



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO**



PPGAA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA
CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES DE BALSAS – CESBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE – PPGAA

NARA PRISCILA BARBOSA BRAVIM

BIODEGRADAÇÃO DOS HERBICIDAS ATRAZINA, GLIFOSATO E
PENDIMETALINA EMPREGANDO CONSÓRCIO FÚNGICO

Balsas

2019

NARA PRISCILA BARBOSA BRAVIM

**BIODEGRADAÇÃO DOS HERBICIDAS ATRAZINA, GLIFOSATO E
PENDIMETALINA EMPREGANDO CONSÓRCIO FÚNGICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente – PPGAA/CESBA/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agricultura e Ambiente.

Orientadora: Dr.^a Anatórcia Ferreira Alves

Balsas

2019

Bravim, Nara Priscila Barbosa.

Biodegradação dos herbicidas atrazina, glisofato e pendimetalina empregando consórcio fúngico / Nara Priscila Barbosa Bravim. – São Luís, 2019.

72 f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Agricultura e Ambiente, Universidade Estadual do Maranhão, 2019.

Orientador: Profa. Anatórcia Ferreira Alves.

1.Biorremediação. 2.Fungos. 3.Solos agrícolas. 4.Agrotóxicos. I.Título

CDU: 632.954

NARA PRISCILA BARBOSA BRAVIM

**BIODEGRADAÇÃO DOS HERBICIDAS ATRAZINA, GLIFOSATO E
PENDIMETALINA EMPREGANDO CONSÓRCIO FÚNGICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente – PPGAA/CESBA/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agricultura e Ambiente.

Orientadora: Dr.^a Anatórcia Ferreira Alves

Aprovada em 20/03/2019

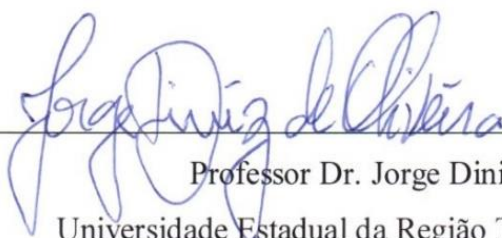
BANCA EXAMINADORA



Professora Dr.^a Anatórcia Ferreira Alves (Orientadora)
Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão



Professor Dr. José Fábio França Orlanda (Coorientador)
Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão



Professor Dr. Jorge Diniz de Oliveira
Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida, pela oportunidade concedida de estar na pós-graduação e por ter colocado pessoas especiais ao meu lado durante o curso. Obrigada por me permitir errar, aprender e crescer.

Aos meus pais, Manoel e Izeide; a meu irmão Raphael; a meu esposo Aslak Bitar e em especial a minha irmã Patrícia, meu infinito agradecimento por sempre acreditarem na minha capacidade e me incentivarem.

Aos meus orientadores, professora Dr.^a Anatércia Ferreira Alves e professor Dr. José Fábio França Orlanda, pelos ensinamentos concedidos, pela paciência e por acreditarem no meu projeto. Sem vocês esse trabalho não seria possível. Ao professor Dr. Murilo Bastos por me orientar na parte estatística e aos professores do Programa de Pós-graduação em Agricultura e Ambiente, muito obrigada pela transmissão dos conhecimentos que tornou essa dissertação possível.

Aos amigos de pós-graduação Márcia, Régia e Gustavo, compartilhamos muitos momentos bons e ruins, sempre serei grata pela amizade e apoio. Aos meus amigos do Laboratório de Biotecnologia Ambiental da Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão, muito obrigada pelo apoio e ajuda que vocês me deram, com certeza o trabalho árduo foi bem mais divertido e leve ao lado de vocês.

A Micoteca URM do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pernambuco pela identificação dos fungos. Aos laboratórios de Biotecnologia Ambiental, Melhoramento Genético e Biotecnologia Vegetal, Química Ambiental, Limnologia, Análises Clínicas, Entomologia Agrícola e Microbiologia da Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão e a Unidade de preparação e caracterização de materiais e combustíveis da Universidade Federal do Maranhão pelo empréstimo de reagentes, materiais e equipamentos.

Agradeço, também, à CAPES e a FAPEMA pelo apoio financeiro.

Ninguém vence sozinho. Obrigada a todos!

RESUMO

Os herbicidas podem prejudicar os componentes da biota do agroecossistema, contaminar o meio ambiente e tornar o solo degradado e improdutivo, logo a descontaminação se faz necessária. A biorremediação é um processo que utiliza organismo vivos para degradar, reduzir ou remover contaminantes de uma matriz ambiental, como o solo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a biorremediação de solos contaminados com atrazina, glifosato e pendimetalina por consórcios fúngicos isolados de solos agrícolas, nos processos de biorremediação em microcosmos. Fungos filamentosos foram isolados de solos agrícolas e cultivados em meio de cultura KATAYAMA contaminado com 0, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos herbicidas por 14 dias. Os fungos que mostraram-se resistentes foram plaqueados em meio de cultura sabouraud dextrose 4% contaminado com 0, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos herbicidas e incubadas por sete dias a 28°C para análise do crescimento micelial. A atividade de biodegradação dos fungos resistentes foi avaliada em microcosmos, isoladamente e em consórcio, através da respiração microbiana (mg de CO₂). Os microcosmos consistiram em potes fechados contendo solo, 0 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos herbicidas e fungos resistentes. Em seguida, raízes de *Allium cepa* foram expostas, por 24 horas, aos elutriados dos solos tratados nos microcosmos. As raízes foram coletadas e analisadas para determinação da mutagenicidade no ciclo celular, desta forma os resíduos dos herbicidas, após o processo de biodegradação, foram detectados. Os resultados do experimento foram submetidos à Anova, teste de Tukey e teste de Fischer com $p < 0,05\%$ para comparação de médias. Os fungos *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium citrinum* mostram-se resistentes e aptos à degradação dos herbicidas estudados. *Fusarium verticillioides* apresenta maior média de crescimento micelial em meio de cultura contaminado com atrazina, nas concentrações 10 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e glifosato, na concentração 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em meio de cultura contaminado com pendimetalina *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus fumigatus* apresentam as maiores médias de crescimento micelial na concentração 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Nos experimentos em microcosmos, os consórcios *Fusarium verticillioides* - *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium verticillioides* - *Penicillium citrinum* e *Aspergillus fumigatus* - *Penicillium citrinum* apresentam capacidade de metabolizar o herbicida atrazina, contudo *Aspergillus fumigatus* - *Penicillium citrinum* mostra maior eficiência. Nos microcosmos contaminados com glifosato e pendimetalina, *Aspergillus fumigatus* - *Penicillium citrinum* apresenta inibição de crescimento. No teste de genotoxicidade, observa-se atraso no índice mitótico das células de *Allium cepa* expostas ao elutriado de solo contaminado com atrazina e pendimetalina na concentração 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, após o experimento em microcosmos. As células expostas ao elutriado de solo contaminado com glifosato na concentração 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e tratado com o consórcio *Aspergillus fumigatus* - *Penicillium citrinum* não apresentam atraso no índice mitótico. Foram encontradas apenas divisão celular desorganizada na fase metáfase das células expostas aos elutriados de solo na concentração 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos três herbicidas. As alterações ocorridas foram consideradas baixas, indicando que há degradação de parte dos herbicidas.

Palavras-chave: Biorremediação. Fungos. Solos Agrícolas. Agrotóxicos.

ABSTRACT

The herbicides can harm the components of the agroecosystems biota, contaminate the environment and render the soil degraded and unproductive, so decontamination is necessary. Bioremediation is a process that uses living organisms to degrade, reduce or remove contaminants from an environmental matrix, such as soil. The objective of this work was to evaluate the bioremediation of soils contaminated with atrazine, glyphosate and pendimethalin by fungal consortia isolated from agricultural soils in bioremediation processes in microcosms. Filamentous fungi were isolated from agricultural soils and cultured in KATAYAMA culture medium contaminated with 0, 10, 20, 50 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of the herbicides for 14 days. The resistant fungi were inoculated in a 4% sabouraud dextrose culture medium contaminated with 0, 10, 20, 50 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of the herbicides and incubated for seven days at 28°C for analysis of mycelial growth. The activity of biodegradation of resistant fungi was evaluated in microcosms, alone and in consortium, through microbial respiration (mg of CO_2). The microcosms consisted of closed pots containing soil, 0 and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of herbicides and resistant fungi. Then, *Allium cepa* roots were exposed for 24 hours to the elutriates of the treated soils in the microcosms. The roots were collected and analyzed for mutagenicity in the cell cycle, in this way the residues of the herbicides, after the biodegradation, process were detected. The results of the experiment were submitted to Anova, Tukey test and Fischer test with $p < 0.05\%$ for means comparison. The fungi *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium verticillioides* and *Penicillium citrinum* are shown resistant and capable of degradation of the studied herbicides. *Fusarium verticillioides* presented a higher mean of mycelial growth in culture medium contaminated with atrazine, in the concentrations 10 and 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and glyphosate in the concentration 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. In culture medium contaminated with pendimethalin *Fusarium verticillioides* and *Aspergillus fumigatus* present the highest averages of mycelial growth in the concentration 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. In the microcosm experiments, the consortia *Fusarium verticillioides* - *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium verticillioides* - *Penicillium citrinum* and *Aspergillus fumigatus* - *Penicillium citrinum* are shown able to metabolize the herbicide atrazine. However, *Aspergillus fumigatus* - *Penicillium citrinum* show higher efficiency. In the microcosms contaminated with glyphosate and pendimethalin, *Aspergillus fumigatus* - *Penicillium citrinum* shows inhibition of growth. In the genotoxicity test was observed delay in mitotic index of *Allium cepa* cells exposed to soil elutriate contaminated with atrazine and pendimethalin at 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentration after the microcosm experiment. The cells exposed to soil elutriate contaminated with glyphosate at a concentration of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and treated with the consortium *Aspergillus fumigatus* - *Penicillium citrinum* show no delay in the mitotic index. Were found only disorganized cell division in the metaphase phase of the cells exposed to the soil elutriates at the concentration 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of the three herbicides. The alteration occurred were considered low, indicating that there is degradation of part of the herbicides.

Keywords: Bioremediation. Fungi. Agricultural soils. Pesticides

LISTA DE SIGLAS

Af-Pc – *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium citrinum*

AMPA – Ácido aminometilfosfônico

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Fv-Af – *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus fumigatus*

Fv-Pc – *Fusarium verticillioides* e *Penicillium citrinum*

DEA – Desetilatrazina

DIA – Desisopropilatrazina

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis

IM – Índice mitótico

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MCM – Média de crescimento micelial

OAC – Ocorrência de alteração celular

OMS – Organização Mundial de Saúde

pH – Potencial hidrogeniônico

TCR – Taxa de crescimento relativo

TIM – Taxa de inibição máxima

UV – Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estrutura química da atrazina..... | 19 |
| Figura 2. Estrutura química do glifosato..... | 20 |
| Figura 3. Estrutura química da pendimetalina..... | 21 |
| Figura 4. Reações de Fase I e Fase II do metabolismo de xenobióticos por fungos..... | 27 |
| Figura 5. Imperatriz – Maranhão..... | 30 |
| Figura 6. Esquema de amostragem para fungos do solo..... | 31 |
| Figura 7. Características culturais e morfológicas dos fungos identificados..... | 39 |
| Figura 8. Médias de crescimento micelial em meio de cultura contaminado com atrazina..... | 42 |
| Figura 9. Médias de crescimento micelial nas concentrações 0, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de atrazina..... | 43 |
| Figura 10. Médias de crescimento micelial em meio de cultura contaminado com glifosato..... | 44 |
| Figura 11. Médias de crescimento micelial nas concentrações 0, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de glifosato..... | 45 |
| Figura 12. Médias de crescimento micelial em meio de cultura contaminado com pendimetalina..... | 46 |
| Figura 13. Médias de crescimento micelial nas concentrações 0, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de pendimetalina..... | 47 |
| Figura 14. TCR (%) dos fungos em meio de cultura contaminado com atrazina, glifosato e pendimetalina nas concentrações 0, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, após 3 dias de incubação..... | 48 |
| Figura 15. TIM (%) dos fungos em meio de cultura contaminado com atrazina, glifosato e pendimetalina nas concentrações 0, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, após 1 dia de incubação..... | 49 |
| Figura 16. Concentração de CO_2 evoluído pelos fungos em microcosmo com solo contaminado com 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de atrazina, glifosato e pendimetalina após 5, 10 e 15 dias..... | 51 |
| Figura 17. Concentração de CO_2 evoluído pelos consórcios fúngicos em microcosmo com solo contaminado com 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com atrazina, glifosato e pendimetalina após 5, 10 e 15 dias..... | 52 |

