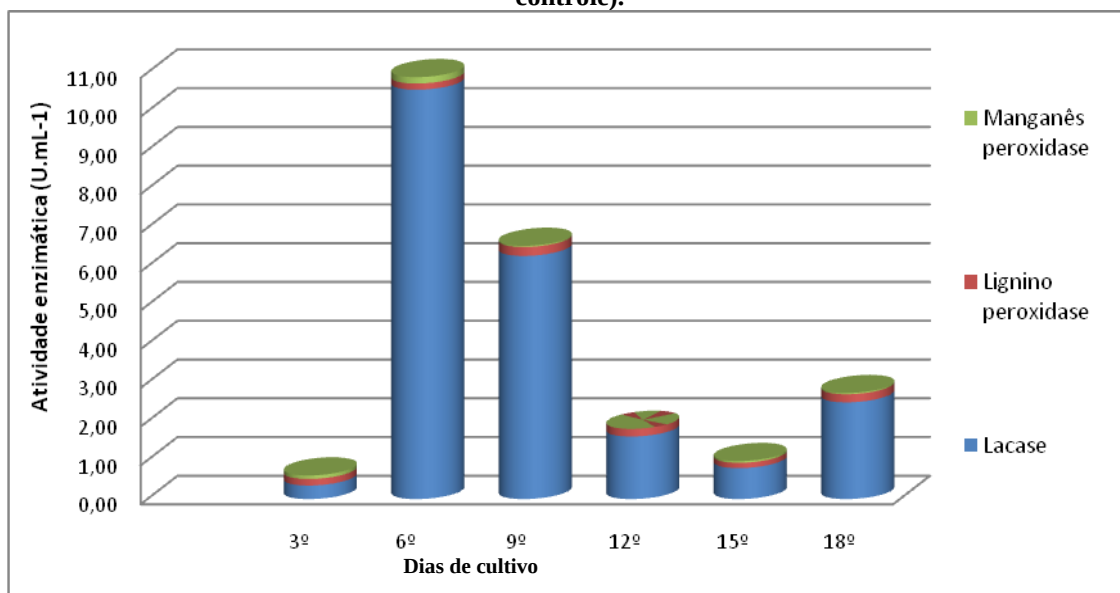
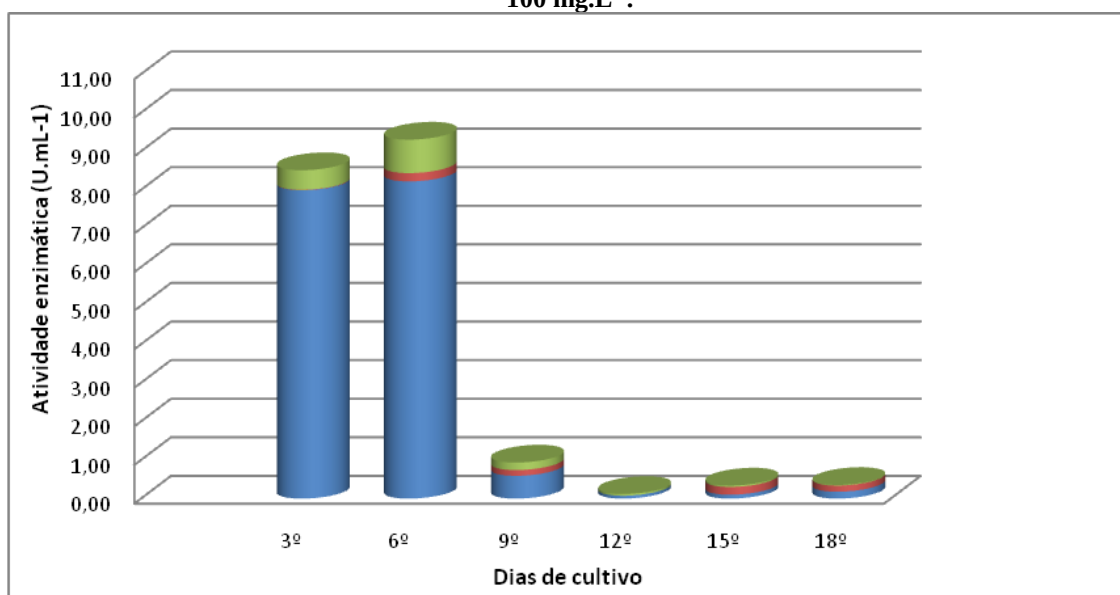


Figura 66 - Atividade enzimática do fungo *Pleurotus ostreatus* no meio BD 40% sob agitação com atrazina 100 mg.L⁻¹.



No gráfico da Figura 67 é possível observar o pico da lacase no grupo-controle no 6º dia 10,6 U.mL⁻¹, nos demais dias avaliados percebe-se uma redução gradativa da produção desta enzima até o 15º dia e no final do experimento nota-se uma tendência do aumento da produção. Os maiores picos da lacase no grupo com ATZ 100 foram observados nos seis

primeiros dias de cultivo, 8,0 U.mL⁻¹ e 8,2 U.mL⁻¹ e a partir no 9º dia praticamente não foi detectada a presença desta enzima.

Quanto à enzima manganês peroxidase foi considerada baixa produtividade nos dois grupos (controle e experimental), porém a maior dosagem foi observada no grupo contendo o herbicida, com pico 0,87 U.mL⁻¹ e 0,16 U.mL⁻¹ no grupo-controle, no 6º dia de cultivo. A partir do 12º dia, praticamente não houve a produção desta enzima (Figura 68).

A produção de lignina peroxidase foi considerada inexistente nos dois grupos avaliados, com resultados $\leq 0,23$ U.mL⁻¹ (Figura 69). Estes dados confirmam que a espécie *Pleurotus* não produz a enzima lignina peroxidase.

Durante o período experimental, foi verificado o potencial hidrogeniônico do meio de cultivo, inicialmente (T0) o pH estava em 5,5 e no final do experimento (18º dia) o pH do grupo-controle aumentou para pH 6,0, observando-se que este valor foi encontrado também no grupo contendo atrazina, a partir do 9º dia de cultivo. Importante ressaltar que este resultado difere dos demais apresentados nas condições anteriores que mostraram uma diminuição do valor do pH.

Figura 67 - Produção de Lacase pelo *Pleurotus ostreatus* em BD 40% sob agitação.

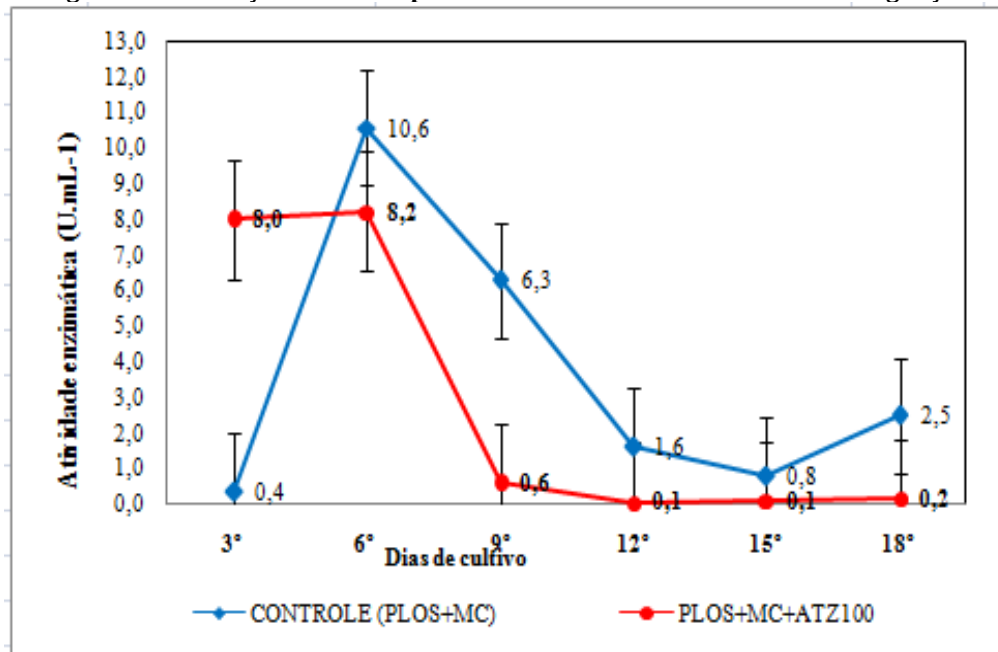


Figura 68 - Produção de Manganês peroxidase pelo *Pleurotus ostreatus* em meio BD 40% sob agitação.

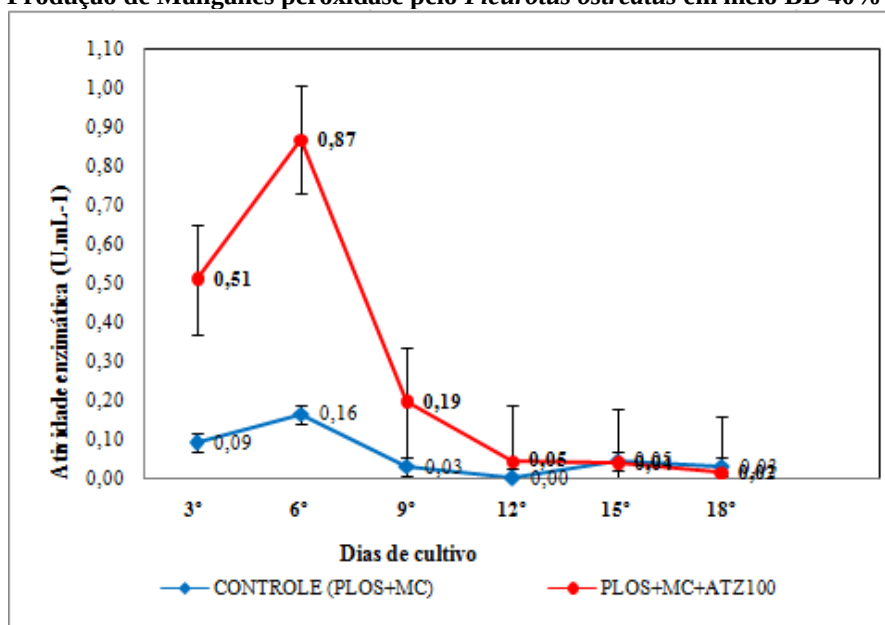
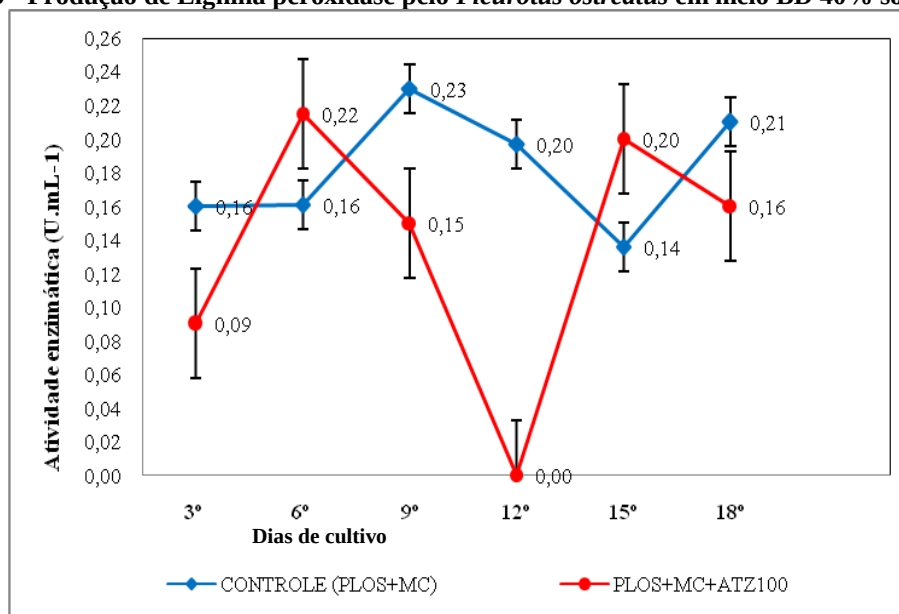


Figura 69 - Produção de Lignina peroxidase pelo *Pleurotus ostreatus* em meio BD 40% sob agitação.



6.3.2.7 Redução da concentração da atrazina nos experimentos com *Pleurotus ostreatus* em meio de cultura BD 40% sob agitação

A média geral da concentração da atrazina do grupo controle de toxicidade foi 107,4 mg.L⁻¹(Tabela 6), este resultado foi utilizado como referência para comparação dos demais valores encontrados durante o período de cultivo.

Os resultados da quantificação da atrazina durante o período experimental (Tabela 10 e Figura 70) mostram uma redução gradativa da concentração do herbicida. A média inicial foi $102,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e a menor concentração, $15,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de atrazina, foi observada no final do experimento, valor correspondente a uma redução 84,8%. O tempo de retenção da atrazina foi de 10,698 minutos, nos grupos CT e grupo experimental, tanto no início como no final do período de incubação (Figura 71).

O principal mecanismo de remoção do herbicida foi pela ação das enzimas, principalmente pela lacase, porém houve remoção de 49% do valor total pelo mecanismo de adsorção na biomassa (Tabela A 2 – Apêndice A).

Tabela 10 - Concentração de atrazina no experimento com o fungo *Pleurotus ostreatus* no meio de cultura BD 40% sob agitação

Dias de cultivo	Frasco 7 ATZ (mg.L^{-1})	Frasco 8 ATZ (mg.L^{-1})	Média ATZ (mg.L^{-1})	% Remoção
0	107,0	98,0	102,5	
3	83,0	90,0	86,5	
6	82,3	89,9	86,1	
9	61,2	48,4	54,8	
12	44,9	49,7	47,3	
15	23,1	30,1	26,6	
18	13,8	17,4	15,6	84,8

Legenda: Frasco 7: meio de cultura BD 40% + PLos + ATZ 100; Frasco 8: meio de cultura BD 40% + PLos + ATZ 100; ATZ: atrazina.

Figura 70 - Redução da concentração de atrazina por meio do fungo *Pleurotus ostreatus* no meio BD 40% sob agitação.