| | |
|---|----|
| Figura 18. Divisões e alterações celulares em raízes de <i>Allium cepa</i> tratadas com elutriatos dos herbicidas atrazina, glifosato e pendimetalina..... | 55 |
| Figura 19. Médias do índice mitótico (%) das células expostas ao elutriato de solo contaminado com atrazina nas concentrações 0 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, após 24 horas..... | 56 |
| Figura 20. Médias do índice mitótico (%) das células expostas ao elutriato de solo contaminado com glifosato e pendimetalina nas concentrações 0 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, após 24 horas..... | 57 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Classificação toxicológica dos agrotóxicos..... | 15 |
| Tabela 2. Classificação do potencial de periculosidade ambiental..... | 16 |
| Tabela 3. Classificação dos agrotóxicos quanto à persistência..... | 16 |
| Tabela 4. Técnicas de remediação de solos..... | 23 |
| Tabela 5. Resultados das análises químicas das amostras de solos (0 – 20 cm de profundidade)..... | 37 |
| Tabela 6. Crescimento dos fungos isolados em meio de cultura contaminado com 0, 10, 20, 50 e 100 µg mL ⁻¹ de atrazina, glifosato e pendimetalina..... | 38 |
| Tabela 7. Fungos identificados e incorporados ao acervo da Coleção de Culturas – Micoteca URM do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco..... | 39 |
| Tabela 8. Desdobramento dos fungos dentro de cada nível de concentrações de atrazina..... | 43 |
| Tabela 9. Desdobramento das concentrações de atrazina dentro de cada nível de fungos..... | 44 |
| Tabela 10. Desdobramento dos fungos dentro de cada nível de concentrações de glifosato..... | 45 |
| Tabela 11. Desdobramento das concentrações de glifosato dentro de cada nível de fungos..... | 46 |
| Tabela 12. Desdobramento dos fungos dentro de cada nível de concentrações de pendimetalina..... | 47 |
| Tabela 13. Desdobramento das concentrações de pendimetalina dentro de cada nível de fungos..... | 48 |
| Tabela 14. Células de <i>Allium cepa</i> expostas ao elutriato de solo contaminado com atrazina..... | 55 |
| Tabela 15. Células de <i>Allium cepa</i> expostas ao elutriato de solo contaminado com glifosato..... | 56 |
| Tabela 16. Células de <i>Allium cepa</i> expostas ao elutriato de solo contaminado com pendimetalina..... | 56 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 2 OBJETIVOS..... | 14 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 14 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 14 |
| 3 REFERENCIAL TEÓRICO..... | 15 |
| 3.1 Agrotóxicos..... | 15 |
| 3.2 Atrazina..... | 19 |
| 3.3 Glifosato..... | 20 |
| 3.4 Pendimetalina..... | 21 |
| 3.5 Técnicas de remediação para solo contaminado..... | 22 |
| 3.6 Biorremediação de contaminantes..... | 23 |
| 3.7 Biorremediação por microrganismos..... | 26 |
| 3.7.1 Fungos filamentosos como biorremediadores..... | 28 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 30 |
| 4.1 Coleta de solo para isolamento de fungos e análises físico-químicas..... | 30 |
| 4.2 Isolamento de fungos filamentosos..... | 31 |
| 4.3 Seleção fungos para degradar atrazina, glifosato e pendimetalina..... | 31 |
| 4.4 Crescimento micelial em meio de cultura contaminado com atrazina, glifosato e pendimetalina..... | 32 |
| 4.5 Produção da suspensão de esporos..... | 33 |
| 4.6 Estudo da degradação de atrazina, glifosato e pendimetalina em microcosmos..... | 33 |
| 4.7 Teste dos resíduos de degradação..... | 35 |
| 4.8 Análises estatísticas..... | 36 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 37 |
| 5.1 Análises das amostras de solo..... | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 5.2 Isolamento, seleção e identificação dos fungos..... | 38 |
| 5.3 Aplicações do crescimento micelial fúngico em processos biotecnológicos em meio de cultura contaminado com atrazina, glifosato e pendimetalina..... | 42 |
| 5.3.1 Crescimento relativo..... | 48 |
| 5.3.2 Inibição máxima..... | 49 |
| 5.4 Avaliação da atividade de degradação em microcosmos..... | 50 |
| 5.5 Avaliação do teste de genotoxicidade com <i>Allium cepa</i> | 55 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 60 |
| REFERÊNCIAS..... | 61 |

1 INTRODUÇÃO

Os herbicidas são os agrotóxicos com maior quantidade de aplicação nos sistemas de produção vegetal, anualmente são usados no mundo aproximadamente 2,5 milhões de toneladas de agrotóxicos, já no Brasil, o consumo anual tem sido superior a 300 mil toneladas (SPADOTTO e GOMES, 2019). O alto consumo se baseia nas melhorias que esses produtos apresentam, como a diminuição de doenças, pragas e plantas invasoras, além de aumentar a eficiência econômica no processo produtivo.

Apesar dos benefícios, esses produtos têm o solo como alvo final, podendo causar impactos negativos como intoxicação aos cultivos em sucessão; degradação da matéria orgânica; eutrofização de águas superficiais e subterrâneas; perda de funções essenciais como, ciclagem de nutrientes e poder tampão ambiental. Além da redução da microbiota e da biodiversidade (MORENO-MATEOS *et al.*, 2015).

Para restaurar solos que se tornaram poluídos e improdutivos por adição de substâncias tóxicas, é necessário a remoção do contaminante da área. O procedimento para remediação de áreas contaminadas é lento e está relacionado à capacidade de restabelecimento do solo a um nível que permita o desenvolvimento de espécies vegetais e da atividade microbiana (MENDES FILHO *et al.*, 2010).

Dentre as tecnologias disponíveis para combater esse problema e acelerar a descontaminação de solos, destaca-se a biorremediação, que consiste na utilização de agentes biológicos, como plantas, bactérias, algas e fungos, que possuem a capacidade de modificar ou decompor poluentes em substâncias inertes como CO₂ e H₂O, proporcionando a integração dessas moléculas nos ciclos biogeoquímicos, e conseqüentemente a descontaminação (JACQUES *et al.*, 2010).

Essa biotecnologia, apresenta menor custo e maior eficiência na remoção dos contaminantes do que as técnicas físicas e químicas, sendo atualmente utilizada em escala comercial no tratamento de diversos resíduos e na remediação de áreas degradadas (BAMFORTH e SINGLETON, 2005).

Acelerar a degradação dos herbicidas, torna o solo apto a receber culturas subsequentes em menos tempo, além de descontaminá-lo, otimizando a capacidade de um sistema agrícola produzir alimentos e fibras de forma mais sustentável, alinhando o aumento da produtividade ao longo dos anos com enfoque preservacionista (PROCÓPIO *et al.*, 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a biorremediação de solos contaminados com atrazina, glifosato e pendimetalina por consórcios fúngicos isolados de solos agrícolas, nos processos de biodegradação em microcosmos.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar fungos de solos contaminados por herbicidas;
- Avaliar o crescimento fúngico em meio de cultura contaminado com os herbicidas atrazina, glifosato e pendimetalina;
- Estudar a biodegradação dos herbicidas atrazina, glifosato e pendimetalina por consórcios fúngicos em microcosmos; e
- Realizar a avaliação genotoxicológica dos resíduos de biodegradação em raízes de *Allium cepa*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Agrotóxicos

A Organização Mundial da Saúde (OMS) caracteriza agrotóxicos como compostos químicos utilizados para eliminar pragas, incluindo insetos, roedores, fungos e ervas daninhas. (WHO, 2018). Após a Segunda Guerra Mundial, esses compostos químicos foram incluídos no pacote tecnológico da Revolução Verde, com o objetivo de expandir a produção agrícola e diminuir a fome (VIERO *et al.*, 2016).

No Brasil, os agrotóxicos apareceram nas décadas de 60 e 70, como solução para o controle das pragas que atingiam lavouras e rebanhos (PERES *et al.*, 2003). Desde 2008, o país ocupa o primeiro lugar na comercialização mundial e são autorizados 511 ingredientes ativos de agrotóxicos registrados (CARNEIRO *et al.*, 2012). Em 2017, a agricultura brasileira utilizou 540 mil toneladas de ingredientes ativos (MAPA, 2019).

O registro e controle desses produtos no país é realizado por três órgãos federais que atuam em conjunto. O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), é responsável pela avaliação do impacto sobre o ambiente e seres vivos; a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece os parâmetros toxicológicos dos ingredientes ativos e classificação toxicológica dos produtos formulados e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), avalia a eficiência agrônômica e aprova os rótulos dos produtos, as competências de cada órgão é definida pelo Decreto nº 4.074 de 04 de janeiro de 2002 (BRASIL, 2002).

Os agrotóxicos apresentam diferentes modos de ação e toxicidade, sendo dividido em três grandes classes: inseticidas, fungicidas, herbicidas, rodenticidas, moluscicidas e acaricidas. Podem ser divididos em dois grupos principais: não-sistêmicos e sistêmicos (SILVA *et al.*, 2004). A classificação toxicológica desses produtos, apresentada na Tabela 1, baseia-se na avaliação do ingrediente ativo, que deve ser aprovado pelos órgãos competentes e comprovada a ausência de reação química entre os componentes da fórmula.

Tabela 1. Classificação toxicológica dos agrotóxicos

| Classe | Toxicidade | Cor |
|--------|----------------------|----------|
| I | Extremamente tóxico | Vermelho |
| II | Altamente tóxico | Amarelo |
| III | Moderadamente tóxico | Azul |
| IV | Pouco tóxico | Verde |

Fonte: BRASIL (1992)

A classificação do potencial de periculosidade ambiental baseia-se nos parâmetros de bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico, obedecendo a classificação apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Classificação do potencial de periculosidade ambiental

| Classe | Grau |
|--------|--------------------|
| I | Altamente perigoso |
| II | Muito perigoso |
| III | Perigoso |
| IV | Pouco perigoso |

Fonte: IBAMA (1996)

Os agrotóxicos apresentam características que influenciam diretamente no seu comportamento no solo, podendo ser hidrofóbicos e hidrofílicos; catiônicos e aniônicos; ácidos e básicos; polares e não polares, voláteis e não voláteis; persistentes e não persistentes (OLIVEIRA JR. e REGITANO, 2009). De acordo com o IBAMA (1990), a classificação quanto à persistência, que é o período no qual um agrotóxico permanece inalterado, é dada pela porcentagem de desprendimento de CO₂ em 28 dias (Tabela 3).

Tabela 3. Classificação dos agrotóxicos quanto à persistência

| Porcentagem | Persistência |
|--------------|--|
| 0 a 1% | Persistência alta (meia-vida acima de 180 dias) |
| 1 a 10% | Persistência média (meia-vida entre 90 e 180 dias) |
| 10 25% | Persistência reduzida (meia-vida entre 30 e 90 dias) |
| Acima de 25% | Não persistente (meia-vida abaixo de 30 dias) |

Fonte: IBAMA (1990)

Os resíduos dos agrotóxicos podem interagir com as fases sólidas, líquidas e gasosas do solo e com a microbiota. Os principais processos são a retenção, que afeta a disponibilidade de agrotóxicos na solução do solo; a transformação, que dita a sua persistência no local e o transporte, que se refere ao seu local de depósito no ambiente (OLIVEIRA JR. e REGITANO, 2009).

A retenção é a habilidade do solo em reter uma molécula orgânica, evitando que ela se mova para dentro ou para fora da matriz do solo, controlando processos de transformação química, biológica e a volatilização do agrotóxico para atmosfera e para meio aquático superficial e subterrâneo. Do ponto de vista toxicológico a retenção causa a diminuição do material disponível para interagir com a biota, redução na toxidez e imobilização do composto, reduzindo sua lixiviação e transporte no meio (GEVAO *et al.*, 2000).

A sorção é o processo de retenção geral, sem distinção entre os processos específicos, tais como, adsorção, absorção, partição e precipitação. No entanto, a retenção e partição são os principais processos envolvidos na sorção de pesticidas. O termo adsorção refere-se ao acúmulo da molécula orgânica à superfície de um sólido por forças de atração química ou física. A partição é a retenção em que o soluto penetra na estrutura dos componentes, principalmente na matéria orgânica, por dissolução (KOSKINEN e HARPER, 1990).

A liberação das moléculas de agrotóxicos sorvidas às superfícies das partículas de solo para a solução denomina-se dessorção. Em alguns casos, a sorção é completamente reversível, em outras apenas parte do agrotóxico sorvido retorna à solução do solo (OLIVEIRA JR. e REGITANO, 2009).

Os processos de transformação abrangem a persistência, a fotólise, a degradação química e biológica do agrotóxico no solo. A persistência é medida pela meia-vida ($t_{1/2}$) do composto, que é resultado da ausência de processos que modificam a estrutura química dos compostos e promovem sua dissipação e é dependente de fatores relacionados as propriedades químicas e físicas do solo, da atividade microbiana, do ambiente edáfico e do manejo (OLIVEIRA JR. e REGITANO, 2009).

A fotólise é a degradação de uma molécula pela radiação solar. As moléculas dos agrotóxicos absorvem comprimento de luz específico, que causa a excitação de elétrons, resultando na quebra ou na formação de ligações química. Apenas os agrotóxicos que se encontram na superfície do solo sofrem fotodecomposição, uma vez que a penetração de luz ultravioleta (UV) no solo é bastante limitada (OLIVEIRA JR. e REGITANO, 2009).

A degradação química pode ocorrer por meio de diversas reações, principalmente oxidação, redução e hidrólise. Em geral, temperaturas elevadas e boa umidade do solo facilitam as reações químicas. Além disso, valores extremos de pH podem resultar no aumento da hidrólise dos agrotóxicos. Pesquisas apontam que a hidrólise química seja o principal fator de degradação das triazinas simétricas por meio da eliminação do átomo de cloro da molécula de triazina (APPLEBY e DAWSON, 1994).

A transformação biológica de um composto químico, também chamado de biodegradação, envolve mudanças estruturais na molécula e mecanismos como oxidação, redução ou perda de um grupo funcional. A presença de certos grupos polarizados nas moléculas dos agrotóxicos proporciona pontos de ataque ao organismo, tais como OH, NHR, COOR e NR. As bactérias e os fungos são os principais microrganismos responsáveis pela degradação biológica dos agrotóxicos do solo (OLIVEIRA JR e REGITANO, 2009).

Os processos de transporte abrangem o escoamento superficial, a volatilização, lixiviação e a absorção de agrotóxicos pelas plantas. O movimento dos agrotóxicos na superfície do solo de áreas tratadas para áreas não tratadas, após chuvas pesadas, é chamado de escoamento superficial e pode ser influenciado por práticas culturais, tais como o sistema de plantio adotado, manejo de resíduos, incorporação, época dos primeiros eventos de precipitação pluvial após a aplicação e pelo potencial de erosão do solo em questão (GHIDEY *et al.*, 2005).

A volatilização é o processo pelo qual as moléculas dos agrotóxicos passam do estado líquido para a forma de vapor, podendo se perder para a atmosfera. Quanto menor a volatilidade, e quanto menor pressão de vapor, menor será a evaporação dos agrotóxicos e menores as perdas. Os agrotóxicos que são considerados não-voláteis, quando expostos à atmosfera por longos períodos de tempo, podem volatilizar (SANTOS, 2009).

O potencial de volatilização de um agrotóxico pode ser estimado pelas propriedades químicas do produto, como estrutura, peso molecular e pressão de vapor. Os fatores que influenciam a volatilização são a elevação da temperatura e aumento da umidade do solo, mas alternativas como a incorporação de herbicidas ao solo e a formulação do produto pode reduzir as perdas (OLIVEIRA JR. e REGITANO, 2009).

A lixiviação constitui um dos principais processos de dissipação dos agrotóxicos no solo, exercendo influência direta sobre o controle das plantas daninhas, a persistência e o risco de contaminação ambiental (FERRI *et al.*, 2003). As propriedades intrínsecas dos agrotóxicos, dos solos e do clima influenciam a lixiviação, sendo mais suscetíveis aqueles com elevada solubilidade em água e fraca sorção ao solo. Para ser lixiviado o agrotóxico deve estar na solução do solo ou adsorvido a pequenas partículas, como argilas, ácido fúlvicos e húmicos de baixo peso molecular, aminoácidos, peptídeos e açúcares (OLIVEIRA, 2001).

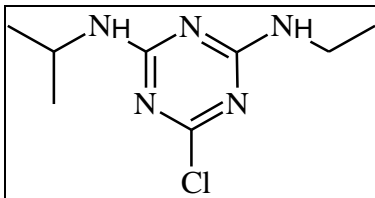
A tendência dos agrotóxicos à lixiviação é diretamente relacionada com seu potencial de adsorção, pois moléculas que têm forte interação dificilmente se submetem ao sentido descendente do perfil. A movimentação da água poderá favorecer a lixiviação, que se realiza com maior rapidez em solo arenoso com quantidade reduzida de argila e matéria orgânica (SANTOS, 2009).

As plantas são responsáveis pelo processo de absorção, porém participam de forma limitada na remoção de agrotóxicos no solo, no campo as plantas absorvem de 2 a 5% do total aplicado e ainda depende da densidade de plantas, das espécies e volume de solo (OLIVEIRA JR. e REGITANO, 2009).

3.2 Atrazina

A atrazina (2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina) (Figura 1) é um herbicida sistêmico, seletivo, pré e pós-emergente, importante representante do grupo das triazinas. Tem sido utilizada no controle anual de plantas daninhas em grande variedade de culturas, incluindo as de milho e cana-de-açúcar. Devido ao uso intenso, baixa reatividade e solubilidade, é comumente detectado no monitoramento de solos e águas subterrâneas (COUTINHO *et al.*, 2005). É um produto com classificação toxicológica III, sendo medianamente tóxico e, periculosidade ambiental II, muito perigoso ao meio ambiente.

Figura 1. Estrutura química da atrazina



Fonte: OLIVEIRA JR. e REGITANO (2009)

Possui massa molecular de 215,7 g mol⁻¹, é considerada uma base fraca (pKa 1,7) e seu grau de volatilização igual a 0,039 mPa a 20°C. Apresenta baixa solubilidade em água (35 mg L⁻¹ a 20°C), que está vinculada à sua baixa polaridade (UH, 2018). As propriedades da atrazina resultam em moderada mobilidade e persistência mediana (meia-vida de 60 dias), contribuindo para a acumulação a níveis contaminantes tanto na superfície como em profundidade nos solos e, águas superficiais e subterrâneas (PROSEN, 2012).

A transformação da atrazina, resulta principalmente da atuação de microrganismos. A partir de meados da década de 1990, bactérias capazes de degradar a atrazina parcial ou completamente, vêm sendo identificadas, entre estas *Arthrobacter* sp., *Agrobacterium* sp., *Nocardioides* sp., *Pseudomonas* sp. (VIEGAS *et al.*, 2012; UDIKOVIĆ-KOLIĆ *et al.*, 2012). Pesquisas destacam a importância de investigações acerca do potencial de comunidades e/ou consórcios microbianos na degradação da atrazina (ZHANG *et al.*, 2012).

Alguns microrganismos degradam a atrazina por reacções de *N*-desalquilação, em que grupos alquílicos ligados ao átomo de nitrogênio em anel, em aminas, carbamatos ou amidas são removidos por oxidação pela conversão em aldeído, produzindo desetilatrizona (DEA) e desisopropilatrizona (DIA). Estes produtos de degradação podem ainda sofrer nova desalquilação para serem convertidos em desisopropildesetilatrizona (ELLIS *et al.*, 2003).

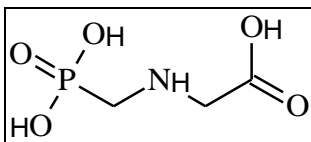
Os produtos de desalquilação (DIA e DEA), tal como a atrazina, funcionam como desreguladores hormonais (OH *et al.*, 2003), podendo ainda oferecer um maior risco de contaminação das águas do subsolo, devido à sua mobilidade (THURMAN *et al.*, 1994). Desta forma, a mineralização de atrazina é importante na biorremediação de solos comprometidos com este herbicida.

Quando aplicada por muitos anos, a atrazina e seus resíduos se acumulam nos solos agrícolas, podendo ser mobilizada através de ciclos entre períodos secos e úmidos, sendo então lixiviada. Portanto, considerando as elevadas quantidades aplicadas anualmente, juntamente com pesquisas que demonstram sua elevada persistência nos solos, a atrazina representa potencial ameaça ao ambiente (JABLONOWSKI *et al.*, 2009)

3.3 Glifosato

O glifosato [N-(fosfometil) glicina] (Figura 2) é um herbicida sistêmico, pós-emergente e dessecante altamente efetivo, não seletivo e largamente utilizado na agricultura mundial, sua utilização ocorre principalmente no controle de plantas daninhas anuais (SHANER, 2009). É classificado como medianamente tóxico (classe II) e perigoso ao meio ambiente (classe III).

Figura 2. Estrutura química do glifosato



Fonte. OLIVEIRA JR. e REGITANO (2009)

Possui peso molecular igual a $169,1 \text{ g mol}^{-1}$ e é considerado um ácido forte com pKa 2,34. Apresenta baixa volatilidade com valor de $0,0131 \text{ mPa}$ (20°C) e alta solubilidade em água (10500 mg L^{-1} a 20°C) (UH, 2018). Após a aplicação do glifosato, parte do produto é absorvida, ficando nas plantas daninhas, e parte é encaminhado para o solo, onde é biodegradado por organismos heterotróficos (ANDRÉA *et al.*, 2003).

O glifosato apresenta alta capacidade de adsorção através da troca de ligantes com os óxidos de ferro e alumínio e pontes de hidrogênio formadas com as substâncias húmicas presentes no solo. A adsorção reduz a concentração dos herbicidas na fração solubilizada do solo, diminuindo sua ação potencial, uma vez adsorvido, o glifosato pode ficar como resíduo ligado permanecendo no ambiente até sua completa mineralização. A meia-vida do glifosato no

solo é de 47 dias (medianamente persistente), mas pode variar de menos de uma semana até alguns meses, dependendo dos teores de argila e matéria orgânica e do nível de atividade microbiana (TONI *et al.*, 2006).

A atividade microbiana é um fator importante que determina a presença de glifosato no solo, os microrganismos o utilizam como fonte de energia, fósforo e carbono, sendo esses os principais responsáveis pela sua degradação. Aproximadamente 50% da molécula original pode ser metabolizada em 28 dias, por essa razão, produtos da degradação do glifosato têm sido identificados, como o ácido aminometilfosfônico (AMPA) e a sarcosina como metabólito intermediário (MATTOS *et al.*, 2010).

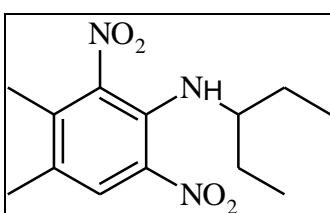
A rota de degradação do glifosato por microrganismos, envolve a ação de enzimas como as oxidoredutases e transaminases e do ácido glioxílico que clivam a molécula do glifosato em ligações diferentes daquela existente entre carbono e fósforo, podendo ocorrer em condições aeróbicas e anaeróbicas no perfil do solo (VEIGA *et al.*, 2001; TEJADA, 2009). O efeito do glifosato sobre a comunidade microbiana do solo tem demonstrado um incremento da atividade microbiológica, principalmente em fungos (ARAÚJO *et al.*, 2003).

3.4 Pendimetalina

A pendimetalina [N-1-(etil propil)-2,6-dinitro-3,4-metil-toluidina] (Figura 3) é um herbicida de ação não-sistêmica, pertencente ao grupo químico das dinitroanilinas (herbicidas amarelos), seletivo, pré e pós-emergente, utilizada no controle anual da maioria das gramíneas e de ervas daninhas de folhas largas em culturas de milho, batata, arroz, algodão, soja, tabaco, amendoim e girassol (COUTINHO *et al.*, 2005).

Apresenta massa molecular de 283,31 g mol⁻¹, é um ácido forte com pKa 2,8, tem baixa volatilizada (3,34 mPa a 20°C) e sua solubilidade em água é de 0,33 mg L⁻¹ a 20°C. A pendimetalina possui meia-vida de 44 dias, sendo considerado medianamente persistente (UH, 2018). É classificado como medianamente tóxico (classificação III) e muito perigoso para o meio ambiente (periculosidade ambiental II).

Figura 3. Estrutura química da pendimetalina



Fonte: OLIVEIRA JR. e REGITANO (2009)

Após a aplicação deste herbicida no solo, pode haver a dissipação através da evaporação, lixiviação e escoamento superficial. A pendimetalina apresenta baixa capacidade de adsorção, o que a torna mais móvel no ambiente, em águas subterrâneas como em águas de superfície, a sua presença já foi detetada (RODRÍGUEZ-LIÉBANA *et al.*, 2014).