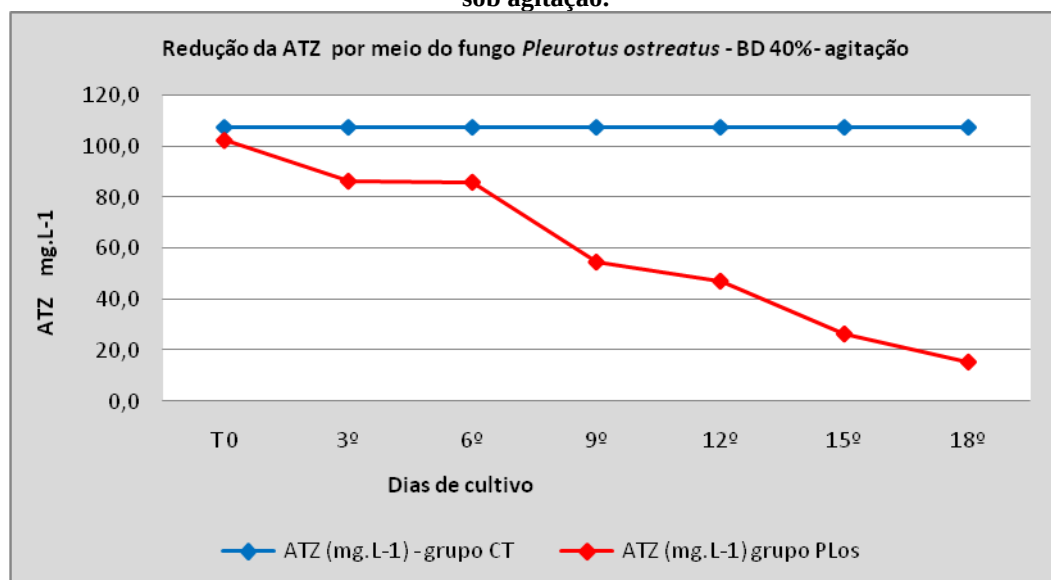
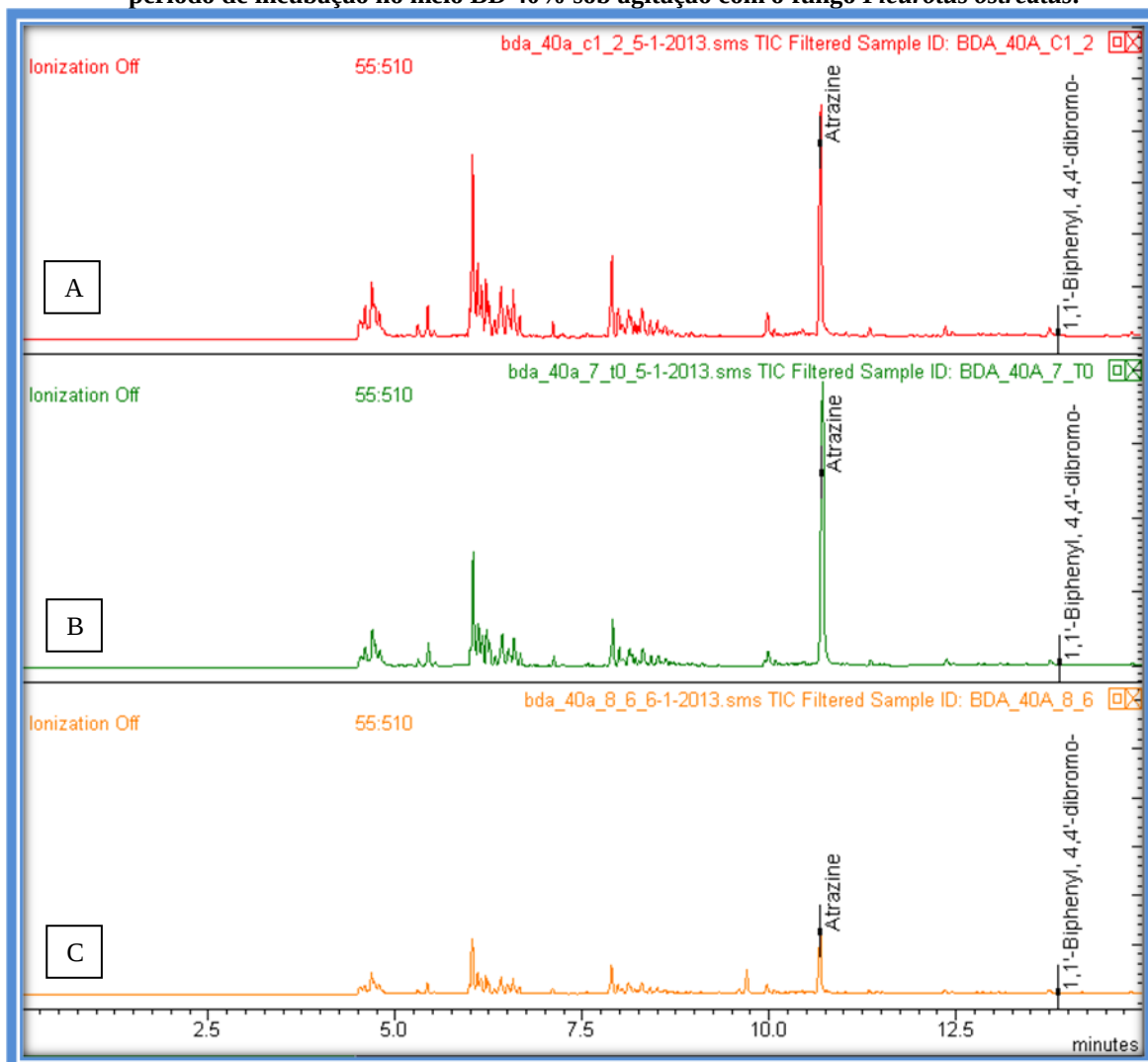


Figura 71- Cromatograma da atrazina no tempo (T0) do grupo CTe grupo experimental e no final do período de incubação no meio BD 40% sob agitação com o fungo *Pleurotus ostreatus*.



Legenda: A (Grupo controle de toxicidade no tempo T0); B (Meio de cultura+P_{Los}+ATZ no tempo T0); C (Meio de cultura+P_{Los}+ATZ após 21 dias de cultivo)

6.3.3 Resultados do micro-organismo *Pleurotus* sp

6.3.3.1 Produção de biomassa pelo micro-organismo *Pleurotus* sp nos meios de cultura BD 0% e BD 40% nas condições estática e sob agitação

A formação da biomassa na presença da atrazina 100 mg.L⁻¹ nas condições avaliadas foram visivelmente menores que na ausência do herbicida (Figuras 72 e 73).

Figura 72- Biomassa do *Pleurotus* sp nos meios de cultura BD 0% e BD40% nas condições estática e sob agitação com adição de atrazina (ATZ100) e sem atrazina (controle).

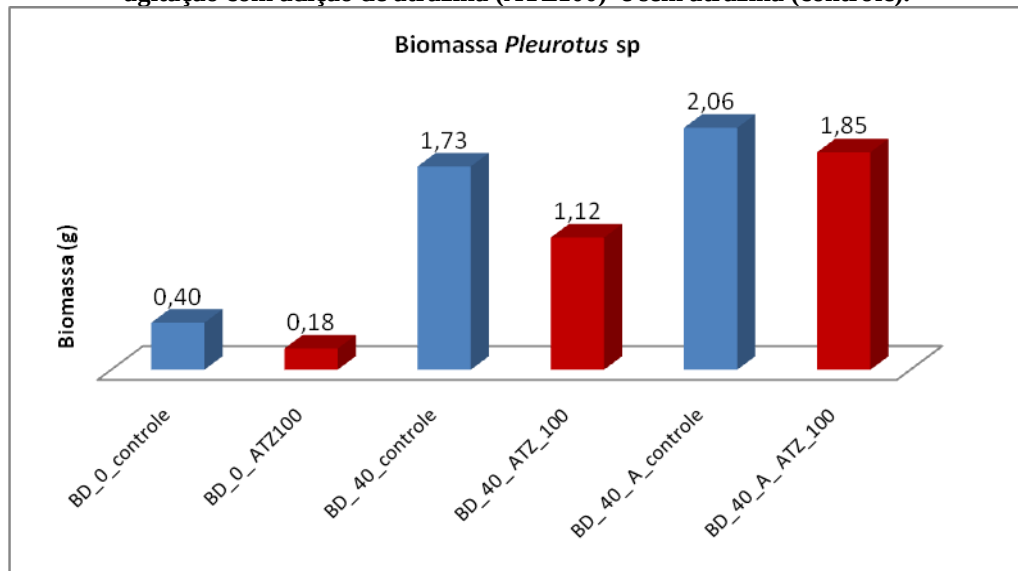


Figura 73 - Biomassa do *Pleurotus* sp no meio de cultura BD 40% em condição estática após 18 dias de cultivo.



Legenda: A) Grupo controle B) Grupo com ATZ100.

A formação dos micélios foi semelhante nos dois grupos (controle e experimental), observando-se, ainda, o sobrenadante de aspecto límpido e transparente.

Os maiores pesos (g) dos micélios secos obtidos foram nos experimentos com meio de cultura BD 40% sob agitação e em seguida na condição estática. Os resultados no meio BD 0% mostram que em baixa condição nutricional houve impacto na formação da biomassa, sendo necessário o complemento com caldo de batata para melhorar o crescimento e desenvolvimento.

6.3.3.2 Atividade enzimática do *Pleurotus* sp em BD 0% em condição estática

No meio de cultura contendo apenas dextrose como fonte de carbono houve impacto na formação da biomassa, porém sem interferência na produção de enzimas, principalmente a manganês peroxidase que mais se destacou durante o experimento com o grupo-controle (Figura 74).

No grupo contendo atrazina, de modo geral houve uma redução da quantidade de enzimas produzidas, mostrando que o herbicida interferiu não só na formação da biomassa, mas também como inibidor enzimático (Figura 75).

Figura 74 - Atividade enzimática do fungo *Pleurotus* sp no meio BD 0% em condição estática (grupo-controle).

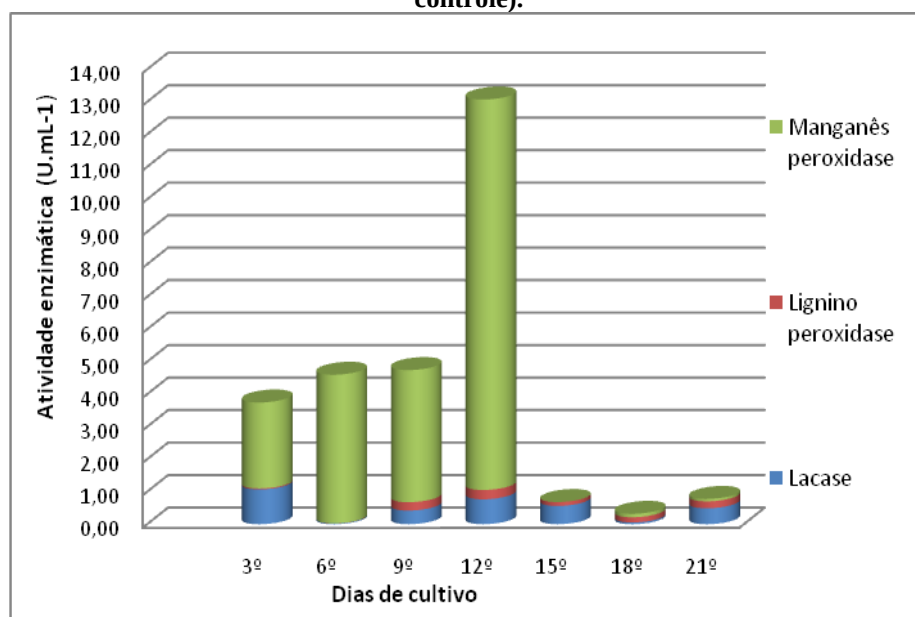
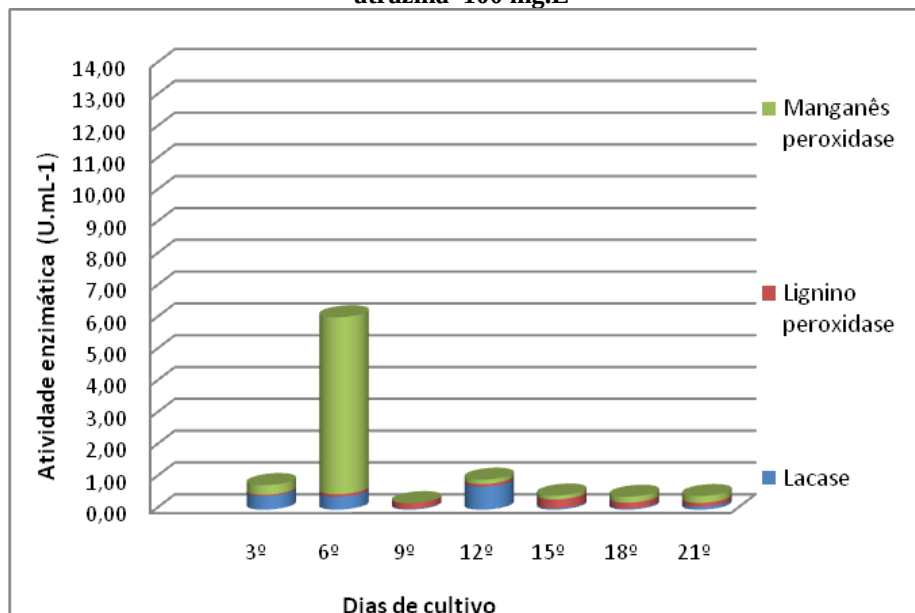


Figura 75 - Atividade enzimática do fungo *Pleurotus* sp no meio BD 0% em condição estática com atrazina 100 mg.L⁻¹



Os resultados da produção de lacase estão representados na Figura 76. Os maiores picos foram observados no grupo-controle 1,07 U.mL⁻¹ no 3º dia de cultivo e 0,77 U.mL⁻¹ no 12º dia, no grupo contendo atrazina 100mg.L⁻¹ o maior pico foi 0,73 U.mL⁻¹, também no 12º dia, os demais valores foram $\leq 0,43$ U.mL⁻¹, valores estes considerados baixos e, ainda assim, foram os maiores valores de Lcc obtidos neste experimento.

A Figura 77 mostra a produção da enzima manganês peroxidase do grupo-controle e do grupo contendo o herbicida, onde pode-se observar que a maior quantidade produzida foi pelo grupo sem a presença da atrazina, com pico 12,02 U.mL⁻¹ no 12º dia de cultivo e a partir deste período não foi detectada a presença desta enzima.

Quanto à produção da enzima lignina peroxidase foi considerada insignificante, todos os valores ficaram abaixo de 0,29 U.mL⁻¹ (Figura 78).

No grupo com ATZ 100, o único pico significativo foi no 6º dia (5,56 U.mL⁻¹), sendo maior que no grupo-controle (4,57 U.mL⁻¹) e nos demais dias avaliados pode-se considerar quase inexistente a MnP que apresentou valores próximos de zero.

Durante o período de cultivo, foi monitorado o potencial hidrogeniônico do meio, praticamente não houve mudança, o pH inicial foi de 5,5 e a partir do 18º dia diminuiu para 5,0 e manteve este valor até o final do experimento.

Figura 76- Produção de Lacase pelo *Pleurotus* sp no meio BD 0% em condição estática.

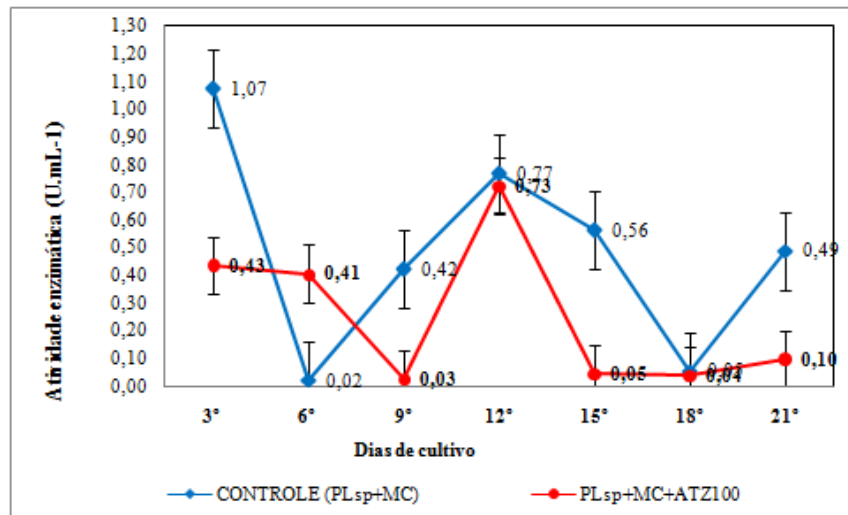


Figura 77 - Produção de Manganês peroxidase pelo *Pleurotus* sp no meio BD 0% em condição estática.