A degradação no solo pode ocorrer tanto em condições aeróbicas como anaeróbicas. A rota de degradação aeróbica ocorre pela desalquilação do grupo amino, seguido da redução do grupo nitrilo. Em condições anaeróbicas verifica-se a redução sequencial dos grupos nitro (ARNOLD, 2018). Os produtos da degradação desse herbicida são mais polares que a própria pendimetalina.

Em estudos realizados por Ramakrishna *et al.* (2008) os metabolitos N-(1-etilpropil)-3,4-dicarboxi-2,6-dinitro benzenamina (M1), N-(1-etil-1-propil)-3,4-dicarboxi-2,6-dinitrobenzenamina-N-óxido (M2), N-(1-etilpropil)-3,4-dimetoxi-2,6-dinitrobenzenamina (M3) e benzimidazol-7-carboxialdeído (M4) foram identificados após a ação de microrganismos.

3.5 Técnicas de remediação para solo contaminado

Em geral, as tecnologias para tratamento de solos contaminados com compostos orgânicos, como os agrotóxicos, recaem em três categorias: imobilização do contaminante, separação e decomposição (GARRET *et al.*, 2005).

A imobilização consiste em barreiras físicas que evitam a migração dos contaminantes, são bastantes utilizadas devido à sua grande praticidade e baixo custo. Porém, esse método apenas isola o contaminante e evita que o mesmo possa se espalhar e causar maiores danos ao meio ambiente e à saúde humana. Além disso, geralmente existe limite de espaço físico destinado ao armazenamento dos resíduos e o aumento da produção destes pode torna-se um grande problema (BOLLAG e LIU, 1990).

A separação é o processo que extrai o contaminante para uma fase de gerenciamento mais fácil (líquida ou gasosa) ou para uma fase mais concentrada, reduzindo o volume do material a ser remediado. Porém, esse processo gera grandes quantidades de resíduos líquidos contaminados, o que pode ser uma desvantagem (BOLLAG e LIU, 1990).

A decomposição visa a total mineralização dos contaminantes, convertendo-os em água, gás carbônico e íons inorgânicos, através de processos de incineração, oxidação avançada e biorremediação. Dentre as técnicas de decomposição, a biorremediação utilizando consórcio de microrganismos parece causar menos impacto ao ambiente. No entanto, alguns resíduos podem ser tóxicos aos microrganismos utilizados no processo, que aumenta o período para se alcançar

a redução da contaminação (VILLA *et al.*, 2008). A Tabela 4 apresenta as principais técnicas de remediação de solos contaminados, detalhando a forma de atuação de cada uma.

Tabela 4. Técnicas de remediação de solos

| Técnica | Descrição |
|--|---|
| Extração de gás no solo | Remove compostos orgânicos voláteis da zona de saturação através da aplicação de um sistema de vácuo. |
| Bioaeração | Acelera a remoção de compostos orgânicos voláteis através da aeração da zona vadosa. |
| Air sparging | Remove contaminantes voláteis e semi-voláteis através de processos de aeração na zona de saturação. |
| Bio Sparging | Acelera a biodegradação de compostos orgânicos através da aeração do solo. |
| Tecnologias térmicas | Destroem contaminantes ou possibilitam a aceleração da transferência de fase do contaminante no subsolo. |
| Bioremediação acelerada | Altera, artificialmente, as condições bioquímicas naturais do solo para acelerar a degradação por microrganismos. |
| Incineração | Remoção de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis por incineração |
| Fitoremediação | Plantas apropriadas são utilizadas para promover a extração de compostos orgânicos e metais no solo. |
| Lavagem de solo/ Reinjeção/ Processos Químicos | Através de fluídos apropriados promovem a estripagem e a biodegradação. |
| Solidificação/ Encapsulamento/ Vitrificação | Promovem a imobilização do resíduo através de processos químicos e/ou térmicos. |

Fonte: Adaptado de NOBRE e NOBRE (2018)

3.6 Biorremediação de contaminantes

A biorremediação é uma técnica de remoção de contaminantes que ganhou expressão na década de 90, por apresentar vantagens como o menor custo e maior eficiência, que os métodos físicos e químicos, é utilizada em escala comercial no tratamento de áreas contaminadas (CHEN *et al.*, 2015).

A biorremediação é um processo que utiliza organismos vivos para remover ou reduzir poluentes no ambiente (GAYLARDE *et al.*, 2005) O termo também pode ser definido como

uma biotecnologia no qual se utiliza o metabolismo de microrganismos para a eliminação rápida de poluentes, com o objetivo de reduzir sua concentração a níveis aceitáveis, transformando-os em compostos de baixa toxicidade (YAKUBU, 2007).

As várias estratégias para a degradação biológica incluem tratamentos, *in situ* e *ex situ*. Nos tratamentos *in situ*, não há necessidade de remoção do material, sendo esta realizada no próprio local contaminado. Isto evita custos e distúrbios ambientais associados com o movimento de solos e águas que estão contaminados para outros locais destinados ao tratamento. Entre as técnicas *in situ* destacam-se: biorremediação passiva, bioestimulação, air sparging, bioventilação, bioaumentação e bioenriquecimento (PEREIRA e FREITAS, 2012).

A biorremediação passiva ou intrínseca, é um processo que ocorre naturalmente, os microrganismos autóctones sem qualquer interferência de tecnologias ativas de remediação, transformam os contaminantes em substâncias menos tóxicas. É uma técnica de baixo custo e que intervém minimamente no local (BENTO *et al.*, 2003; MARIANO *et al.*, 2007).

A bioestimulação consiste na adição de nutrientes orgânicos e inorgânicos no local contaminado, visando estimular a atividade dos microrganismos degradadores (JACQUES *et al.*, 2007). Os nutrientes utilizados como o nitrogênio e o fósforo são considerados fatores limitantes para a degradação microbiana. Gaylarde *et al.* (2005), relataram que técnicas de bioestimulação em experimentos em campo, aumentaram de cinco a dez vezes as taxas de degradação do contaminante em relação a um solo não tratado.

O air sparging se dá através do ar, que é injetado na zona saturada, usualmente abaixo da zona contaminada, no qual o vapor utilizado em forma de pressão positiva empurra os contaminantes do solo para a atmosfera, promovendo a biodegradação dos contaminantes pela atividade bacteriana aeróbica. É utilizado também para a descontaminação de aquíferos, de maneira que as soluções injetadas consigam se misturar e se espalhar completamente pela água do aquífero (WEBER e SANTOS, 2013).

A técnica de bioventilação é uma técnica de bioestimulação que se caracteriza pela adição de oxigênio no solo contaminando, para estimular o crescimento dos microrganismos naturais e/ou introduzidos pela bioaumentação. De acordo com Reginatto *et al.* (2012), esta tecnologia é considerada promissora, pois há disponibilidade de oxigênio molecular, tendo assim um grande efeito na biodegradação de vários compostos.

A bioaumentação e o bioenriquecimento são estratégias que visam auxiliar a concentração da microbiota do ambiente contaminado na degradação de misturas complexas de hidrocarbonetos com a adição de microrganismos específicos e degradadores para o contaminante. Esta técnica pode ser aplicada para aumentar a biodegradação do composto

poluente e reduzir o tempo de adaptação dos microrganismos presentes nesses ambientes contaminados (ROMANTSCHUK *et al.*, 2000).

Quando ocorre a reinoculação de microrganismos endógenos, extraídos do próprio solo contaminado, crescidos *in vitro* e reintroduzidos no ambiente em maior concentração, denomina-se bioaugmentação. Se os microrganismos inoculados forem exógenos, é chamado de bioenriquecimento (ROMANTSCHUK *et al.*, 2000).

Nos tratamentos *ex situ*, há a necessidade de retirada de solo ou efluente do local contaminado para que os mesmos sejam tratados em outro local. A remoção pode ser necessária quando há possibilidade de contaminação de pessoas e do ambiente ou quando há presença de altas concentrações de contaminante (JACQUES *et al.*, 2010). É uma técnica de fácil controle e apresenta uma maior versatilidade para o tratamento de vários tipos de contaminantes. As técnicas *ex situ* mais utilizadas são landfarming, biopilhas e biorreatores.

Landfarming é uma tecnologia que reduz a concentração de contaminantes presentes em solos através de processos associados à biorremediação. Envolve a distribuição do solo contaminado em uma pequena camada na superfície do solo do local de tratamento. O solo é revolvido periodicamente para que o contato entre os microrganismos e os compostos orgânicos aumente e para que haja oxigênio necessário para a degradação aeróbica (KHAN *et al.*, 2004).

A tecnologia de biopilhas envolve o empilhamento de solos contaminados e tem como objetivo principal estimular a atividade microbiana aeróbica acelerando a degradação do poluente pela aeração, adição de nutrientes e correção da umidade. A aeração destas pilhas pode ser realizada de duas maneiras, mecanicamente ou por um sistema subterrâneo de passagem de ar (KHAN *et al.*, 2004).

Os biorreatores são reatores que produzem diversas reações químicas catalisadas por biocatalisadores, possibilitando o aumento da disponibilidade dos contaminantes aos microrganismos degradadores e a eliminação da heterogeneidade da distribuição dos contaminantes no solo (SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

A utilização da biorremediação oferece inúmeros benefícios, porém apresenta algumas limitações e complicações, mesmo ante a evidência de que os princípios básicos da degradação são relativamente fixos (CRAPEZ *et al.*, 2002). A multiplicidade de detalhes que envolvem o metabolismo dos microrganismos traz, intrinsecamente, aspectos que acabam por complicar o processo, como por exemplo:

- Biodisponibilidade inadequada dos contaminantes: nem sempre os contaminantes encontram-se dispostos de uma forma facilmente assimilável pelos microrganismos que os devem degradar.

- Níveis de toxicidade dos contaminantes: determinados elementos químicos são degradáveis em determinadas concentrações, em outras mais elevadas, a toxicidade atinge níveis que impossibilitam ou retardam a degradação pelos microrganismos.
- Preferência microbiana: há multiplicidade de compostos em um determinado ambiente, os microrganismos dão preferência àqueles que são de digestão mais fácil ou fornecem mais energia. Em razão desse fator de preferência, os microrganismos por vezes deixam de degradar o contaminante visado pela biorremediação.
- Degradação incompleta de contaminantes: em razão das características de certos contaminantes, inclusive sua concentração, por vezes a degradação não se dá por completo, decorrendo daí a geração de produtos denominados intermediários. Em certos casos o produto intermediário apresenta um nível de toxicidade bastante perigoso ou mais alto que o próprio contaminante original.

3.7 Biorremediação por microrganismos

A remediação por microrganismo é relatada Procópio *et al.* (2005) e Chelinho *et al.* (2010) como prática promissora para descontaminação de ambientes que receberam a aplicação de agrotóxicos. É comprovada a eficiência desta técnica para tratar solos contaminados com hidrocarbonetos, também pode ser utilizada no tratamento de lodo, águas contaminadas e diversos tipos de resíduos (ANDRADE *et al.*, 2010).

Entre as várias reações que um agrotóxico pode sofrer, a mineralização é a mais desejável, uma vez que há a produção de carbono e energia para o crescimento microbiano, prevenindo a acumulação de intermediários potencialmente perigosos para o ambiente (SILVA, MELO e OLIVEIRA 2004). Por meio do seu metabolismo, os microrganismos utilizam o contaminante como fonte de energia, resultando em um crescimento da colônia microbiana e descontaminação do meio (BOOPATHY, 2000). Essa capacidade mineralizadora pode estar associada ao desempenho de um único microrganismo ou à ação conjunta de um consórcio microbiano (SILVA *et al.*, 2005).

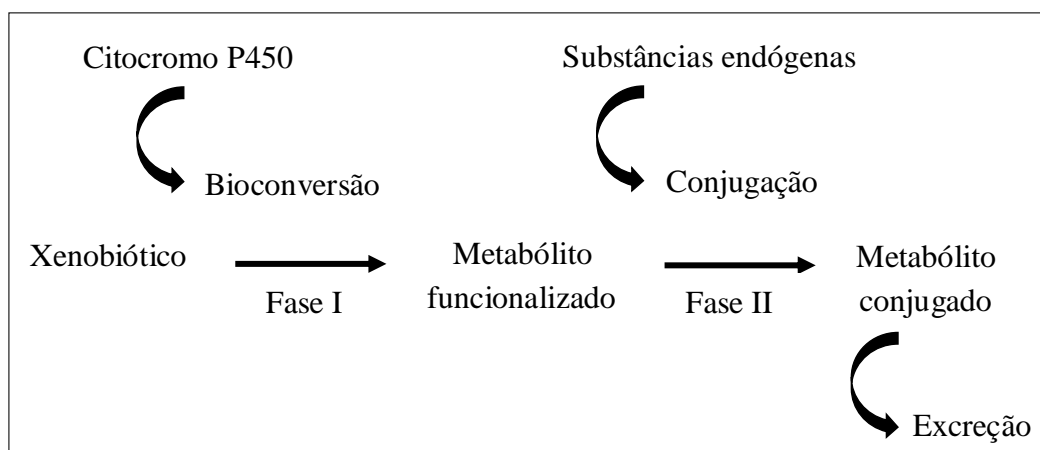
No processo de degradação também ocorre o cometabolismo, evidente em consórcio microbiano, onde os microrganismos são divididos em primários e secundários. Os primários são aqueles capazes de metabolizar o substrato principal fornecido ao sistema, enquanto os secundários utilizam os produtos liberados pelos microrganismos primários. Esse processo é importante, pois geralmente nenhum microrganismo possui todas as enzimas necessárias para a metabolização completa de um agrotóxico (GAYLARDE *et al.*, 2005).