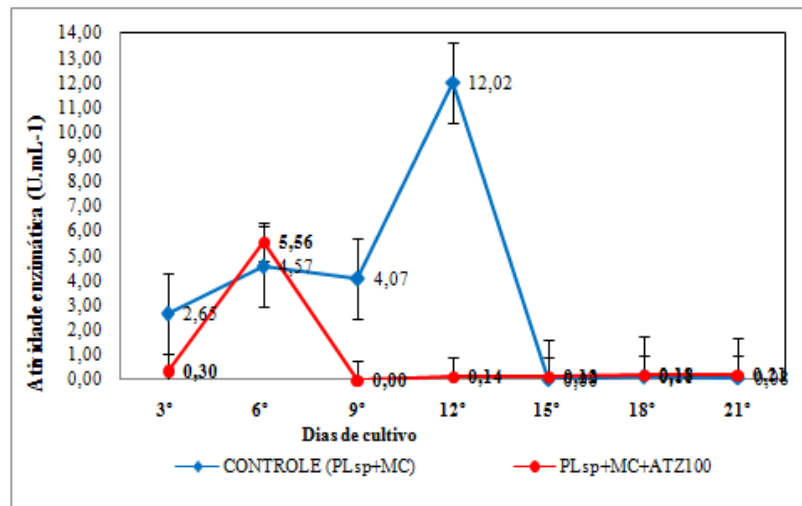
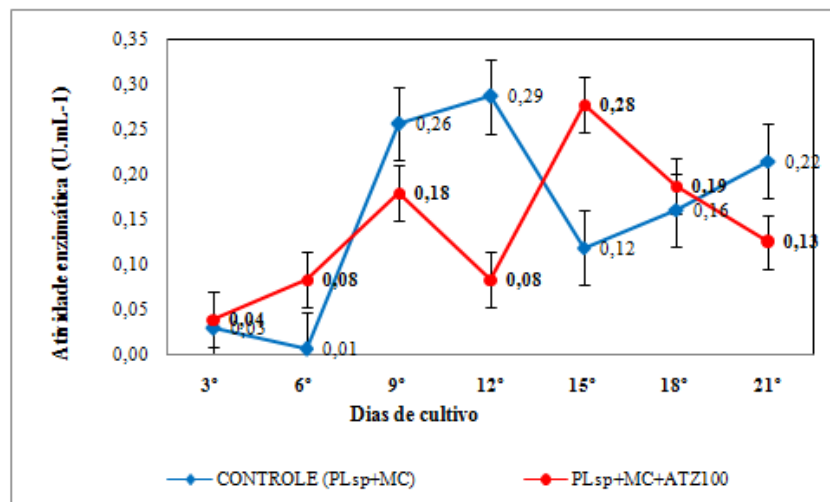


Figura 78 - Produção de Lignina peroxidase pelo *Pleurotus* sp no meio BD 0% em condição estática.



6.3.3.3 Redução da concentração da atrazina nos experimentos com *Pleurotus* sp em meio de cultura BD 0% em condição estática

A concentração da ATZ do grupo controle de toxicidade, no meio de cultivo BD 0% foi 119,4 mg.L⁻¹ (Tabela 2), corresponde a média geral dos resultados obtidos durante o experimento e serviu de referência para comparação dos demais resultados encontrados no período experimental.

Na Tabela 11 e Figura 79 estão apresentados os resultados da quantificação da atrazina. A concentração inicial de ATZ foi 112,0 mg.L⁻¹ e o menor valor encontrado do herbicida foi 51,7 mg.L⁻¹ no 21º dia de cultivo, correspondente a 53,8% de redução. A Figura 80 mostra os cromatogramas e o tempo de retenção da atrazina, em 10,703 minutos, das análises realizadas no grupo controle de toxicidade (CT) e do grupo experimental, no primeiro dia de incubação (T0).

Os resultados do teste de adsorção indicaram que 48,8% da remoção do total foi pelo mecanismo de adsorção na biomassa. Inicialmente a concentração da ATZ foi 126,4 mg.L⁻¹ e no final, após 21 dias de incubação o valor encontrado foi 61,7 mg.L⁻¹ (Tabela A3 – Apêndice A).

Tabela 11 - Concentração de atrazina no experimento com o fungo *Pleurotus* sp no meio de cultura BD 0% em condição estática.

Dias de cultivo	Frasco 11 ATZ (mg.L ⁻¹)	Frasco 12 ATZ (mg.L ⁻¹)	Média ATZ (mg.L ⁻¹)	% Remoção
0	100,3	123,7	112,0	
3	94,0	100,0	97,0	
6	86,2	111,8	99,0	
9	68,0	74,8	71,4	
12	63,8	76,4	70,1	
15	65,0	55,4	60,2	
18	60,3	57,1	58,7	
21	58,3	45,1	51,7	53,8

Legenda: Frasco 11: meio de cultura BD 0% + PLsp + ATZ 100; Frasco 12: meio de cultura BD 0% + PLsp + ATZ 100; ATZ: atrazina.

Figura 79 - Redução da concentração de atrazina por meio do fungo *Pleurotus* sp no meio BD 0% em condição estática.

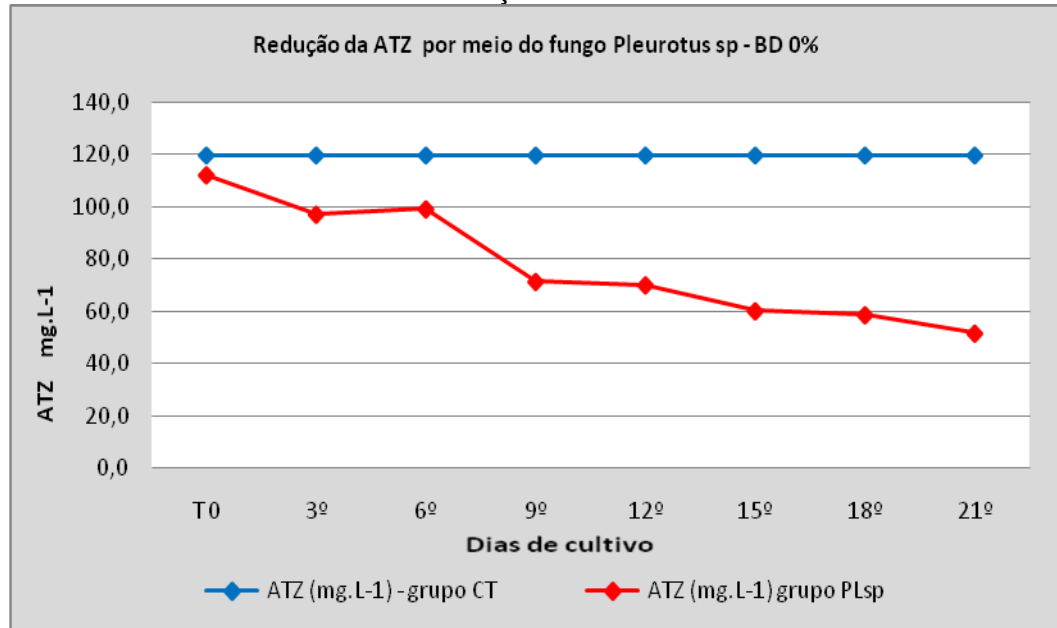
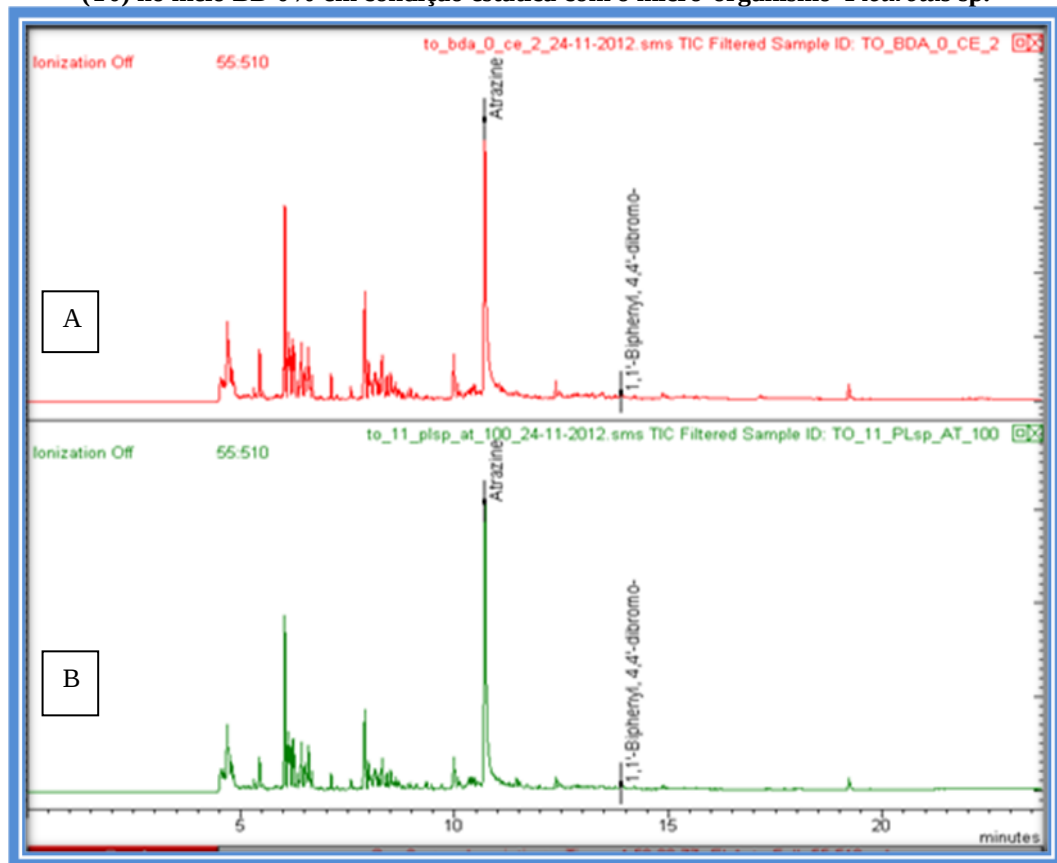


Figura 80- Cromatograma da atrazina do grupo CT e grupo experimental no primeiro dia de inoculação (T0) no meio BD 0% em condição estática com o micro-organismo *Pleurotus* sp.



Legenda: A (Grupo controle de toxicidade no tempo); B (Meio de cultura+PLs+ATZ no tempo T0).

6.3.3.4 Atividade enzimática do *Pleurotus* sp em BD 40% em condição estática

O fungo *Pleurotus* sp apresentou excelentes resultados de produtividade enzimática no meio de cultura BD 40% em condição estática, principalmente no grupo contendo o herbicida, mostrando capacidade de adaptação e tolerância à toxicidade da atrazina.

Os resultados da produtividade de enzimas mostraram-se inversamente proporcionais à formação da biomassa, diferindo dos resultados encontrados nos estudos com o *Pleurotus ostreatus*, em que as dosagens das enzimas foram maiores no grupo-controle, apresentando relação direta com a quantidade de biomassa formada.

As Figuras 81 e 82 mostram os resultados das dosagens das enzimas no grupo-controle e no grupo experimental, nos quais se observa o predomínio da enzima lacase durante todo o período de estudo, exceto no terceiro dia e o grupo-controle apresentou maior quantidade da enzima manganês peroxidase.

O gráfico da Figura 83 mostra o perfil da produção Lcc, sendo crescente até o 9º dia, com pico de $6,17 \text{ U.mL}^{-1}$, a partir deste período apresentou pequena redução da quantidade até o 18º dia de cultivo. No grupo-controle o maior pico encontrado foi $3,95 \text{ U.mL}^{-1}$ já no final do experimento.

Foi detectada pequena quantidade da enzima manganês peroxidase nos dois grupos (controle e experimental), com valores $\leq 0,70 \text{ U.mL}^{-1}$ durante todo o período avaliado, exceto no 3º dia no qual o grupo-controle apresentou pico de $5,92 \text{ U.mL}^{-1}$ (Figura 84).

A enzima LiP, no grupo-controle e no grupo contendo atrazina, apresentou valores insignificantes, abaixo de $0,29 \text{ U.mL}^{-1}$ (Figura 85).

Durante o período de estudo, houve pequena alteração do pH do meio de cultura nos dois grupos. Inicialmente (T0) o pH foi de 5,5, a partir do décimo-segundo dia de cultivo diminuiu para pH 4,0 (grupo-controle) e pH 4,5 (grupo experimental), diminuição esta possivelmente relacionada à produção das enzimas ligninolíticas.

Figura 81 - Atividade enzimática do fungo *Pleurotus* sp no meio BD 40% em condição estática (grupo-controle).

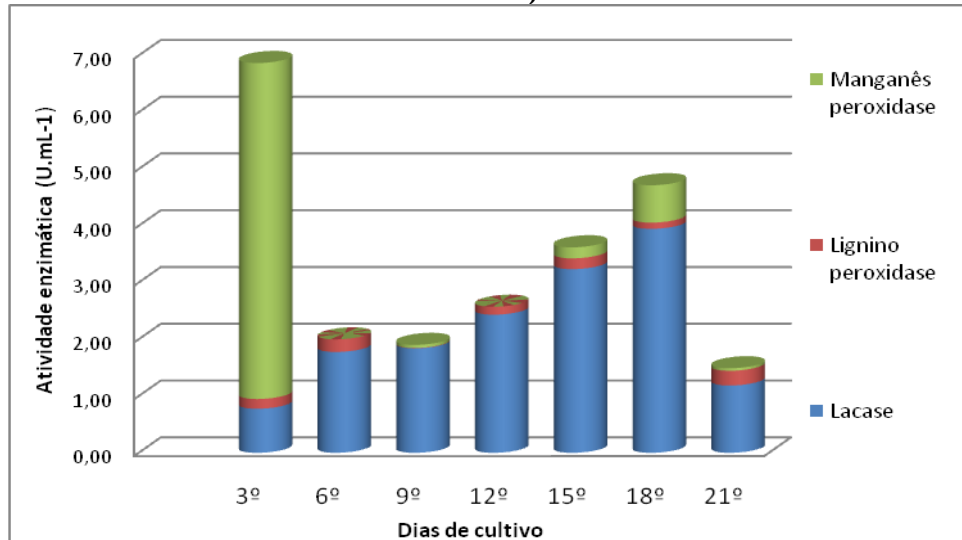


Figura 82 - Atividade enzimática do fungo *Pleurotus* sp no meio BD 40% em condição estática com ATZ 100.