Um consórcio microbiano incrementa a capacidade enzimática requerida para atacar misturas complexas de hidrocarbonetos. Dessa forma, microrganismos que não apresentam potencial para degradar completamente um composto, poderão transformá-lo em uma substância degradável para outro microrganismo (LEONEL *et al.* 2010). Assim, biodegradação por consórcio fúngico apresenta-se como uma poderosa alternativa biotecnológica (GALLEGO *et al.*, 2007).

As transformações realizadas por microrganismos podem resultar na degradação da estrutura molecular original do agrotóxico em formas mais simples, porém a molécula resultante poderá persistir caso as condições ambientais não sejam favoráveis para a subsequente degradação. Os metabolitos resultantes, geralmente apresentam menor toxicidade para a biota do que os compostos originais, mas em alguns casos não ocorre a diminuição da toxicidade e os produtos de degradação poderão ser mais nocivos, representando um maior risco para o meio ambiente (ANDREU e PICÓ, 2004; VAN HAMME *et al.*, 2003).

O metabolismo dos xenobióticos por fungos inclui duas fases sequenciais conhecidas como Fase I e Fase II (Figura 4). As principais reações da Fase I consistem em reações de oxidação (desalquilação, desaminação, hidroxilação e formação de sulfóxidos), redução (adição de hidrogénio e nitro-redução) e hidrólise, denominadas reações de funcionalização devido à introdução de grupos funcionais na molécula a ser biotransformada (-COOH, -OH, -NH₂). Estas reações são catalisadas pelo citocromo P450 monooxigenases, flavinas e monoaminooxidasas. Normalmente, destas reações resultam moléculas mais hidrofílicas, que podem ser bioinativadas ou apresentarem-se menos ou mais reativas que o composto original (SILVA *et al.*, 2004).

Figura 4. Reações de Fase I e Fase II do metabolismo de xenobióticos por fungos



Fonte: Adaptado de Costa *et al.* (2004)

A fase II, consistem em reações de conjugação entre o grupo polar do xenobiótico bioconvertido com substâncias endógenas (metabolitos conjugados), onde ocorre reações que aumentam a solubilidade em água do metabolito conjugado, favorecendo a sua eliminação das células. Muitos dos xenobióticos sofrem reações de ambas as fases de forma sequencial (Fase I seguida da Fase II), enquanto outros podem sofrer reações apenas de uma fase (COSTA *et al.*, 2004).

Para que essas reações ocorram, vários parâmetros de solo e clima influenciam a atividade dos microrganismos degradadores, tais como o pH do meio, que deve estar na faixa entre 5,5 a 8,5; textura e porosidade do solo (solos com alta granulometria apresentam taxas mais rápidas de degradação); umidade (a faixa ideal é de 12 a 16%); temperatura (em torno de 30°C) e; a presença de oxigênio, uma vez que a maioria dos hidrocarbonetos são degradados em meio aeróbico (COLLINA *et al.*, 2005).

3.7.1 Fungos filamentosos como biorremediadores

Os fungos são organismos eucarionte, unicelulares ou multicelulares, microscópicos com fases macroscópicas, possui parede celular constituída principalmente por quitina e β -glucanos, mitocôndrias compostas por cristas planas, apresentam estrutura de Golgi e peroxissomos. A reserva energética é por moléculas de glicogênio e lipídeos. Os fungos são organismos heterotróficos, parasitas ou sapróbios, constituídos por hifas, exceto as leveduras. As hifas geralmente são multinucleadas, com septos simples ou doliporo, com função cenocítica. Apresentam fase haploide, diploide ou dicariótica. A reprodução ocorre de forma sexuada ou assexuada, com produção de esporos, gemação ou fissão binária, no caso das leveduras (BONONI e GRANDI, 1998).

Os fungos expressam características que os tornam interessantes para aplicação em biorremediação, como o crescimento induzido quimioestaticamente em direção à fonte de carbono orgânico, por meio do alongamento e ramificação das hifas e o sistema de biodegradação fúngico, que é realizado por enzimas extracelulares. Dessa forma, o contato superficial com o contaminante é otimizado, aumentando sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, sua biodegradação (CHANDER *et al.*, 2004).

Também são conhecidos pela sua diversidade e habilidade notável para degradar materiais naturais complexos e persistentes, tais como lignina, quitina e celulose microcristalina. Os fungos possuem uma bioatividade e crescimento morfológico que os tornam mais eficientes degradadores que as bactérias. São capazes de crescer sob condições ambientais

de estresse como meios com baixos valores de pH, pobres em nutrientes e com baixa atividade de água; contribuem para ciclagem de nutrientes e conseqüentemente, para a manutenção dos ecossistemas (MOLLEA *et al.*, 2005).

O emprego dos fungos na remoção dos poluentes começou a ser estudado nos últimos trinta e cinco anos do século XX (SOARES *et al.*, 2011). Os primeiros trabalhos relacionados a fungos para biorremediação se deu por Nobles (1975), que usou, em seu estudo, *Saccharomyces cerevisiae* para remoção de lindano e dieldrin, seguido do trabalho de Khindaria *et al.* (1975) que estudaram a degradação de heptacloro pelo gênero *Aspergillus*. Mas, foi apenas nas últimas décadas que houve incremento nas pesquisas de biodegradação por fungos.

Avaliações realizadas em escala de laboratório, mostram que fungos possuem um potencial adequado para degradar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de alto peso molecular (HPAs) e 40 outros compostos orgânicos recalcitrantes, por meio de sistemas enzimáticos extracelulares (ATAGANA *et al.*, 2006).

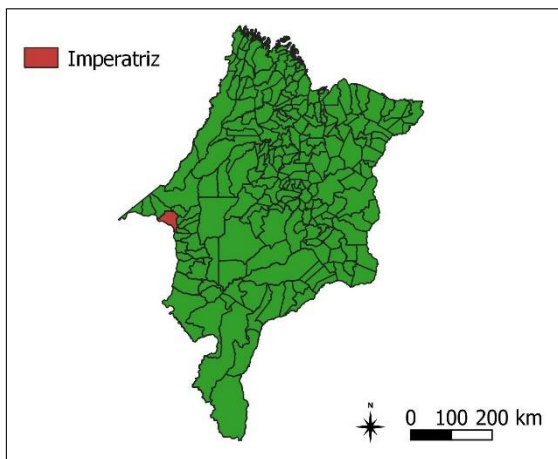
Os fungos como *Pleurotus spp.*, *Trametes versicolor* e *Lentinula edodes*, têm sido estudados quanto ao potencial de remediar solos contaminados. A espécie *Phanerochaete chrysosporium* é um fungo filamentososo que produz uma enzima extracelular capaz de degradar diferentes compostos químicos, tendo sido proposta para ser utilizada como agente biorremediador de áreas contaminadas por poluentes complexos (SILVA *et al.*, 2004).

Singh (2006) enfatiza que os fungos são organismos promissores, que estão gerando cada vez mais resultados positivos para a recuperação de áreas degradadas por meio do processo de biorremediação. Dessa forma, o uso de fungos filamentosos, em processos de biorremediação é altamente conveniente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em Imperatriz (05° 31' 00" S 47° 27' 36" W), no Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LABITEC) do Centro de Ciências Exatas e Naturais pertencente a Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão (Figura 5).

Figura 5. Imperatriz - Maranhão



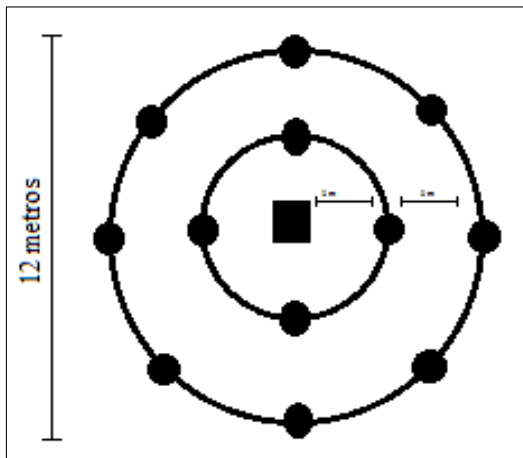
4.1 Coleta de solo para isolamento de fungos e análises físico-químicas

As áreas de coleta de solo estão localizadas na cidade de Imperatriz, no sudoeste do estado do Maranhão. De acordo com a classificação internacional Köppen-Geiger o clima é do tipo Aw; no último ano a temperatura e a umidade relativa do ar variaram respectivamente entre 25 a 36°C e 60 a 92% e a pluviosidade anual foi de 1604 mm; a altitude média da cidade é de 123,3 m e apresenta uma área de 1368,988 km² (INMET, 2018).

Com a finalidade de se obter uma maior variedade de fungos resistentes, foram coletadas amostras em três propriedades agrícolas que fazem uso intensivo de herbicidas, na estação seca. A primeira área (5° 31' 31" S 47° 26' 38" W) cultiva hortaliças e utiliza glifosato e pendimetalina a cerca de oito anos; a segunda área (5° 35' 22" S 47° 25' 35" W) é explorada desde a década de 70, utiliza atrazina e glifosato e tem como cultura o milho; já a terceira (5° 31' 13" S 47° 26' 53" W), é uma área agrícola experimental pertencente a prefeitura de Imperatriz e faz uso do herbicida glifosato. No período de coleta das amostras, as áreas estavam sendo preparadas para o plantio.

Em cada área foram coletadas 12 subamostras de solo, com auxílio de trado holandês a uma profundidade de 20 cm, com os pontos arranjados em dois círculos concêntricos a 3 e 6 m de raio a partir de um único monólito (Figura 6).

Figura 6. Esquema de amostragem para fungos do solo



Fonte: Adaptação de MOREIRA *et al.* (2010)

Cada conjunto de 12 subamostra foi misturado para formar uma amostra composta de aproximadamente 500 g (MOREIRA *et al.*, 2010). Os solos foram peneirados, secos ao ar, utilizados para o isolamento dos fungos e enviado para análises.

4.2 Isolamento de fungos filamentosos

O isolamento dos fungos foi realizado por meio de diluições seriadas, 12,5 g de solo de cada amostra composta foram colocadas em frascos de erlenmeyer contendo 125 mL de meio mineral (NaCl 0,85%) esterilizado, formando uma suspensão de 1:10 que permaneceu sob agitação durante 30 minutos em mesa agitadora, em seguida 1 mL da suspensão foi diluída em 9 mL de meio mineral até obter a proporção 1:1000 (COLLA *et al.*, 2008).

Posteriormente, em capela de fluxo laminar, alíquotas de 1 mL de cada diluição final foram inoculadas em placas de Petri esterilizadas contendo meio de cultura sabouraud dextrose 4%, com adição de tetraciclina e cloranfenicol para inibir o crescimento de bactérias, e incubadas em estufa a 28°C por sete dias. A sequência do isolamento foi realizada através da técnica de esgotamento por estrias (COLLA *et al.*, 2008). Obtiveram-se 10 fungos, que foram preservados em em meio de cultura sabouraud dextrose 4% inclinado.

4.3 Seleção fungos para degradar atrazina, glifosato e pendimetalina

A seleção dos fungos resistentes aos herbicidas atrazina, glifosato e pendimetalina foi realizada através da inoculação dos microrganismos em meio de cultura KATAYAMA (K₂HPO₄ 0,5g; NaNO₃ 0,5g; MgSO₄.7H₂O 0,0125 g; CaCl₂.2H₂O 0,005 g; solução traço 10 mL; ágar 13 g; água destilada 1 L; pH 7,0) proposto por Silva *et al.* (2004), contaminado com

atrazina, glifosato e pendimetalina nas concentrações 0, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Solução traço: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg; $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3 mg; H_3BO_3 30 mg; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mg; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mg; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 mg; $\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3 mg; água destilada 1 L). As placas de petri foram incubadas a 28°C por 14 dias.