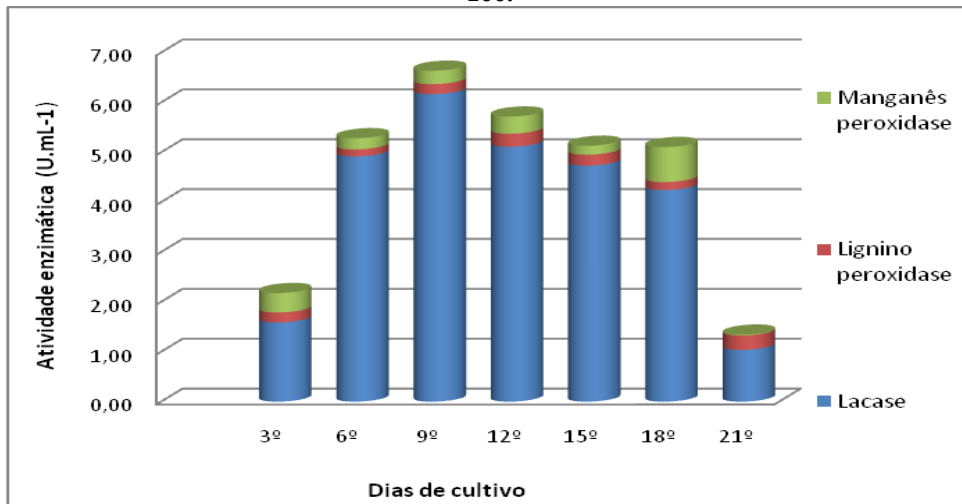


Figura 83- Produção de Lacase pelo *Pleurotus* sp no meio BD 40% em condição estática.

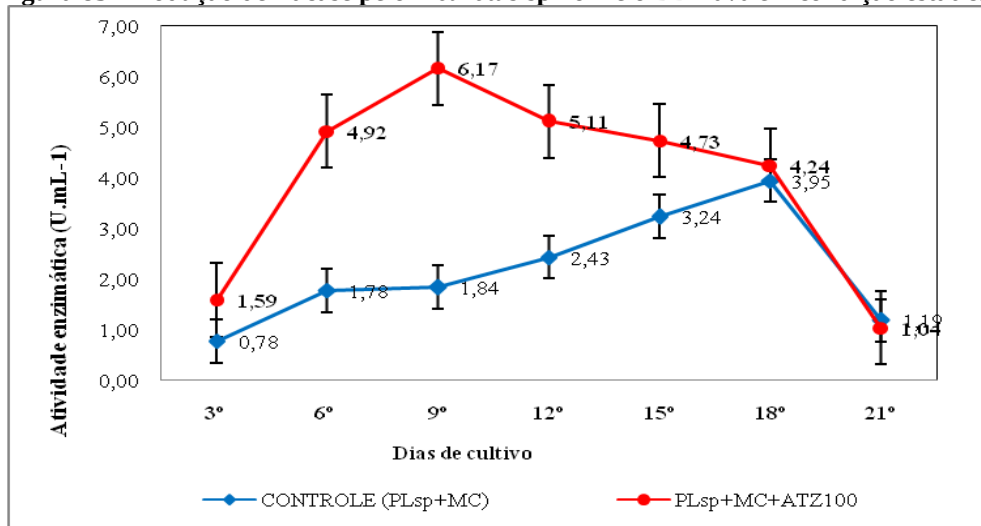


Figura 84 - Produção de Manganês peroxidase pelo *Pleurotus* sp no meio BD 40% em condição estática.

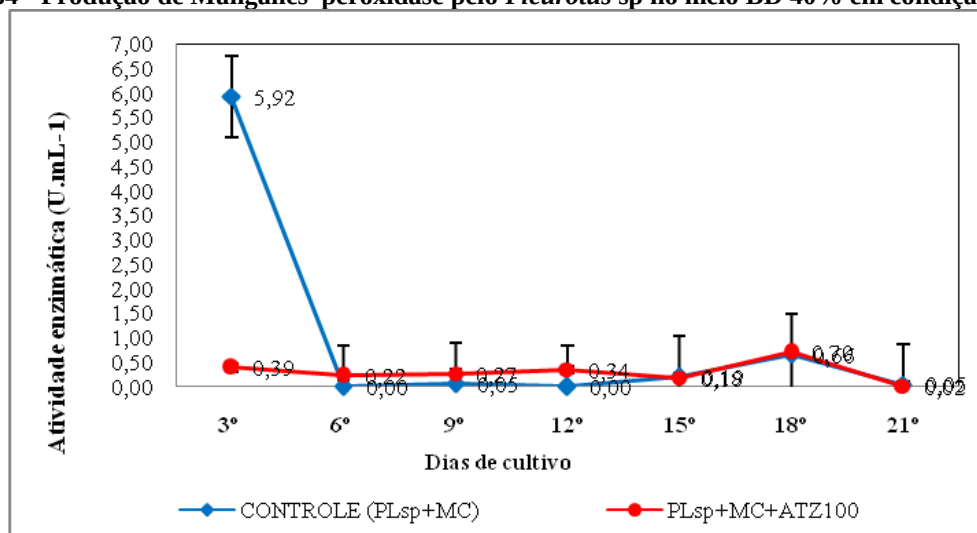
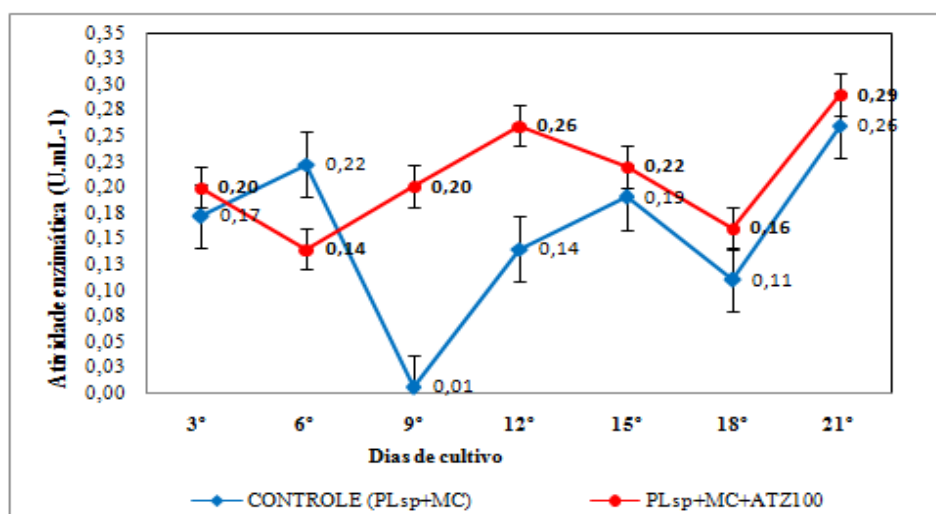


Figura 85 - Produção de Lignina peroxidase pelo *Pleurotus* sp no meio BD 40% em condição estática.



6.3.3.5 Redução da concentração da atrazina nos experimentos com *Pleurotus* sp em meio de cultura BD 40% em condição estática

A média geral da concentração da ATZ do grupo CT, foi de $110,4 \text{ mg.L}^{-1}$, valor adotado como referência para comparar os demais resultados do grupo experimental (Tabela 4). Os resultados da quantificação da atrazina durante o período experimental estão apresentados na Tabela 12 e no gráfico da Figura 86, em que se nota uma redução gradativa da concentração do herbicida. No primeiro dia de inoculação (T0) o valor encontrado da ATZ foi $99,3 \text{ mg.L}^{-1}$, no final do período de cultivo, a concentração da atrazina foi de $12,6 \text{ mg.L}^{-1}$, correspondente a uma redução de 87,3% do valor total. O tempo de retenção da atrazina foi de

10,698 min, pela altura dos picos observa-se a redução da concentração do herbicida no final do vigésimo primeiro dia de cultivo (Figura 87).

Por adsorção houve uma redução de 19,9%, conforme resultados apresentados na Tabela A3 - Apêndice A, podendo-se inferir que o principal mecanismo de remoção do herbicida foi pela ação das enzimas, principalmente pela atividade da lacase.

Tabela 12 - Concentração de atrazina no experimento com o fungo *Pleurotus* sp no meio de cultura BD 40% em condição estática

Dias de cultivo	Frasco 11 ATZ (mg.L ⁻¹)	Frasco 12 ATZ (mg.L ⁻¹)	Média ATZ (mg.L ⁻¹)	% Remoção
0	98,7	99,9	99,3	
3	93,4	99,8	96,6	
6	56,2	63,6	59,9	
9	57,4	59,8	58,6	
12	46,1	49,1	47,6	
15	23,5	30,3	26,9	
18	19,8	27,8	23,8	
21	13,9	11,3	12,6	87,3

Legenda: Frasco 11: meio de cultura BD 40% + PLsp + ATZ 100; Frasco 12: meio de cultura BD 40% + PLsp + ATZ 100; ATZ: atrazina.

Figura 86 - Redução da concentração de atrazina por meio do fungo *Pleurotus* sp no meio BD 40% em condição estática.

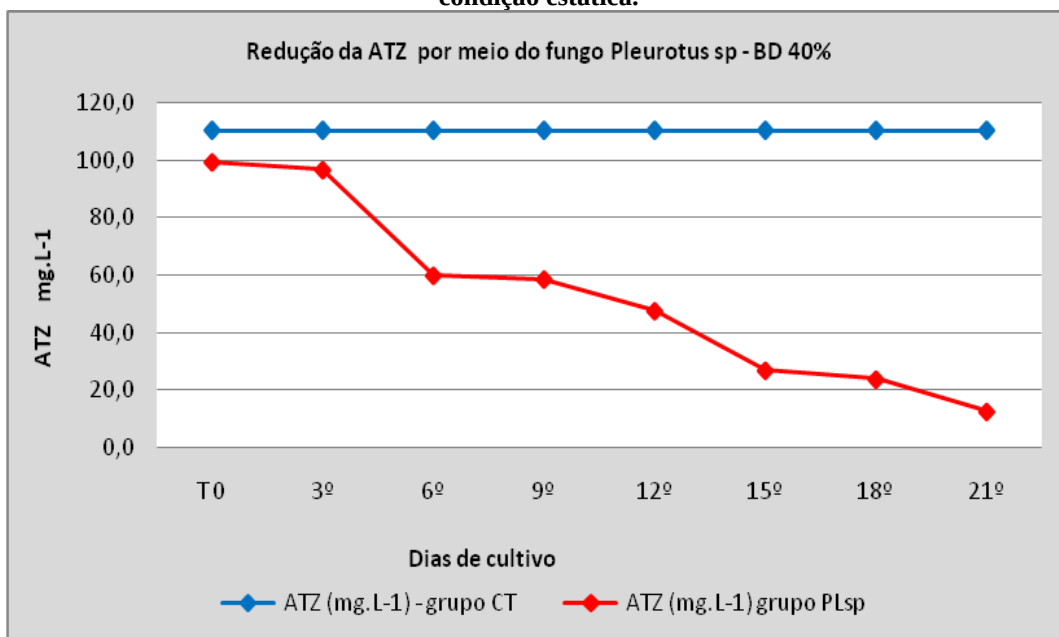
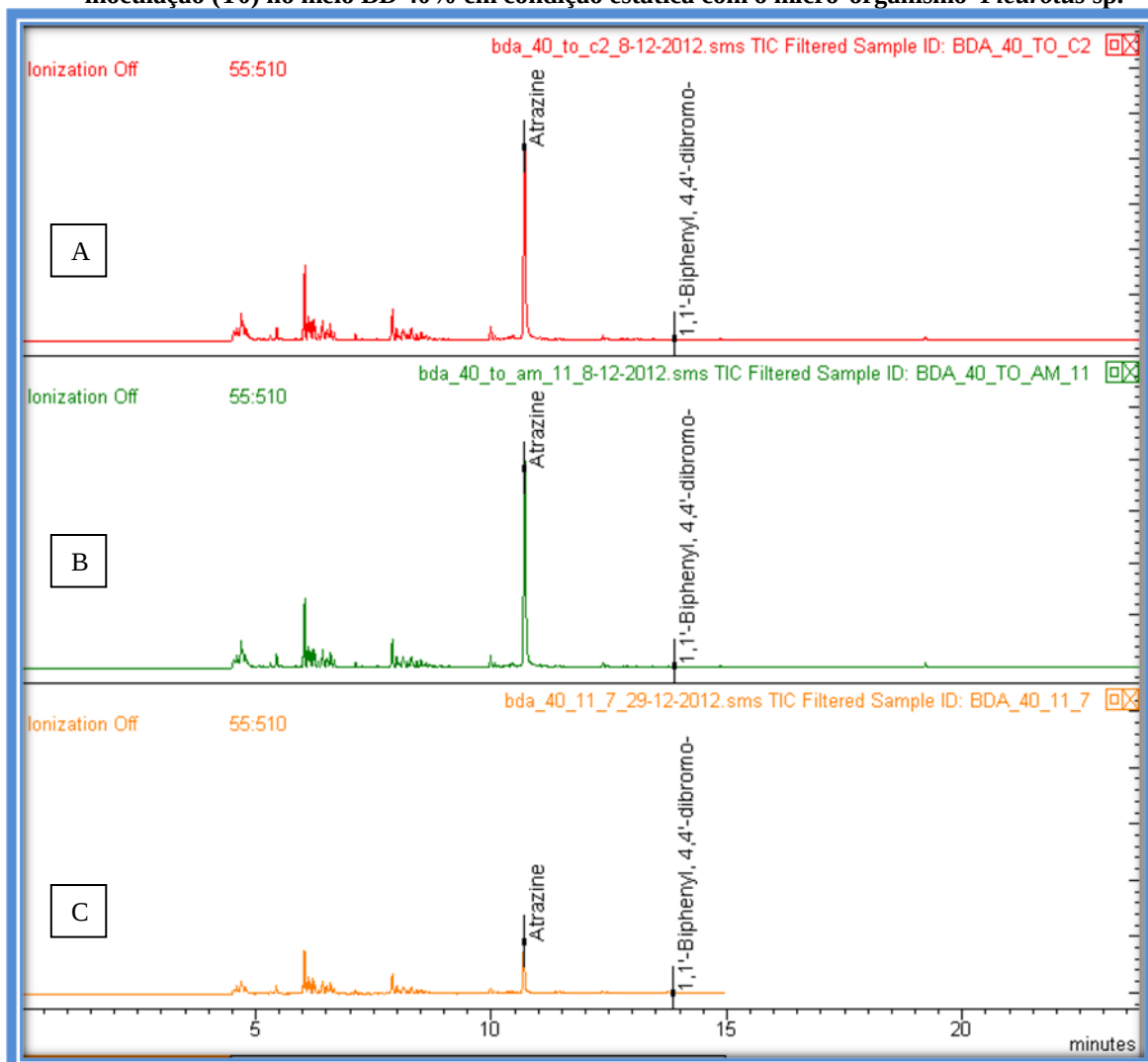


Figura 87 - Cromatograma da atrazina do grupo CTe grupo experimental no primeiro e último dia de inoculação (T0) no meio BD 40% em condição estática com o micro-organismo *Pleurotus* sp.