A seleção dos fungos foi qualitativa, baseada em observações macroscópicas de crescimento das colônias após 14 dias de incubação, sendo: -- crescimento ruim (5 mm); +- crescimento razoável (10 mm); + crescimento satisfatório (20 mm) e; ++ crescimento ótimo (40 mm) (ALVES e ORLANDA, 2013).

Os fungos que apresentaram crescimento ótimo e satisfatório foram resistentes aos herbicidas e enviados à Micoteca URM do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pernambuco para identificação. Nessa etapa foram utilizados 10 fungos, três herbicidas (atrazina, glifosato e pendimetalina) e cinco concentrações, em triplicata, resultando em 450 unidades experimentais.

4.4 Crescimento micelial em meio de cultura contaminado com atrazina, glifosato e pendimetalina

Os fungos selecionados foram plaqueadas através da inoculação pontual no centro de cada placa de Petri contendo meio de cultura sólido sabouraud dextrose 4%, contaminado com atrazina, glifosato e pendimetalina nas concentrações 0, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e incubadas durante sete dias a 28°C.

As médias de crescimento micelial (MCM) das colônias, que indica o grau de adaptabilidade dos fungos em função do tempo, foram avaliadas após o primeiro, o terceiro e o sétimo dia. As taxas de crescimento relativo (TCR) demonstram o crescimento de cada fungo após três dias, considerando apenas o herbicida como fonte de carbono e as taxas de inibição máxima (TIM) que estão relacionadas com a inibição do crescimento de cada fungo após 24 horas de exposição aos herbicidas, foram calculadas com o auxílio das equações 1 e 2 (ALVES e ORLANDA, 2013):

$$T_r = \frac{T_t}{T_{z3}} \times 100 \quad (1)$$

$$T_i = \frac{T_{zi} - T_t}{T_{zi}} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

T_r = Taxa de crescimento relativo;

T_i = Taxa de inibição máxima;

T_t = Taxa de crescimento mínimo com atrazina, glifosato e pendimetalina ($\mu\text{g mL}^{-1}$);

T_{z3} = Taxa de crescimento na concentração ($0 \mu\text{g mL}^{-1}$) após o terceiro dia e

T_{z1} = Taxa de crescimento na concentração ($0 \mu\text{g mL}^{-1}$) após o primeiro dia.

O teste do crescimento micelial dos fungos foi realizado em esquema fatorial, com os níveis de fator fungos resistentes aos herbicidas (três microrganismos), associados a três níveis de fator herbicidas (atrazina, glifosato e pendimetalina), cinco níveis de fator concentração de herbicidas (0, 10, 20, 50 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e cinco repetições, resultando em 225 unidades experimentais.

4.5 Produção da suspensão de esporos

A produção da suspensão de esporos foi realizada de acordo com Melo (2009). Com o auxílio de uma alça de platina flambada, foram transferidas porções de cada fungo preservado para placas de Petri contendo meio de cultura sólido sabouraud dextrose 4%, em seguidas as placas foram incubadas a 28°C durante 20 dias.

Após a esporulação abundante dos fungos, foi adicionado em cada placa de Petri com colônias puras, 10 mL de meio mineral (1 L de água destilada, 18,34 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 6,0 g de KH_2PO_4 ; 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 4,0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,0) esterilizado com a finalidade de obter-se uma suspensão de esporos. A suspensão foi agitada e o conteúdo foi transferido para erlenmeyers esterilizados.

Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes, a suspensão obtida foi agitada para a destruição de aglomerados de esporos. Um mililitro de cada suspensão foi transferido para um tubo de centrifuga (falcon) estéril contendo 2 mL de solução a 0,05% de Tween 80 em água, seguido de agitação por 5 minutos. Com o auxílio de contagem em câmara de Neubauer foi preparada uma suspensão de esporos na concentração de 1×10^6 esporos mL^{-1} (ALFENAS *et al.*, 2007).

4.6 Estudo da degradação de atrazina, glifosato e pendimetalina em microcosmos

A fim de detectar a atividade de degradação dos fungos individualmente e em consórcios, foram realizados ensaios em microcosmos, que são experimentos feitos em laboratório para reproduzirem as condições reais encontradas na natureza. A atividade respiratória fúngica foi

avaliada por respirometria aeróbia, utilizando o princípio do método respirométrico de Bartha, essa metodologia é padronizada pela norma brasileira NBR 14283 (ABNT, 1999).

Os microcosmos consistiram em potes de vidro de 600 mL vedados, com 30 mL de solução de KOH 0,50 mol L⁻¹ em um béquer de 50 mL que foi depositado no centro dos microcosmos. Em cada pote foi adicionado 100 g de solo estéril contaminado com atrazina, glifosato e pendimetalina na concentração 50 µg mL⁻¹; 1 mL da suspensão de esporos dos fungos resistentes aos herbicidas e água destilada estéril para manter a umidade.

Assim preparados, os microcosmos foram fechados e incubados a 30°C por um período de 15 dias. Foram realizadas três titulações, sendo a primeira realizada após cinco dias, a segunda após 10 dias e a terceira após 15 dias. Para as titulações, os microcosmos foram abertos, em capela de fluxo laminar, e retirados 10 mL da solução de KOH 0,50 mol L⁻¹, à essa solução foi acrescentada duas gotas do indicador fenolftaleína 0,1%. A solução foi titulada com HCl 0,50 mol L⁻¹ até o desaparecimento da cor rosa, a quantidade de HCl 0,50 mol L⁻¹ gasto na titulação foi anotado para todos os tratamentos.

A partir do volume gasto nas titulações, foi possível calcular a respiração microbiana (mg de CO₂) e relacionar os resultados por meio das curvas de crescimento microbiano (Equação 3).

$$\text{mg de CO}_2 = (\text{VB} - \text{VA}) \times \text{C} \times \text{f} \times 22 \times \text{FA} \quad (3)$$

Onde:

VB = volume de HCl gasto na titulação do branco;

VA = volume de HCl gasto na titulação da amostra;

C = concentração de HCl

f = fator de correção da concentração do ácido;

22 = equivalente – gama do CO₂

FA = fator de correção da alíquota usada na titulação (volume de KOH) usado como armadilha de CO₂/volume de alíquota de KOH utilizado na titulação.

O experimento foi realizado em esquema fatorial com três níveis de fator fungo (*Aspergillus fumigatus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium citrinum*), associado a três níveis do fator herbicida (atrazina, glifosato e pendimetalina), um nível concentração de herbicida (50 µg mL⁻¹) e suas respectivas testemunhas, em triplicada, resultando em 30 unidades experimentais.

Os fungos foram consorciados de acordo com os resultados da avaliação da degradação dos fungos individualmente, os microrganismos que apresentaram capacidade de metabolizar os herbicidas foram utilizados para compor os consórcios. Foram realizados três ensaios simultâneos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) para cada herbicida.

Para o microcosmo contaminado com atrazina, foram utilizados os consórcios *Fusarium verticillioides* - *Aspergillus fumigatus* (Fv-Af), *Fusarium verticillioides* - *Penicillium citrinum* (Fv-Pc) e, *Aspergillus fumigatus* - *Penicillium citrinum* (Af-Pc) nas concentrações 0 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com cinco repetições, resultando em 30 unidades experimentais. Nos microcosmos contaminados com glifosato e pendimetalina, o consórcio utilizado foi *Aspergillus fumigatus* - *Penicillium citrinum* (Af-Pc) nas concentrações 0 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com cinco repetições, resultando em 10 unidades experimentais para cada um dos tratamentos.

4.7 Teste dos resíduos de degradação

A análise de genotoxicidade é um método utilizado para detectar danos em sistemas expostos a mutagênicos, assim, foi possível detectar os resíduos dos herbicidas nos solos tratados pelos consórcios fúngicos nos microcosmos. O bioindicador utilizado foi a *Allium cepa* e seguiu-se a técnica descrita por Fiskesjö (1993) e Freitas *et al.* (2017).

Pesou-se 12,5 g de amostras de solos tratados nos microcosmos e amostras de solos insentas de contaminação em erlenmeyers de 125 mL, em seguida, adicionou-se 50 mL de água destilada na proporção terra: água de 1:4 (m/v). Após agitação por 1 hora em mesa agitadora e sedimentação por 24 horas sob refrigeração, as suspensões foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos para obter o sobrenadante, denominado de elutriato.

Os bulbos de *Allium cepa* utilizados foram adquiridos no comércio local, tendo as mesmas variedades e tamanhos semelhantes. Antes de aplicar o teste, os bulbos foram enraizados em água destilada durante 7 dias, em seguida, permaneceram em contato com elutriato dos tratamentos por 24 horas. As raízes foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 (3 etanol:1 ácido acético) por 24 horas. Após a fixação, foram mantidas em tubos de ensaio com álcool 70% e conservadas em refrigerador até a sua utilização para confecção das lâminas.

No preparo das lâminas foram utilizadas duas pontas de raízes por bulbo, escolhidas de forma aleatória. Após isso, foram hidrolisadas em HCl (mol L^{-1}) por 5 minutos, lavadas em água destilada e coradas com orceína acética 2% por 30 minutos. As lâminas foram preparadas utilizando a técnica de esmagamento de acordo Guerra e Souza (2002).

A análise das lâminas foi realizada utilizando microscópio óptico marca Carl Zeiss com objetiva de 40x e 100x. Analisou-se imagens de 250 células para cada tratamento do teste, observando o número de células em divisão para determinação do índice mitótico (IM) (Equação 4) e da ocorrência alterações celulares (OAC) (Equação 5).

$$\text{IM (\%)} = \frac{\text{número de células em divisão}}{\text{total de células}} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{OAC (\%)} = \frac{\text{número de células com alterações celulares}}{\text{total de células em divisão}} \times 100 \quad (5)$$

Foram realizados três ensaios simultâneos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) para cada herbicida. Para o elutriato de solo contaminado com atrazina os consórcios fúngicos utilizados foram: *Fv-Af*, *Fv-Pc* e, *Af-Pc* nas concentrações 0 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com cinco repetições, resultando em 30 unidades experimentais. Nos elutriatos de solo contaminado com glifosato e pendimetalina, o consórcio utilizado foi *Af-Pc* nas concentrações 0 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com cinco repetições, resultando em 10 unidades experimentais para cada um dos tratamentos. Os índices mitóticos desses dois tratamentos foram avaliados separadamente.

4.8 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância, teste de Tukey e teste de Fisher, com $p < 0,05\%$ para comparação das médias, com o auxílio do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2014).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises das amostras de solo

A área 1 possui solo de textura arenosa, pouco intemperizado e com baixo teor de argila, pH levemente ácido, matéria orgânica em nível baixo, saturação por base e capacidade de troca de cátions em níveis médios. O solo da área 2 possui textura franco siltosa, pouco intemperizado e com baixo teor de argila, pH adequado, saturação por base alta, capacidade de troca de cátions e matéria orgânica em níveis médios. A área 3 possui solo de textura franco arenosa, pH ácido, saturação por base baixa, capacidade de troca de cátions alta e matéria orgânica em nível médio, sendo um solo pouco intemperizado com médio teor de argila (Tabela 5).

Tabela 5. Resultados das análises químicas das amostras de solos (0 – 20 cm de profundidade)

| | pH (CaCl ₂) | P - (mg dm ⁻³) - | K | Al | Ca | Mg | H+Al ----- (cmolc dm ⁻³) ----- | CTC ----- | SB (%) | MO (g dm ⁻³) |
|--------|----------------------------|---------------------------------|-----|------|------|------|---|--------------|-----------|-----------------------------|
| Área 1 | 5,40 | 34 | 78 | 0,10 | 2,90 | 0,70 | 0,32 | 5,60 | 67,86 | 12 |
| Área 2 | 6,30 | 4,40 | 204 | 0,20 | 6,00 | 2,60 | 0,16 | 10,35 | 83,57 | 29 |
| Área 3 | 4,50 | 18,20 | 45 | 0,40 | 1,90 | 0,50 | 0,66 | 33,51 | 33,47 | 23 |

Solos siltosos e arenosos, com baixos teores de argila e níveis de matéria orgânica relativamente baixos a médios, são propícios à contaminação e lixiviação (OLIVEIRA JR. e REGITANO, 2009). Desta forma a possibilidade de os herbicidas atrazina, glifosato e pendimetalina estarem presentes na solução do solo é maior, podendo facilitar a degradação, por outro lado, ficam propícios a serem lixiviados contaminando os lençóis freático e corpos d'água da região.

O grau de acidez do solo, o tipo de dissociação e a constante de dissociação do herbicida (pKa) influenciam no comportamento desses compostos no solo (OLIVEIRA JR e REGITANO, 2009). Herbicidas ácidos, como o glifosato e a pendimetalina, apresentam formas moleculares capazes de doar um próton e formar íons carregados negativamente. O pH dos solos coletados foi maior que o pKa do glifosato (pKa 2,34) e da pendimetalina (pKa 2,8), deste modo, a concentração da forma não dissociada será menor que a da forma aniônica, aumentando a sorção e impedindo o transporte através da solução do solo (OLIVEIRA, 2001).

A atrazina é considerada uma base fraca, cuja forma molecular é capaz de receber prótons e formar íons carregados positivamente. Os pH dos solos coletados foram maiores que o pKa da atrazina (pKa 1,7), portanto a concentração da forma molecular será maior que da forma protonada ou catiônica, esse herbicida permanecendo na forma neutra apresenta baixa sorção, ficando disponível na solução do solo (OLIVEIRA, 2001).

5.2 Isolamento, seleção e identificação dos fungos

A capacidade de crescimento dos fungos isolados em meio de cultura contaminado com 0, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de atrazina, glifosato e pendimetalina está descrito na Tabela 6. Os fungos classificados como ++ ótimo e + satisfatório foram identificados pela Micoteca URM do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pernambuco (Tabela 7) (Figura 7).

Tabela 6. Crescimento dos fungos isolados em meio de cultura contaminado com 0, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de atrazina, glifosato e pendimetalina

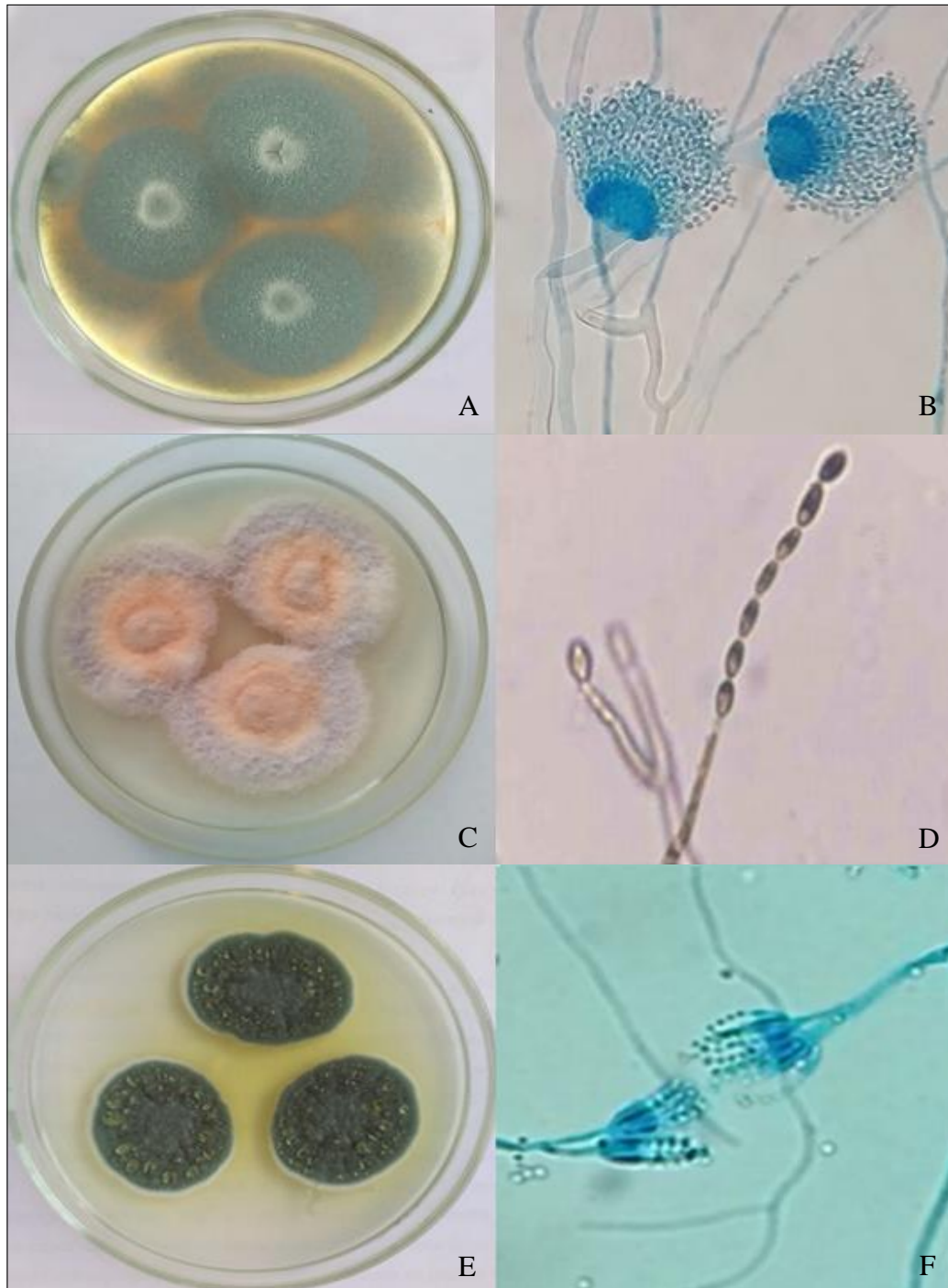
| Crescimento dos fungos isolados nas concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | | | |
|---|----|----|----|----|-----|
| Fungos (atrazina) | 0 | 10 | 20 | 50 | 100 |
| AF1 | ++ | ++ | ++ | + | +- |
| AF2 | + | +- | +- | -- | -- |
| AF3 | +- | -- | -- | -- | -- |
| AF4 | ++ | +- | +- | -- | -- |
| AF5 | + | +- | +- | -- | -- |
| AF6 | +- | -- | -- | -- | -- |
| AF7 | ++ | + | + | +- | +- |
| AF8 | ++ | ++ | ++ | + | +- |
| AF9 | + | +- | +- | +- | -- |
| AF10 | ++ | ++ | ++ | + | +- |
| Fungos (glifosato) | 0 | 10 | 20 | 50 | 100 |
| GF1 | ++ | ++ | + | + | +- |
| GF2 | ++ | +- | +- | -- | -- |
| GF3 | +- | -- | -- | -- | -- |
| GF4 | ++ | +- | -- | -- | + |
| GF5 | + | -- | -- | -- | -- |
| GF6 | +- | +- | -- | -- | -- |
| GF7 | ++ | ++ | +- | +- | -- |
| GF8 | ++ | ++ | + | + | +- |
| GF9 | + | -- | -- | -- | -- |
| GF10 | ++ | ++ | ++ | + | +- |
| Fungos (pendimetalina) | 0 | 10 | 20 | 50 | 100 |
| PF1 | ++ | ++ | + | +- | -- |
| PF2 | + | +- | -- | -- | -- |
| PF3 | +- | -- | -- | -- | -- |
| PF4 | +- | +- | +- | -- | -- |
| PF5 | + | -- | -- | -- | -- |
| PF6 | +- | +- | -- | -- | -- |
| PF7 | ++ | + | +- | +- | -- |
| PF8 | ++ | ++ | + | +- | -- |
| PF9 | + | -- | -- | -- | -- |
| PF10 | ++ | + | + | +- | -- |

-- crescimento ruim (5 mm); +- crescimento razoável (10 mm); + crescimento satisfatório (20 mm); ++ crescimento ótimo (40 mm)

Tabela 7. Fungos identificados e incorporados ao acervo da Coleção de Culturas – Micoteca URM do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco

| Nome da espécie | Código da amostra (URM) |
|---|-------------------------|
| <i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen. | 8070 |
| <i>Fusarium verticillioides</i> (Sacc.) Nirenberg | 7954 |
| <i>Penicillium citrinum</i> Thom | 8069 |

Figura 7. Características culturais e morfológicas dos fungos identificados



(A) Colônia de *Aspergillus fumigatus* em meio de cultura BDA (B) Conídios de *Aspergillus fumigatus* (C) Colônia de *Fusarium verticillioides* em meio de cultura BDA (D) Conídios de *Fusarium verticillioides* (E) Colônia de *Penicillium citrinum* em meio de cultura BDA (F) Conídios de *Penicillium citrinum*

Segundo Grünig *et al.* (1997) o *Aspergillus fumigatus* é um fungo sapróbio de rápido crescimento, que está envolvido na reciclagem de carbono e nitrogênio. Seu nicho ecológico natural é o solo, onde cresce em detritos orgânicos. Esta espécie possui colônia velutinosas em tons de verde turquesa a verde escuro e podem apresentar exudados incolores. Possui conídios globosos, verdes e equinulados, produzidos em cadeias basipetalmente a partir de phialides esverdeadas. É unisseriado e possui vesículas piriformes. É uma espécie termofílica, com crescimento ocorrendo em temperaturas de até 55°C e sobrevivência mantida a temperaturas até 70°C (SAMSON e VAN REENEN-HOEKSTRA, 1988).

O *Fusarium verticillioides* é um parasita não obrigatório e pode ser encontrado em solos de regiões tropicais, subtropicais e em solos de zonas temperadas úmidas e subúmidas (CHANG *et al.*, 2013). Esse fungo apresenta colônia pulverulenta e coloração violeta quando em meio batata-dextrose-ágar. Apresenta microconídios ovóides com base truncada, podendo ter um ou dois septos e os conidióforos originam-se na hifa, sendo escassamente ramificados. Os macroconídios, quando presentes apresentam-se fusiformes, quase retos, e de paredes finas e delicadas. As células basal e apical são alargadas e ligeiramente curvadas, podendo ter de três a cinco septos. Esta espécie não produz clamidósporos (BOOTH, 1971).

O *Penicillium citrinum* é um fungo filamentosos de ocorrência comum a nível mundial. Esta espécie já foi isolada a partir de vários substratos tais como solo, cereais (tropicais), especiarias e ambientes interiores (SAMSON *et al.* 2004). Possui colônias verde acinzentadas para azuladas, aveludadas, ocasionalmente com pequenas gotas de exsudado claro ou amarelo claro, e reverso amarelo-amarronzado, também apresenta pigmentos solúveis amarelos, conidióforos predominantemente biverticilados, estipes lisos e conídios lisos globosos a subglobosos.

As espécies isoladas, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium citrinum* estão presentes em praticamente todos os ambientes terrestres, esses gêneros são considerados comuns no solo (DOMSCH *et al.*, 1980). Segundo Wang *et al.* (2013) microrganismos selecionados a partir de solos contaminados são mais eficazes no metabolismo dos seus contaminantes do que os organismos obtidos a partir de outros locais não contaminados, o que demonstra que os microrganismos selecionados já apresentavam capacidade de resistência.

Bordjiba *et al.* (2001) realizaram o isolamento de fungos a partir de amostras de solos contaminados com agrotóxicos, coletadas próximo a Annaba na Argélia. As espécies mais frequentes e que não apresentaram sensibilidade a agrotóxicos foram os fungos *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Absidia corymbifera* e *Rhizopus microsporus*.

Alves e Orlanda (2003) selecionaram dez fungos potencialmente degradadoras de atrazina, os fungos do gênero *Aspergillus* apresentaram boa adaptação em meio contaminado com atrazina. Colla *et al.* (2008) concluíram em seu trabalho que fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* apresentaram elevada capacidade de crescimento em meios contendo 50 ppm de atrazina, indicando a possibilidade desses fungos serem usados em outros estudos de biorremediação de solos contaminados com agrotóxicos triazínicos.

Kodama *et al.* (2001) realizaram o isolamento de uma cepa de *Penicillium steckii* DS6F de uma amostra de solo de pomar de maçã no Japão, e testaram o crescimento do fungo em meio de cultura contendo somente simazine, um herbicida da classe das triazinas assim como a atrazina, o fungo foi capaz de utilizar o simazine como única fonte de carbono e nitrogênio.

Em um estudo realizado por Barbosa *et al.* (2013), os fungos *Curvularia* sp., *Aspergillus terreus*, *Trichoderma viridi*, *Penicillium* sp., *Aspergillus versicolor*, foram capazes de crescer em meio de cultura contaminado com glifosato, demonstrando a potencialidade desses fungos em degradar esse herbicida. Mattos *et al.* (2010) mediram o crescimento de colônias fúngicas em meio contendo o herbicida glifosato, foi observado o crescimento satisfatório dos microrganismos *Cochliobolus heterostrophus* e *Fusarium anthophilum*.