Legenda: A (Grupo controle de toxicidade no tempo T0); B (Meio de cultura+PLsp+ATZ no tempo T0); C (Meio de cultura+PLsp+ATZ após 21 dias de cultivo)

6.3.3.6 Atividade enzimática do *Pleurotus* sp em BD 40% sob agitação

A atividade enzimática do micro-organismo *Pleurotus* sp, no meio de cultura BD 40% sob agitação em misturador automático a 120 rpm apresentou bons resultados nos dois grupos (controle e experimental), com predomínio da enzima lacase, porém houve maior produção de enzimas ligninolíticas, no meio BD 40% em condição estática.

Os resultados do peso seco do micélio (g) do fungo *Pleurotus* sp foram maiores na condição sob agitação quando comparado com os resultados na condição estática, tanto no grupo controle como no grupo contendo atrazina, demonstrando que a formação da biomassa está inversamente proporcional à produção enzimática.

Os resultados das dosagens das enzimas do grupo-controle e do grupo experimental podem ser visualizados nas Figuras 88 e 89, respectivamente. Observa-se o predomínio da enzima lacase até o sexto dia de cultivo nos dois grupos.

Figura 88- Atividade enzimática do fungo *Pleurotus* sp no meio BD 40% sob agitação (grupo-controle).

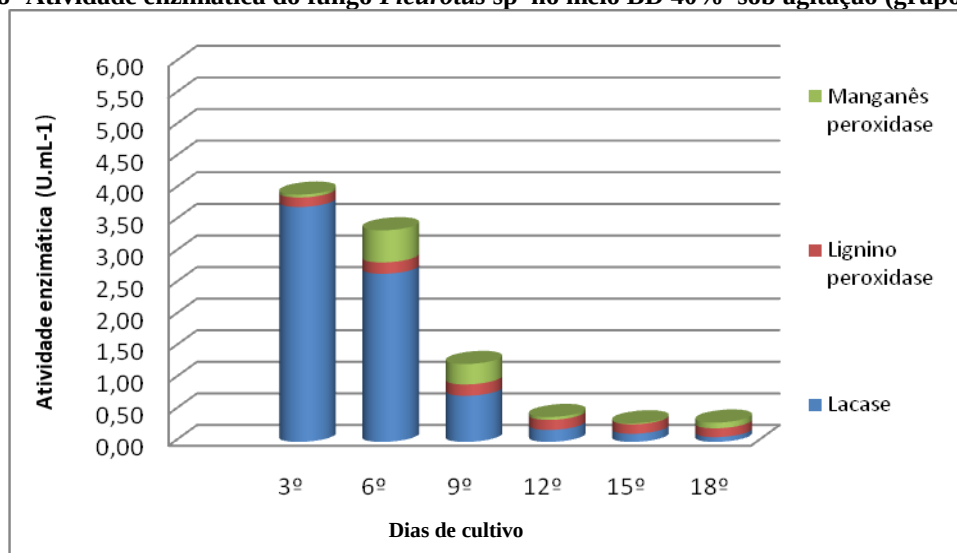
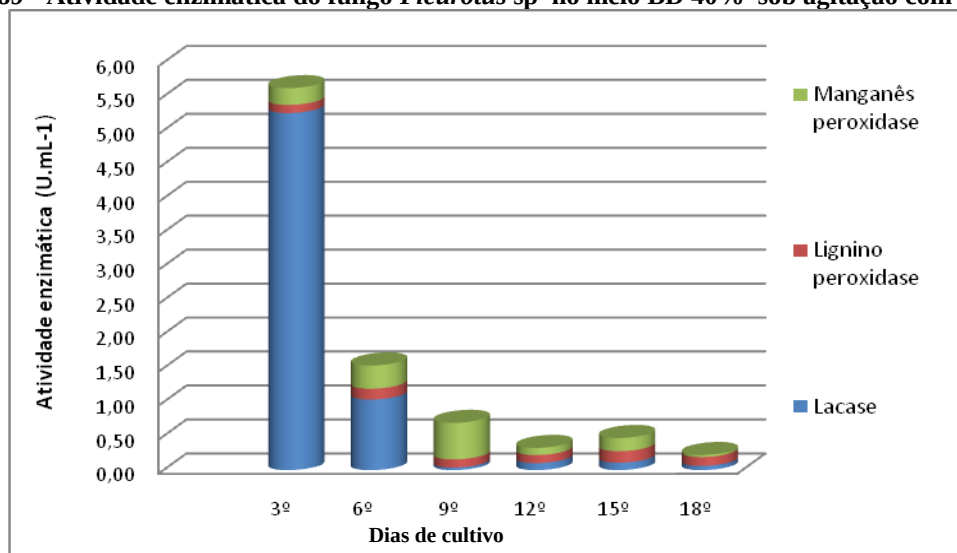


Figura 89 - Atividade enzimática do fungo *Pleurotus* sp no meio BD 40% sob agitação com ATZ 100.



A Figura 90 mostra o pico de lacase ($5,26 \text{ U.mL}^{-1}$) no grupo experimental no 3º dia de cultivo, sendo maior que no grupo-controle ($3,72 \text{ U.mL}^{-1}$), mostrando desta forma a capacidade do herbicida atrazina em induzir a produção de Lcc. A partir do 12º dia de cultivo, praticamente não houve a produção desta enzima, os valores foram abaixo de $0,12 \text{ U.mL}^{-1}$.

Os resultados da quantificação da enzima manganês peroxidase nos dois grupos (controle e experimental) estão apresentados na Figura 91. Nota-se que os valores foram

baixos, com picos de $\leq 0,54 \text{ U.mL}^{-1}$, com melhores resultados no 15º dia experimental no grupo contendo atrazina.

O gráfico da Figura 92 apresenta o perfil da produção da enzima LiP, onde se observa que o maior valor obtido foi ($0,18 \text{ U.mL}^{-1}$), verificado no grupo-controle e contendo atrazina no meio de cultivo, este valor por ser insignificante, considera-se a produção da lignina peroxidase como inexistente.

Durante o experimento, não houve variações significativas do pH, mas sim valores próximos entre si. No início (T0) foi verificado o pH 5,5 no meio de cultura dos dois grupos e a partir do 3º dia manteve-se o pH 5,0.

Figura 90 - Produção de Lacase pelo *Pleurotus* sp no meio BD 40% sob agitação.

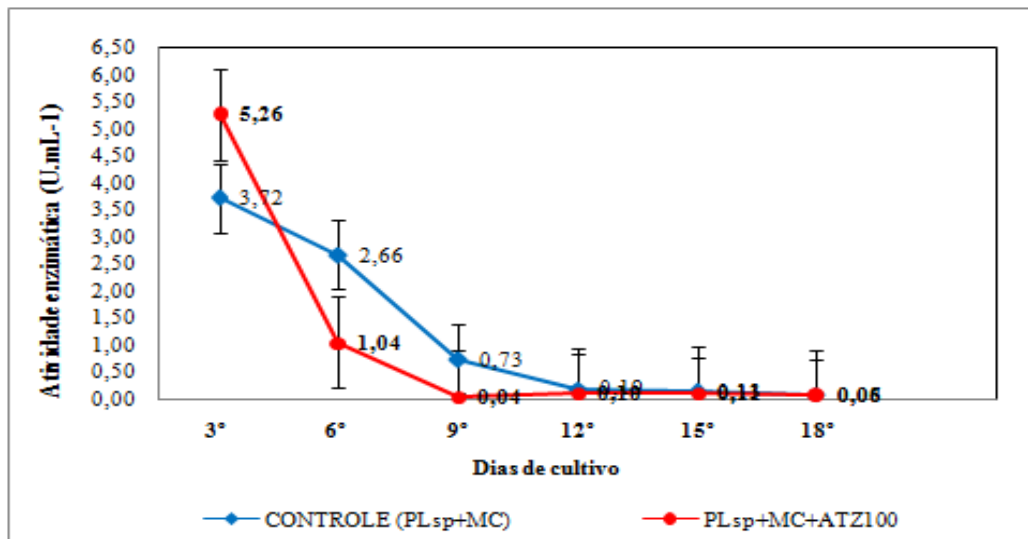


Figura 91 - Produção de Manganês peroxidase pelo *Pleurotus* sp no meio BD 40% sob agitação.

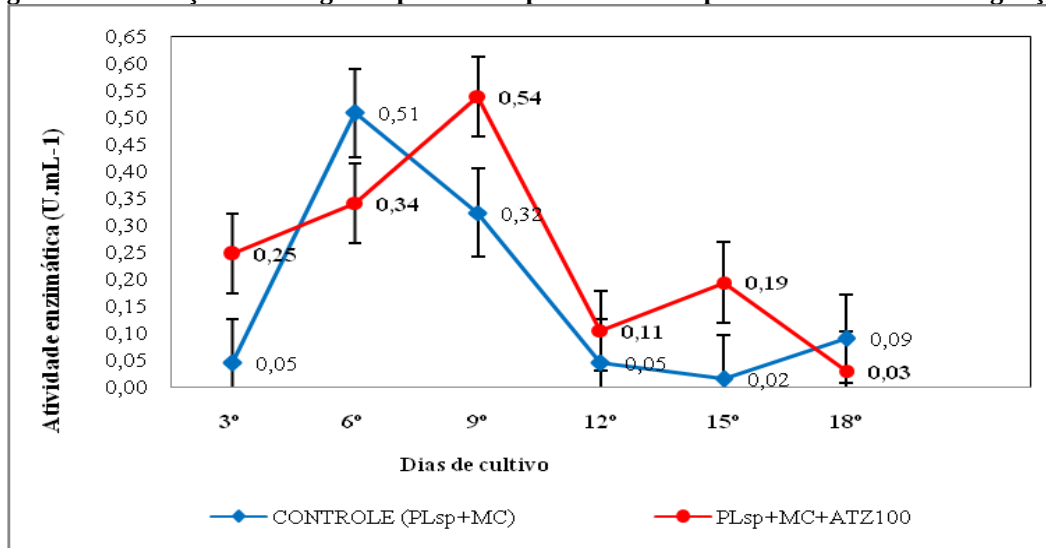
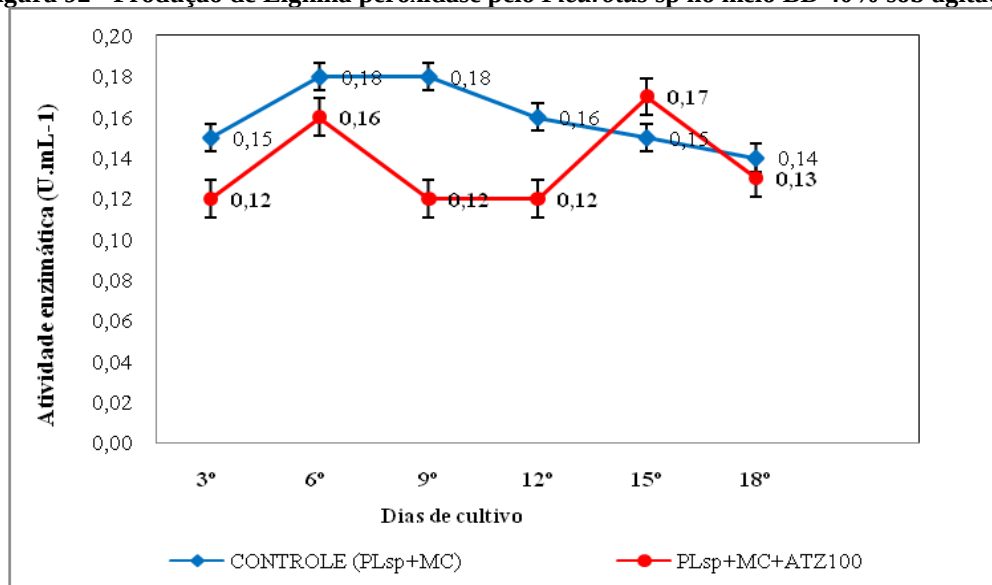


Figura 92 - Produção de Lignina peroxidase pelo *Pleurotus* sp no meio BD 40% sob agitação.



6.3.3.7 Redução da concentração da atrazina nos experimentos com *Pleurotus* sp em meio de cultura BD 40% sob agitação

A média da concentração do herbicida no grupo CT foi $107,4 \text{ mg.L}^{-1}$ (Tabela 6), este resultado foi utilizado para comparação com os demais valores encontrados durante o período de incubação.

A Tabela 13 e Figura 93 apresentam os resultados da quantificação da atrazina. Inicialmente a concentração de atrazina foi de $105,0 \text{ mg.L}^{-1}$. A redução da concentração do herbicida até o 12º dia de cultivo foi lento, apresentou um percentual de remoção de 21,61%. A partir deste período, houve uma queda maior, no final do experimento, a concentração da ATZ foi de $17,0 \text{ mg.L}^{-1}$, que corresponde a uma redução de 83,8% do valor total. O tempo de retenção da atrazina nas análises realizadas foram de 10,690 minutos (Figura 94).

Os resultados do teste de adsorção na bioamassa do fungo mostram uma redução de 43,8%, da quantidade do herbicida (Tabela A3 - Apêndice A).

Diante dos resultados apresentados, pode-se inferir que os dois mecanismo de remoção do herbicida foram importantes nesta condição avaliada, diferindo dos resultados obtidos nos estudos em BD 40% condição estática, em que o fator principal na remoção foi a atividade enzimática.

Tabela 13 - Concentração de atrazina no experimento com o fungo *Pleurotus* sp no meio de cultura Batata Dextrose 40% em condição agitação

Dias de cultivo	Frasco 11 ATZ (mg.L ⁻¹)	Frasco 12 ATZ (mg.L ⁻¹)	Média ATZ (mg.L ⁻¹)	% Remoção
0	108,0	102,0	105,0	
3	94,5	87,5	91,0	
6	81,5	85,7	83,6	
9	82,9	74,7	78,8	
12	79,8	84,8	82,3	
15	47,2	46,2	46,7	
18	15,5	18,5	17,0	83,8

Legenda: Frasco 11: meio de cultura BD 40% + PLsp + ATZ 100; Frasco 12: meio de cultura BD 40% + PLsp + ATZ 100; ATZ: atrazina

Figura 93 - Redução da concentração de atrazina por meio do fungo *Pleurotus* sp no meio BD 40% sob agitação.

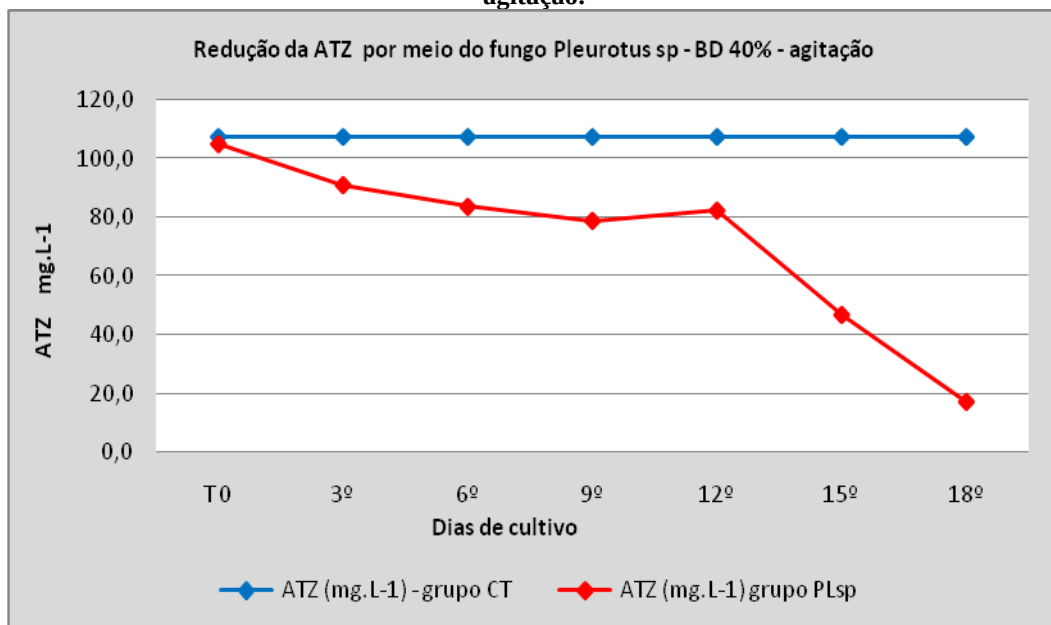
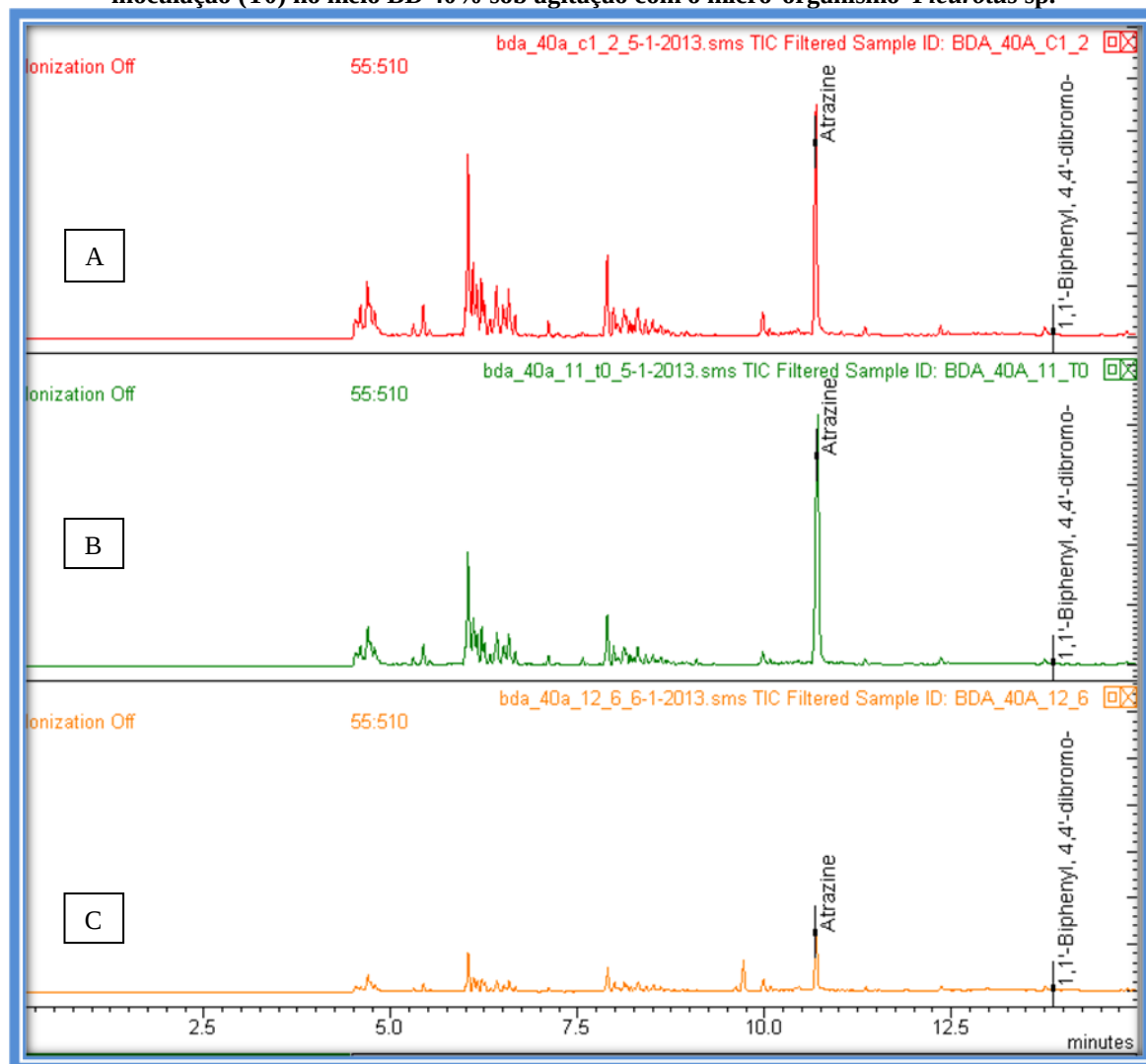


Figura 94 - Cromatograma da atrazina do grupo CTe grupo experimental no primeiro e último dia de inoculação (T0) no meio BD 40% sob agitação com o micro-organismo *Pleurotus* sp.



Legenda: A (Grupo controle de toxicidade no tempo T0); B (Meio de cultura+PLsp+ATZ no tempo T0); C (Meio de cultura+PLsp+ATZ após 21 dias de cultivo)

6.4 CORRELAÇÃO ENTRE AS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS NO EXPERIMENTO EM MEIO DE CULTURA LÍQUIDO COM E SEM AGITAÇÃO.

A Tabela 14 apresenta os resultados com os valores máximos obtidos durante os ensaios com os micro-organismos (*Pycnosporus sanguineus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus* sp) nos meios de cultura BD 0%, BD 40% na condição estática e BD 40% sob agitação, contendo atrazina 100 mg.L⁻¹ , referente à produção enzimática (lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase), peso seco da biomassa, percentual total de remoção da atrazina e percentual de remoção da atrazina pelo mecanismo de adsorção.

Tabela 14 - Valores máximos dos resultados obtidos nos experimentos em meio de cultura líquido com e sem agitação.

Resultados do fungo <i>Pycnosporus sanguineus</i>						
Meio de cultivo	Lcc (U.mL⁻¹)	LiP (U.mL⁻¹)	MnP (U.mL⁻¹)	Peso (g) biomassa	Remoção total ATZ (%)	Remoção ATZ por adsorção (%)
BD 0% (controle)	0,51	1,21	8,51	0,10	-----	-----
BD 0% + ATZ100	0,47	0,16	6,68	0,09	47,2	20,4
BD 40% (controle)	0,79	0,71	5,50	0,12	-----	-----
BD 40% + ATZ100	0,21	2,42	7,21	0,10	85,7	31,2
BD 40% (controle) - agitação	2,50	0,66	2,09	0,85	-----	-----
BD 40% + ATZ100 - agitação	0,50	0,69	0,11	1,10	72,1	40,4
Resultados do fungo <i>Pleurotus ostreatus</i>						
Meio de cultivo	Lcc (U.mL⁻¹)	LiP (U.mL⁻¹)	MnP (U.mL⁻¹)	Peso (g) biomassa	Remoção total ATZ (%)	Remoção ATZ por adsorção (%)
BD 0% (controle)	5,78	0,15	5,11	0,34	-----	-----
BD 0% + ATZ100	1,68	0,29	4,75	0,13	68,8	22,5
BD 40% (controle)	10,04	0,47	2,45	1,82	-----	-----
BD 40% + ATZ100	7,76	0,55	0,95	0,62	87,5	25,7
BD 40% (controle) - agitação	10,6	0,23	0,16	2,11	-----	-----
BD 40% + ATZ100 - agitação	8,2	0,22	0,87	1,37	84,8	49,0
Resultados do fungo <i>Pleurotus</i> sp						
Meio de cultivo	Lcc (U.mL⁻¹)	LiP (U.mL⁻¹)	MnP (U.mL⁻¹)	Peso (g) biomassa	Remoção total ATZ (%)	Remoção ATZ por adsorção (%)
BD 0% (controle)	1,07	0,29	12,02	0,40	-----	-----
BD 0% + ATZ100	0,73	0,28	5,56	0,18	53,8	48,8
BD 40% (controle)	3,95	0,26	5,92	1,73	-----	-----
BD 40% + ATZ100	6,17	0,29	0,66	1,12	87,3	19,9
BD 40% (controle) - agitação	3,72	0,18	0,51	2,06	-----	-----
BD 40% + ATZ100 - agitação	5,26	0,17	0,54	1,85	83,8	43,8

Foram comparadas as três linhagens cultivadas em meio líquido quanto à produção de lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase. Dentre os micro-organismos testados, as espécies *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus* sp, apresentaram os melhores resultados enzimáticos de lacase nas duas condições nutricionais (BD 0% e BD 40%) principalmente na condição estática. Os resultados obtidos por Ruiz et al. (2009) nos experimentos de biodegradação do herbicida atrazina 10 µg.L⁻¹, utilizando micro-organismos presentes nos efluentes de filtros de carvão com atividade biológica (CAB) realizado em uma instalação piloto de tratamento de água do tipo FIME, mostrou redução de 68% da concentração atrazina, por um período de 70 dias de estudo.

A maior atividade enzimática do fungo *Pycnosporus sanguineus* deu-se principalmente pela manganês peroxidase e lignina peroxidase, também na condição estática.

Na avaliação da produção de enzima em relação a biomassa formada, por meio da correlação de Pearson (Tabela 15), foi verificado uma correlação positiva para a enzima Lcc e negativa para MnP e LiP. Isto sugere que na produção da primeira enzima (Lcc) o crescimento da biomassa esteve associado com aumentos na produção de enzima, o mesmo não foi observado para a produção de manganês peroxidase e lignina peroxidase, o que demonstrou que o crescimento da biomassa não refletiu na produção destas enzimas.

Ao analisar as relações entre as enzimas verificou-se que quando havia maior produção de Lcc observava-se baixos teores na produção de MnP e LiP e vice-versa.

Tabela 15 - Matriz de correlação de Pearson entre a biomassa das espécies dos fungos selecionados para o estudo e a produção de enzimas, em negrito correlação significativa ($p < 0,05$).

	LCC	LIP	MNP	BIO
LCC	1.000			
LIP	-0.385	1.000		
MNP	-0.604	0.294	1.000	
BIO	0.681	-0.389	-0.665	1.000

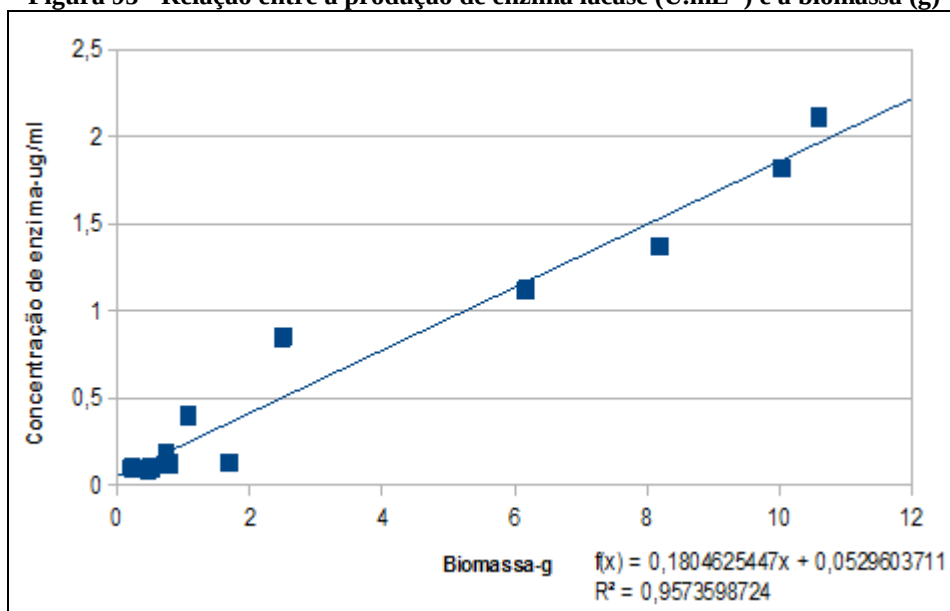
Onde: BIO - biomassa, Lcc, LiP e MnP- enzimas produzidas pelos espécimes deste estudo

Como o coeficiente de correlação de Pearson foi positivo e significativo entre a biomassa e a enzima Lcc (0,681) um modelo matemático foi elaborado a partir dos dados destes descritores do experimento, com a exclusão de sete pares de resultados para um melhor ajuste da linha de tendência. Assim 95,73% da variação na produção da enzima lacase é explicada pelo aumento na biomassa.

Conforme o modelo definido na Figura 95, a produção da enzima Lacase é aproximadamente cinco vezes a biomassa produzida.

$$LCC = 0,180BIO + 0,053$$

Figura 95 - Relação entre a produção de enzima lacase (U.mL^{-1}) e a biomassa (g)



Comparando o percentual de remoção total da atrazina, pela atividade enzimática e por adsorção, dos três micro-organismos, pelo teste T e F não houve diferença significativa entre as taxas de remoção da atrazina, conforme apresentado nas Tabelas 16 e 17 respectivamente.

Tabela 16 - Matriz das probabilidades (p) do teste T ($p < 0,05$ -significativo) entre os percentuais de remoção total e por adsorção de Atrazina.

	Ps	PLos	PLsp
Ps	1		
PLos	0,14	1	
PLsp	0,26	0,98	1

Onde: PS- *Pycnosporus sanguineus*; PLos- *Pleurotus ostreatus* e PLsp - *Pleurotus* sp.

Tabela 17 - Matriz das probabilidades (p) do teste F ($p < 0,05$ – significativo) entre os percentuais de remoção total e por adsorção de Atrazina.

	Ps	PLos	PLsp
Ps	1		
PLos	0,77	1	
PLsp	0,95	0,81	1

Onde: PS- *Pycnosporus sanguineus*; PLos- *Pleurotus ostreatus* e PLsp - *Pleurotus* sp.

Ao comparar as produções das enzimas das três espécies do experimento, por meio dos testes T e F (Tabela 18), foi verificado que os teores da enzima LiP, apresentou resultados significativos em relação as outras duas, diferenciando-se pela baixa produção registrada.

Tabela 18 - Matriz de probabilidade (p) teste T e F ($p < 0,05$ -significativo) entre a produção de enzimas. Em negrito relação significativa ($p < 0,05$). Onde: Lcc ,LiP e MnP- enzimas produzidas pelos espécimes deste estudo.

Teste F	Lcc	LiP	MnP
Lcc	1		
LiP	0,000	1	
MnP	0,943	0,000	1

Teste t	Lcc	LiP	MnP
Lcc	1		
LiP	0,001	1	
MnP	0,990	0,001	1

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos da parte experimental em meio de cultura sólido com os fungos: *Trametes villosa*, *Pycnosporus sanguineus*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus* sp., demonstraram que os micro-organismos foram tolerantes à presença da atrazina, indicando potencial para aplicação em remediação de ambientes contaminados com este herbicida.

Os fungos *Pycnosporus sanguineus*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus* sp foram capazes de reduzir em 47,2% a 87,5% a concentração de atrazina em meio líquido, pela atividade enzimática e pelo mecanismo de adsorção na biomassa.

Os melhores índices de remoção da atrazina foram obtidos nos experimentos com o meio de cultura contendo dextrose e caldo de batata (BD 40%) em condição estática, proporcionando em vantagem econômica por consumir menos energia e ser mais fácil quanto a aplicabilidade.

As espécies *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus* sp, apresentaram os melhores resultados enzimáticos de lacase, enquanto as enzimas predominantes nos experimentos com *Pycnosporus sanguineus* foram a manganês peroxidase e lignina peroxidase.

Os fungos *Trametes villosa*, *Pycnosporus sanguineus*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus* sp., sofreram influência na velocidade de crescimento na presença da atrazina 500 mg.L⁻¹ em todas as condições nutricionais avaliadas no meio de cultura sólido.

Observou-se que no meio de cultivo contendo apenas dextrose como fonte de carbono (BDA0%), a morfologia e o desenvolvimento micelial das 5 espécies avaliadas, não foram satisfatórios, independente da presença ou ausência da atrazina.

A biomassa produzida pelos fungos *Pycnosporus sanguineus*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus* sp, em meio de cultura líquido, foi menor na presença da atrazina 100 mg.L⁻¹ quando comparado ao grupo-controle, exceto no meio BD 40% sob agitação, o *Pycnosporus sanguineus* apresentou o peso (g) do micélio seco maior que o grupo-controle.

Comparando o percentual de remoção total da atrazina, pela atividade enzimática e por adsorção, dos três micro-organismos (*Pycnosporus sanguineus*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus* sp) pelo teste T e F não houve diferença significativa entre as taxas de remoção da atrazina.

Na avaliação da produção de enzima em relação a biomassa formada, foi verificado uma correlação positiva para a enzima Lcc e negativa para MnP e LiP, podendo inferir que produção da Lcc e o crescimento da biomassa esteve associado.

Os resultados sob agitação podem ter sido menores devido ao crescimento excessivo de biomassa que pode comprometer o transporte de nutrientes acarretando prejuízos à produção de enzimas catabólicas.

Os resultados mostram que os micro-organismos estudados utilizaram também o herbicida como fonte metabólica de alimento para o seu crescimento, o que promoveu a sua remoção gradativa.

Os índices de remoção da atrazina demonstraram que a pesquisa se tornou viável no estudo de degradação de ATZ por meio dos fungos de decomposição branca.

8 RECOMENDAÇÕES

As principais recomendações deste trabalho são:

- 1) Utilizar os fungos *Pycnosporus sanguineus*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus* sp, para a ativação biológica do leito de filtros no processo de filtração lenta e avaliar a remoção do herbicida atrazina durante o tratamento de água.
- 2) Fica evidente a necessidade de quantificar os produtos de degradação da atrazina formados durante a fase de crescimento dos fungos nos estudos no meio líquido.
- 3) Realizar testes de toxicidade para avaliar os metabólitos formados.

9 REFERÊNCIAS

ACUÑA, H.O.; FRANKENBERGER, J.; HAHN, L.; CARBAJO, C. **Drinking-Water Herbicide Exposure in Indiana and Prevalence of Small-for-Gestational-Age and Preterm Delivery**. Research Environmental Health Perspectives, vol. 117, nº 10, p. 1619-1624, October 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Monografias de Agrotóxicos**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/agrotóxicos_e_toxicologia/monografias_de_agrotóxicos/A14. Acesso em: 05 de abril de 2012.

AGUIAR, J.M.M.F. **Análise Enzimática de Fungos Lignocelulotíticos Cultivados em Vinhaça e Bagaço de Cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade de São Paulo- USP, 2008.

ALEXANDRINO, A.M.; FARIA, H.G.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. **Aproveitamento do Resíduo de Laranja para a Produção de Enzimas Lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr)**. Ciência Tecnologia Alimentos. Campinas, vol. 27, nº 2, p.364-368, 2007.

ANDRADE, J.A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I.C.S.F. **Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo e seus Derivados**. Eclética Química, vol. 35, nº3, 2010.

ANVISA.; UFPr. **Seminário de Mercado de Agrotóxico e Regulação**. ANVISA, Brasília, 11 abril de 2012.

ARANTES, V.; MILAGRES, A.M.F. **Relevance of Low Molecular Weight Compounds Produced by Fungi and involved in Wood Biodegradation**. Química Nova, vol. 32, nº6, São Paulo, 2009.

AUST, S.D. **Mechanisms of Degradation by White Rot Fungi**. Environmental Health Perspectives, p. 59-61, 1995.

BATALHA, E.B.H.L. **Água Potável: O Imperativo da Atualização**. CEPIS/OPS, p.1-10, 2009.

BORDJIBA, O.; STEIMAN, R.; KADRI, M.; SEMADI, A.; GUIRAUD, P. **Removal of Herbicides from Liquid Media by Fungi Isolated from a Contaminated Soil**. Journal of Environmental Quality, vol. 30, nº 2, p. 418-426, 2001.

BORTOLAZZO, N.G. **Isolamento e Seleção de Fungos Celulolíticos para Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Ciências- Área de concentração: Microbiologia Agrícola) – Universidade de São Paulo - USP, 2011.

BOUQUARD, C.; OUAZZANI, J.; PROMÉ, J.C.; BRIAND, I.M.; SIAT, P.P. **Dechlorination of Atrazine by a *Rhizobium* sp. Isolate**. American Society for Microbiology, vol. 63, nº 3, p. 862–866, 1997.

BRASIL. Decreto Lei Nº 76593, de 14 de novembro de 1975. **Diário Oficial da União** – Lex: coletânea de legislação: edição federal, Brasília, 1975.

BRASIL. Portaria Nº 10/SNVS de 08 de março de 1.985. **Diário Oficial da União** – Lex: coletânea de legislação: edição federal, Brasília, 1985.

BRASIL. Decreto-lei nº 7.802, de 11 julho de 1989. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 1989.

BRASIL, Decreto Lei Nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. **Diário Oficial da União** – Lex: coletânea de legislação: Edição federal, Brasília, 2002.

BRASIL, **Normas e Padrões de Potabilidade das Águas destinadas ao consumo humano. Normas Regulamentadoras Aprovadas pela Portaria nº 2.914** – Diário Oficial (da República Federativa do Brasil) Brasília, 2011.

CAMARGO,D.; BISPO,K.L.; SENE,L. **Associação de *Rhizobium* sp. a duas Leguminosas na Tolerância à Atrazina**. Rev. Ceres, Viçosa, vol. 58, nº4, p. 425-431, 2011.

CAMPOS, M.M.C. **Estudo da Remoção e Toxicidade dos Pesticidas Atrazina e Oxifluorfem pela Cianobactéria *Microcystis novacekii***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas, 2009.

CARNEIRO, F. F.; PIGNATI,W.; RIGOTTO,R.M.; AUGUSTO,L.G.S.; RIZOLLO, A.; MULLER,N.M.; ALEXANDRE, V.P.; FRIEDRICH,K.; MELLO,M.S.C.; **Dossiê ABRASCO –Um Alerta Sobre os Impactos dos Agrotóxicos na Saúde**. ABRASCO, 1ª Parte. P. 98, Rio de Janeiro, 2012.

CARVALHO,W.; CANILHA,L.; FERRAZ,A.; MILAGRES,A.M.F. **Uma Visão sobre a Estrutura, Composição e Biodegradação da Madeira**. Química Nova, Vol. 32, nº8, p. 2191-2195, 2009.

CEREJEIRA,M.J.; VIANA,P.; BATISTA,S.; PEREIRA,T.; SILVA,E.; VALÉRIO,M.J.; SILVA, A.; FERREIRA,M.; FERNADES,A.M.S. **Pesticides in Portuguese surface and ground Waters**, Water Research vol.37, p.1055-106, 2003.

COLLA,L.M.; PRIMAZ,A.L.; LIMA,M.; BERTOLIN,T.E.; COSTA,J.A.V. **Isolamento e Seleção de Fungos para Biorremediação a Partir de Solo Contaminado com Herbicidas Triazínicos**. Ciência Agrotécnica, Lavras, vol. 32, nº3, p. 809-813, 2008.

CONAB (2008), Companhia Nacional de Abastecimento. **Perfil do Setor do Açúcar e do Alcool no Brasil**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/perfil>, acesso em 27 de junho de 2011.

CONAB (2012), Companhia Nacional de Abastecimento. **Perfil do Setor do Açúcar e do Alcool no Brasil. 1º Levantamento de Cana-de Açúcar**. Abril 2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/perfil>, acesso em 10 de junho de 2012.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente (Brasil). **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, n. 53, Seção 1, p. 58-63, 18 mar. 2005.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente (Brasil). **Resolução nº 396, de 03 de abril de 2008**. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, n. 66-68, abril, 2008.

CORREIA,F.V; LANGENBACH,T. **Dinâmica da Distribuição e Degradação de Atrazina em Argiloso Vermelho-Amarelo sob Condições de Clima Tropical Úmido**.R.Bras.Ci.Solo,p.183-192,2006.

DIEZ,M.C.**Biological Aspects Involved in the Degradation of Organic Pollutants**. J.soil.sci.plan.nutr. vol.10,nº3, p.244-267. Chile, 2010.

FINOTTI,A.R.; FINKLER,R.; SILVA.M.D.A.; CEMIN,G. **Monitoramento de Recursos Hídricos em Áreas Urbanas**. Editora EDUCS,p.46, 2009.

FRANCO, A. C. N.; SOARES, M. M. S. R.; MELO, I. S. **Seleção de Linhagens Envolvidas na Biodegradação de Pesticidas**. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, vol. 29, p.124-127, 2003.

FREEMAN,L.E.B; RUSIECKI,J.A.; HOPPIN,J.A.; LUBIN,J.J.; KOUTROS,S.; ANDREOTTI,G.; ZAHM,S.H.; HINES,C.J.; COBLE,J.B.; ADESI,F.B.; SLOAN,J.; SANDLER,D.P.; BLAIR,A.; ALAVANJA,M.C.R. **Atrazine and Cancer Incidence Among Pesticide Applicators in the Agricultural Health Study (1994-2007)**. *Environmental Health Perspectives*, vol. 119, nº 9, p. 1253-1259, september 2011.

GALVÍN,R.M.; MONTOYA,M.R.; HIGUERA,M.J.; PÉREZ,R.; MELLADO,J.M.R. **Possibility of Reductive Deactivation of S-Triazines and Parent Compounds Waters and Sediments**. Springer Science, p. 347-364, 2005.

GAMA,F.A.; OLIVEIRA,A.H.B.; CAVALCANTE,R.M. **Inventário de Agrotóxicos e Risco de Contaminação Química dos Recursos Hídricos no Semiárido Cearense**. *Química Nova*, vol. 36, nº 3, p.462-467, 2013.

GARCIA,T.A. **Purificação e caracterização das lacases de *Pycnosporus sanguineus***. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) Departamento de Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília –DF. P. 35-40, 2006.

GIMENES,L.J.**Fungos Basidiomicetos**. Instituto de Botânica de São Paulo – IBt. São Paulo, 2010.

GIMENES, L.J. **Biodegradação de Pentaclorofenol por *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel: Análises Bioquímicas e Moleculares**. Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais, p.105, São Paulo, 2011.

GONZÁLEZ, V.G.; GOVANTES, F.; SHAW, L.J.; BURNS, R.G.; SANTERO, E. **Nitrogen Control of Atrazine Utilization in *Pseudomonas* sp. Strain ADP**. American Society for Microbiology, setembro 2003.

GUIMARÃES, M.S.O. **Coleta, Isolamento e Identificação de Fungos Presentes em Sistemas de Tratamento de Efluentes de Indústria Petroquímica para Utilização em Processos de Degradação de Hidrocarbonetos Aromáticos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, 2009.

HAYES, T.B.; COLLINS, A.; LEE, M.; MENDOZA, M.; NORIEGA, N.; STUART, A.A.; VONK, A. **Hermaphroditic, Demasculinized Frogs after Exposure to the Herbicide Atrazine at Low Ecologically Relevant Doses**. PNAS vol. 99, nº 8, p.5476 -5480, 2002.

HAYES, T.; KHOURY, V.; NARAYAN, A.; NAZIR, M.; PARK, A.; BROWN, T.; ADAME, L.; CHAN, E.; BUCHHOLZ, D.; STUEVE, T.; GALLIPEAU, S. **Atrazine Induces Complete Feminization and Chemical Castration in Male African Clawed Frogs (*Xenopus laevis*)**. PNAS vol. 107, nº10, p.4612-4617, 2010.

IBGE. Brasil, **Indicadores IBGE- Estatística da Produção Agrícola- Março de 2012**. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/> acessado em 09 junho 2012.

JARDIM, V.L. **Seleção de Fungos de Decomposição Branca Produtores de Enzimas Oxidativas na Presença de Acefato para Redução da sua Toxicidade**. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Meio Ambiente) –Universidade Federal de Goiás, 2010.

JAVARONI, R.C.A.; LANDGRAF, M.D.; REZENDE, M.O. **Comportamento dos Herbicidas Atrazina e Alaclor em Solo Preparado para o Cultivo de Cana-de-Açúcar**. Química Nova, p. 58-64, São Carlos, 1998.

KARIGAR, C.S.; RAO, S.S. **Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review**. Enzyme Research, Article ID805187, p.1-11, 2011.

KHOURI, A.G. **Análise de Resíduos de Atrazina e Simazina em Abacaxi no Estado de Goiás**. Dissertação apresentada no Mestrado em Ecologia e Produção Sustentável, na Universidade Católica de Goiás-UCG, 2007.

KODAMA, T.; DING, L.; YOSHIDA, M.; YAJIMA, M. **Biodegradation of an s-triazine herbicide, simazine**. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, (S.l.) vol.11, nº4/6 p.1073-1078, 2001.

LEVY, J.; CHESTERS, G.; GUSTAFSON, D.P.; READ, H.W. **Assessing Aquifer Susceptibility to and Severity of Atrazine Contamination at a Field Site in South-Central Wisconsin, USA**. Springer –Verlag, p.483-499, USA 1998.

- LIMA,L.L.; CUNHA,R.M.; NETO,A.S.; FREITAS,L.M.C.; PESSOA,K.A.R.; SILVA, G.M.M. **Avaliação da Degradação de Água Residuária Sintética Dopada de Atrazina, Deltametrina, Metil-Paration e Paraquat em Reatores em Batelada Sequencial com Biomassa Imobilizada de Aspergillus Niger AN400.** VII CONNEPI, ISBN 978-85-62830-10-5, 2012.
- LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida.** – Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, p.190, 2011.
- LOPES,F.M.; BATISTA,K.A.; BATISTA, G.L.A.; MITIDIERI,S.; BATAUS, L.A.M.; FERNANDES,K.F. **Biodegradation of Epoxyconazole and Piraclostrobin Fungicides by *Klebsiella sp* from Soil.** Springer Science, 2009.
- LÓPEZ, L.; POZO,C.; RODELAS,B.; CALVO,C.; JUAREZ,B.; TOLEDO, M.V.M.; LÓPEZ, J.G. **Identification of bacteria isolated from an oligotrophic lake with pesticide removal capacities.** Ecotoxicology 14, p. 299–312,2005.
- MACHADO,K.M.G.; COMPART,L.C.A.; MORAIS,R.O.; ROSA,L.H.; SANTOS,M.H. **Biodegradation of Reactive Textile dyes by Basidiomycetous Fungi from Brazilian Ecosystems.** Brazilian Journal of Microbiology, dezembro,2006.
- MANSUR,M.; ARIAS,M.E.; PATIÑO,J.L.C.; FLÂRDH,M.; GONZÁLEZ,A.E. **The White-rot fungus *Pleurotus ostreatus* Secretes Laccase Isozymes with Different Substrate Specificities.** Mycologia, p.1013-1020, 2003.
- MANTOVANI,T.R.D.A.; MEIRELLES,D.P.; VALLE,J.S.; LINDE,G.A.; COLAUTO,N.B. **Formulação de Substratos na Produção de Biomassa Micelial e de Lacase de *Pleurotus ostreatus*.** Ciências Agrárias, vol. 33, nº5, p.1681-1692, Londrina, 2012.
- MENEZES,C.W.G.; SANTOS,J.B.; ASSIS. J.S.L.; FONSECA, A.J.; FRANÇA, A.C.; SOARES, M.A.; FERNANDES, A.F. **Seletividade de atrazine e nicosulfuron a *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae).** *Planta daninha* [online]. vol.30, nº2, p. 327-334. ISSN 0100-8358, 2012.
- MENEZES,C.R.; SILVA,I.S.; DURRANT, L.R. **Bagaço de cana: Fonte para Produção de Enzimas Ligninacelulolíticas.** Estudos Tecnológicos – vol. 5, nº1, p.68-78, 2009.
- MESQUITA, A.C. **Uso das Técnicas de Oxidação Química e Biodegradação na Remoção de Alguns Compostos Orgânicos Recalcitrantes.** Tese - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.
- MINILLO,A.; ISIQUE,W.D.; PRADO,H.F.A.; TANGERINO,E.P. **Biodegradação de Fármacos na Água por Microrganismos Associados em Filtros Biológicos de Carvão.** SABESP Revista DAE 179, 2009.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, **Perfil Nacional da Gestão de Substâncias Químicas** / Brasília: MMA, p.280, 2003.

- MIRANDA,R.C.M.; GOMES, E.B.; GOUVEIA,E.T.; MACHADO,K.M.G.; GUSMAO,N.B. **Descolorization of Laundry Effluent by Filamentous Fungi**. African Journal of Biotechnology. Vol.11, nº18, p. 4216-4224, 2010.
- OLIVEIRA,R.S.; KOSKINEN,W.C; FERREIRA,F.A. **Sorption and leaching Potencial of Herbicides on Brazilian Soils**. Blackwell Science Ltd Weed Research, p.97-110, Agosto,2000.
- OLIVEIRA,S.D.; LEMOS,J.L.S.; BARROS, C.A.; LEITE,S.G.F. **Emprego de Fungos Filamentosos na Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo: Estado da Arte**. Série Tecnologia Ambiental –STA 45, CETEM/MCT,2008.
- PALMA,P.; ALVARENGA,P.; PALMA,V.L.; FERNANDES,R.M.; SOARES,A.M.V.M.; BARBOSA,I.R. **Assessment of Anthropogenic Sources of Water Pollution Using Multivariate Statistical Techniques: a Case Study of the Alqueva's Reservoir, Portugal**. Springer Science, p. 539-552, 2009.
- PEIXOTO,M.F.S.P.; LAVORENTI,A.; REGITANO,J.B.; TORNISIELO,V.L. **Degradação e formação de resíduos ligados de 14C-atrazina em Latossolo Vermelho Escuro e Glei Húmico**. Sci. agric. vol.57, nº1 Piracicaba, p.1-11, 2000.
- PEREIRA, P.M. **Avaliação do Potencial de Fungos na Degradação do Herbicida Atrazina**. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Intituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.
- PEREIRA,A.R.; FREITAS,D.A.F. **Uso de Microorganismos para Biorremediação de Ambientes Impactados**. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental,vol. nº6, p. 975-1006, 2012.
- PHILIPPI JR., A. **Saneamento, saúde e ambiente: fundamentos para um desenvolvimento sustentável**. São Paulo: Manole, p.118-125, 2005.
- PINHO,A.P.; MATOS,A.T.; COSTA,L.M.; MORRIS,L.A.; JACKSON,R.C.; WHITE,W.; MARTINEZ,M.A. **Retenção de Atrazina, Picloram e Caulinita em Zona Ripária Localizada em Área de Silvicultura**. Engenharia na Agricultura, Viçosa, p. 260-270, 2004.
- RANGEL,C.F.; ROSA,A.C.S.; SARCINELLI, P.N. **Uso de agrotóxicos e suas Implicações na exposição ocupacional e contaminação ambiental**. Cad. Saúde Colet., Rio de Janeiro, vo.19, nº4, p. 435-442, 2011.
- REZENDE,M.I.; BARBOSA,A.M.; VASCONCELOS,A.F.D.; HADDAD,R.; DEKKER, R.F.H. **Growth and Production of Laccase by the Ligninolytic Fungi, *Pleurotus ostreatus* and *Botryosphaeria rhodina*, Cultured on Basal Medium Containing Herbicides Scepter (Imazaquin)**. Journal Basic Microbiology, vol. 45, nº 6, p.465-474,2005.
- ROCHA,A.A. **Monitoramento de Agrotóxicos em Áreas Irrigadas por Pivô Central na Microbacia do Tijunheiro, Município de Morrinhos, Goiás**. Tese (Doutorado em Química na Agricultura e Meio Ambiente) Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

RODRIGUES, K.A. **Uso de Reatores Biológicos com Fungos para Remoção de Fenol de Água Residuária Sintética**. Tese: Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Carlos, 2006.

RUIZ, M.; PRADO, H.F.A.; ISIQUE, W.D.; MINILO, A. **Biodegradação do herbicida atrazina da água utilizando culturas de micro-organismos em condições de laboratório**. In: VI Congresso de Meio Ambiente da AUGM. A2-016, São Carlos, SP, 2009.

RUSIECKI, J.A.; ROOS, A.D.; LEE, W.J.; DOSEMECI, M.; LUBIN, J.H.; HOPPIN, J.A.; BLAIR, A.; ALAVANJA, M.C.R. **Cancer Incidence Among Pesticide Applicators Exposed to Atrazine in the Agricultural Health Study**. Journal of the National Cancer Institute, vol. 96, n° 18, p. 1375-1382, 2004.

SALVI, M.B. **Fungos basidiomicetos em biorremediação**. Instituto de Botânica de São Paulo – IBt. São Paulo, 2011.

SANEAGO. **Laudos de Resultados de Análise emitidos e validados eletronicamente pelo Laboratório de Análise de Água (arquivo eletrônico)**. Goiânia, 2012.

SILVA, T. M.; STETS, M.I.; MAZZETTO, A.M.; ANDRADE, F.D.; PILEGGI, S.A.V.; FÁVERO, P.R.; CANTÚ, M.D.; CARRILHO, E.; CARNEIRO, P.I.B.; PILEFFI, M. **Degradation of 2,4D by Microorganisms Isolated From Brazilian Contaminated Soil**. Brazilian Journal of Microbiology, vol.38, p.522-527, 2007.

SILVA, E.; BATISTA, S.; CAETANO, L.; CEREJEIRA, M.J.; CHAVES, M.; JACOBSEN, S.E. **Integrated Approach for the Quality Assessment of Freshwater Resources in a Vineyard Area (South Portugal)**. Springer Science, p. 331-341, 2010.

SILVA, C.B. **Redução do Acefato Utilizando Lacases Produzidas por *Trametes villosa* e *Pycnoporus sanguineus* com *Trichoderma* Isolados do Cerrado**. Dissertação apresentado no Mestrado da Escola de Engenharia Civil. Universidade Federal de Goiás, 2011

SILVA, E.; MENDES, M.P.; RIBEIRO, L.; CEREJEIRA, M.J. **Exposure Assesment of Pesticides in a Shallow Groundwater of the Tagus Vulnerable Zone (Portugal): a Multivariate Statistical Approach (JCA)**. Springer Science, 2012..

SWAN, S.H.; ROBIN, L.K.; FAN, L.; BARR, D.B.; DROBNIS, E.Z.; REDMON, J.B.; WANG, C.; BRAZIL, C.; OVERSTREET, J.W. **Semen Quality in Relation to Biomarkers of Pesticide Exposure**. Environmental Health Perspectives vol. 111, p. 1478-1484, 2003.

SZKLARZ, G.D.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E. **Production of Phenol Oxidases and Peroxidases by Wood-Rotting Fungi**. Mycologia, New York, p. 234-240, 1989.

TIEN, M.; KIRK, T.K. **Lignin-Degrading Enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, Characterization, and Catalytic Properties of a Unique H₂O₂- Requiring Oxygenase**. Biochemistry vol. 81, p. 2280-2284, 1994.

TUNDISI, J.G., TUNDISI, T.M. **Limnologia**. São Paulo: Oficina de Textos, p. 96-100, 2008.

UETA,J.; PEREIRA,N.L.; SHUHAMA,I.K.; CERDEIRA,A.L. **Biodegradação de Herbicidas e Biorremediação: Microrganismos Degradadores do Herbicida Atrazina.** Biotecnologia, Brasília, vol.10, p.10-13, 1999.

UNICA (2006), Portal Única, **União da Agroindústria Canavieira de São Paulo.** www.portalunica.com.br, acesso em 26 de junho de 2011.

VIKINESWARY,S.; NOORLIDAH,A.; RENUVATHANI,M.; SEKARAN,M.; PANDEY,A.; JONES,E.B.G. **Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnosporus sanguineus*.** Bioresource Technology, vol. 97, p.171-177, 2005.

WANG,Z.; ZHANG,Y.; HUOSHENG,G.; DONGFANG.M.; WANG.Y. **Microbial Remediation of Atrazine-contaminated Soil by *Rhizobium* sp DNS7 and *Acinetobacter* sp DNS32.** Advanced Materials Research, p. 1327-1330, 2012.

WU,M.; QUIRINDONGO,M.; SASS,J.; WETZLER,A. **Atrazine Continues to Contaminate Surface Water and Drinking Water in the United States.** NRDC The Earth's Best Defense, p. 1-32, 2010.

YAMANAKA,R.; SOARES,C.F.; MATHEUS,D.R.;MACHADO,K.M.G. **Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB176 under different culture conditions.** Brazilian Journal of Microbiology, vol. 39, p.78-84, 2008.

APÊNDICE A

No apêndice A estão contidas as Tabelas A1 a A3 referentes aos resultados obtidos dos testes de adsorção da atrazina nos experimentos realizados em meio de cultura líquido com os micro-organismos: *Pycnosporus sanguineus*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus* sp, em diferentes condições nutricionais (BDA 40% e BDA 0%) em condição estática e com agitação, na presença da atrazina 100 mg.L⁻¹.

Tabela A 1- Resultados do teste de adsorção do *Pycnosporus sanguineus* nos meios (BD 0% e BD 40%) na condição estática e agitação

Resultados de adsorção do <i>Pycnosporus sanguineus</i> nos meios (BD 0% e BD 40%) na condição estática e agitação								
Condição nutricional	FUNGO	ATZ início	média início	ATZ final	media final	inicial-final	media início - media final	% de remoção
BD 0%	PS 1	128	121,0	96,4	96,3	31,7	24,7	20,4
BD 0%	PS 2	114		96,3		17,7		
BD 40%	PS 1	119,3	110,7	77,1	76,2	42,2	34,5	31,2
BD 40%	PS 2	102,1		75,3		26,8		
BD 40% agitação	PS 1	122,8	120,1	77,9	71,6	45,0	48,5	40,4
BD 40% agitação	PS 2	117,4		65,3		52,1		

Tabela A 2 - Resultados do teste de adsorção do *Pleurotus ostreatus* nos meios (BD 0% e BD 40%) na condição estática e agitação

Resultados de adsorção do <i>Pleurotus ostreatus</i> nos meios (BD 0% e BD 40%) na condição estática e agitação								
Condição nutricional	FUNGO	ATZ início	média início	ATZ final	media final	inicial-final	media início - media final	% de remoção
BD 0%	PLOS 1	120,6	117,1	92,1	90,7	28,5	26,4	22,5
BD 0%	PL OS 2	113,5		89,3		24,2		
BD 40%	PLOS 1	105	109,0	76,3	81,0	28,7	28,1	25,7
BD 40%	PL OS 2	113		85,6		27,4		
BD 40% agitação	PLOS 1	102	100,9	54,0	51,5	48,0	49,4	49,0
BD 40% agitação	PL OS 2	99,8		49,0		50,8		

Tabela A 3 - Resultados do teste de adsorção do *Pleurotus* sp nos meios (BD 0% e BD 40%) na condição estática e agitação

Resultados de adsorção do <i>Pleurotus</i> sp nos meios (BD 0% e BD 40%) na condição estática e agitação								
Condição nutricional	FUNGO	ATZ início	média início	ATZ final	media final	inicial-final	media inicio - media final	% de remoção
BD 0%	PLsp 1	127,8	126,4	66,4	64,7	61,4	61,7	48,8
BD 0%	PL sp 2	125		63,0		62,0		
BD 40%	PLsp 1	117,9	110,4	93,8	88,4	24,1	22,0	19,9
BD 40%	PL sp 2	102,9		83,0		19,9		
BD 40% agitação	PLsp 1	116,2	120,0	65,9	67,4	50,3	52,6	43,8
BD 40% agitação	PL sp 2	123,7		68,9		54,8		



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor(a):		Keyle Borges e Silva Monteiro.					
CPF:	470.684.341-34	E-mail:	keylebsm@yahoo.com.br				
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não							
Vínculo Empregatício do autor		Saneamento de Goiás S/A					
Agência de fomento:		-----				Sigla:	----
País:	Brasil	UF:	GO	CNPJ:	-----		
Título:	Remoção do Herbicida Atrazina por Fungos de Decomposição Branca						
Palavras-chave:	Biorremediação, Atrazina, Enzimas Ligninolíticas.						
Título em outra língua:	Removal of herbicide atrazine through rot-white fungi.						
Palavras-chave em outra língua:	Bioremediation, Atrazine, Ligninolytic enzymes.						
Área de concentração:	Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental						
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	12/08/13						
Programa de Pós-Graduação:	Programa de Pós-Graduação <i>Stricto Sensu</i> em Engenharia do Meio Ambiente da Universidade Federal de Goiás						
Orientador(a):	Mariângela Fontes Santiago						
CPF:	599.910.466-15	E-mail:	mariangelafs@gmail.com				
Co-orientador(a):	-----						
CPF:	-----	E-mail:	-----				

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ ☒ total ☐ parcial

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: ____ / ____ / ____

Assinatura do(a) autor(a)

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e meta dados ficarão sempre disponibilizados.