Demichelli *et al.* (2017) isolaram bactérias e fungos cultiváveis de amostras de solo com histórico de aplicação de glifosato, no município de Laranjeiras do Sul, Paraná. Oito dos fungos filamentosos potenciais degradadores desse herbicida foram identificados como pertencentes aos gêneros: *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Geotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., e *Rhizoctonia* sp.. Kremer *et al.* (2005) e Meriles *et al.* (2006) relataram uma grande frequência de colonização por *Fusarium* sp em solos contendo glifosato.

Krzyśko-Lupicka e Sudol (2008), em um experimento com fungos autóctones em solo tratado com solução aquosa de glifosato constataram que fungos do gênero *Fusarium* (*Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*) possuíam alta tolerância contra as doses aplicadas de glifosato (0,5 a 2,0 mM). Carranza *et al.* (2016) estabeleceram em seus estudos que cepas de *Aspergillus* isoladas de campos destinados à produção de milho e soja, localizados no sul de Córdoba, Argentina, podem se desenvolver *in vitro* na presença de glifosato, especialmente quando é usado como única fonte de fósforo ou nitrogênio.

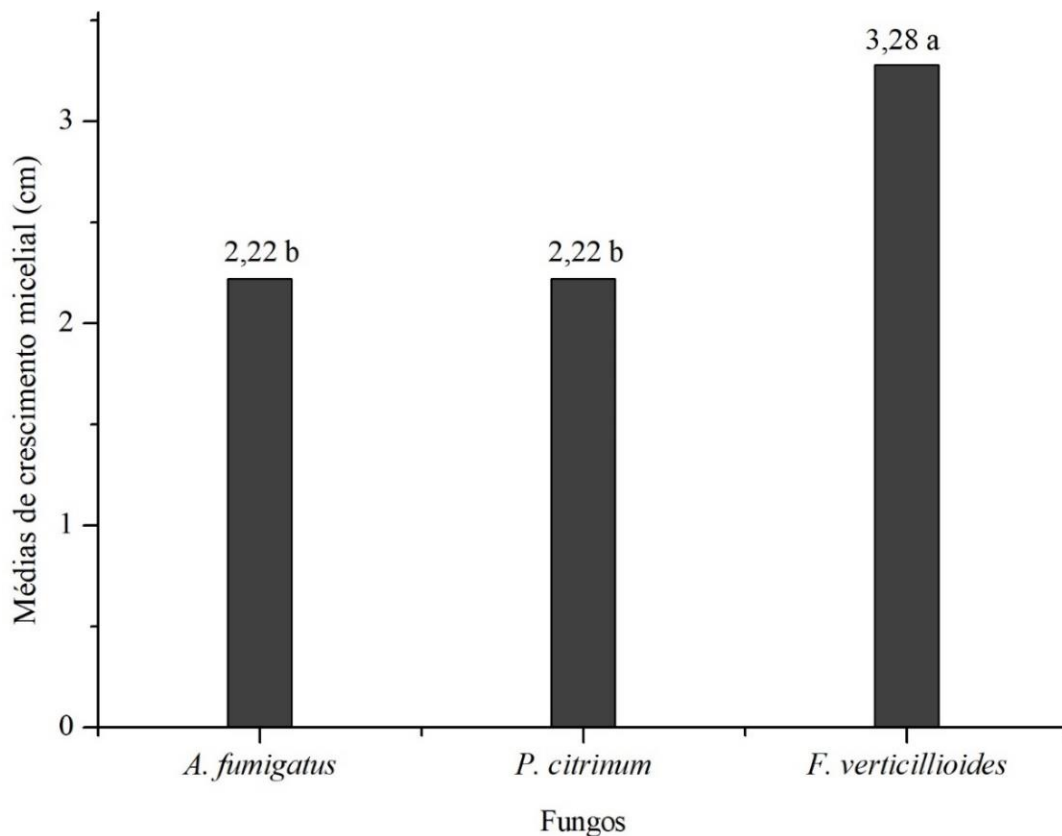
Roca *et al.* (2008) foram pioneiros em um estudo sobre a resistências de fungos basidiomicetos à pendimetalina, os autores isolaram 10 espécies fúngicas (*Agaricus bisporus*, *Agrocybe aegerita*, *Armillaria mellea*, *Fistulina hepática*, *Fomes fomentarius*, *Ganoderma australe*, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus*, *Polyporus varius*, *Schizophyllum commune*) de amostras de solos do sul da Itália. Esses microrganismos foram cultivados em

meios de cultura com 0, 100 e 500 ppm de pendimetalina e todos os fungos isolados exibiram uma certa tolerância à pendimetalina e o crescimento fúngico diminuiu com o aumento da concentração do herbicida, assim como ocorreu no presente estudo.

5.3 Aplicações do crescimento micelial fúngico em processos biotecnológicos em meio de cultura contaminado com atrazina, glifosato e pendimetalina

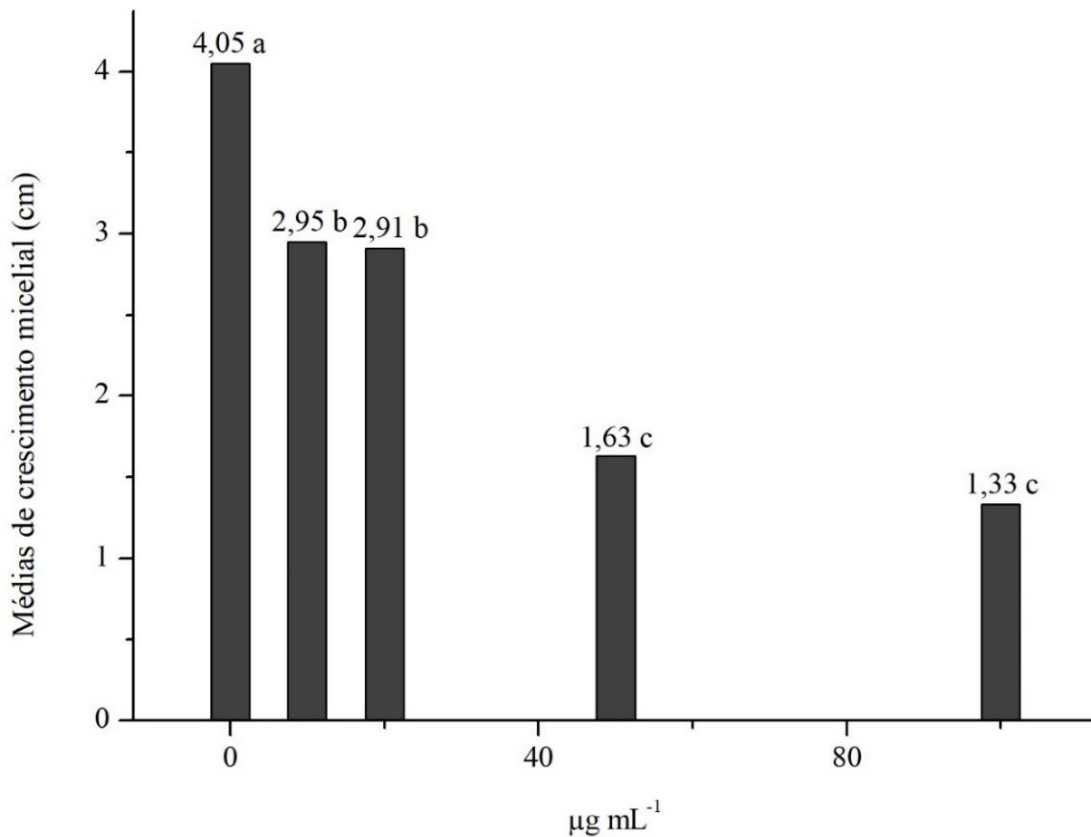
Em meio de cultura contaminado com atrazina, observou-se que *Fusarium verticillioide* diferiu de *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium citrinum* apresentando maior MCM (Figura 8). Na concentração $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ o crescimento foi de 4,05 cm, e nas concentrações 10 e $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ as médias foram 2,95 e 2,91 cm respectivamente (Figura 9).

Figura 8. Médias de crescimento micelial em meio de cultura contaminado com atrazina



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a $p < 0,05\%$

Figura 9. Médias de crescimento micelial nas concentrações 0, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de atrazina



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a $p < 0,05\%$

No desdobramento dos fungos dentro de cada nível de concentrações de atrazina, não houve diferença significativa na concentração 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium verticillioides* apresentaram MCM estatisticamente iguais em 0, 10 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. *Fusarium verticillioides* mostrou maior MCM em 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 8).

Tabela 8. Desdobramento dos fungos dentro de cada nível de concentrações de atrazina

| Fungos | Concentrações | | | | |
|---------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ |
| <i>A. fumigatus</i> | 3,88 a | 3,02 a | 2,70 a | 1,18 b | 0,32 b |
| <i>F. verticillioides</i> | 4,00 a | 3,58 a | 3,40 a | 2,56 a | 2,84 a |
| <i>P. citrinum</i> | 4,26 a | 2,26 b | 2,62 b | 1,16 b | 0,82 b |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a $p < 0,05\%$

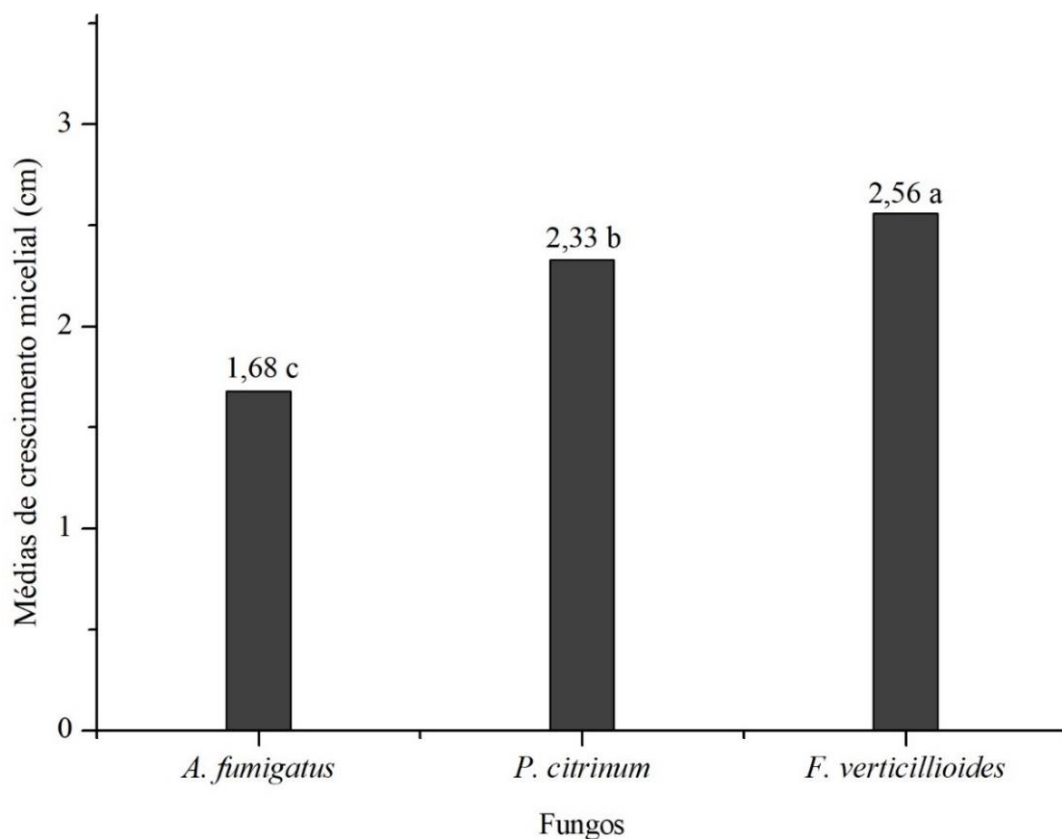
No desdobramento concentrações de atrazina dentro de cada nível de fungos, não houveram diferenças significativas em 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em 0, 10 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ *Fusarium verticillioides* apresentou MCM estatisticamente iguais, porém em 10 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ os fungos não diferiram entre si (Tabela 9).

Tabela 9. Desdobramento das concentrações de atrazina dentro de cada nível de fungos

| Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Fungos | | |
|---|---------------------|---------------------------|--------------------|
| | <i>A. fumigatus</i> | <i>F. verticillioides</i> | <i>P. citrinum</i> |
| 0 | 3,88 a | 4,00 a | 4,26 a |
| 10 | 3,02 b | 3,58 ab | 2,62 b |
| 20 | 2,70 b | 3,40 ab | 2,26 b |
| 50 | 1,18 c | 2,84 bc | 1,16 c |
| 100 | 0,32 d | 2,56 c | 0,82 c |

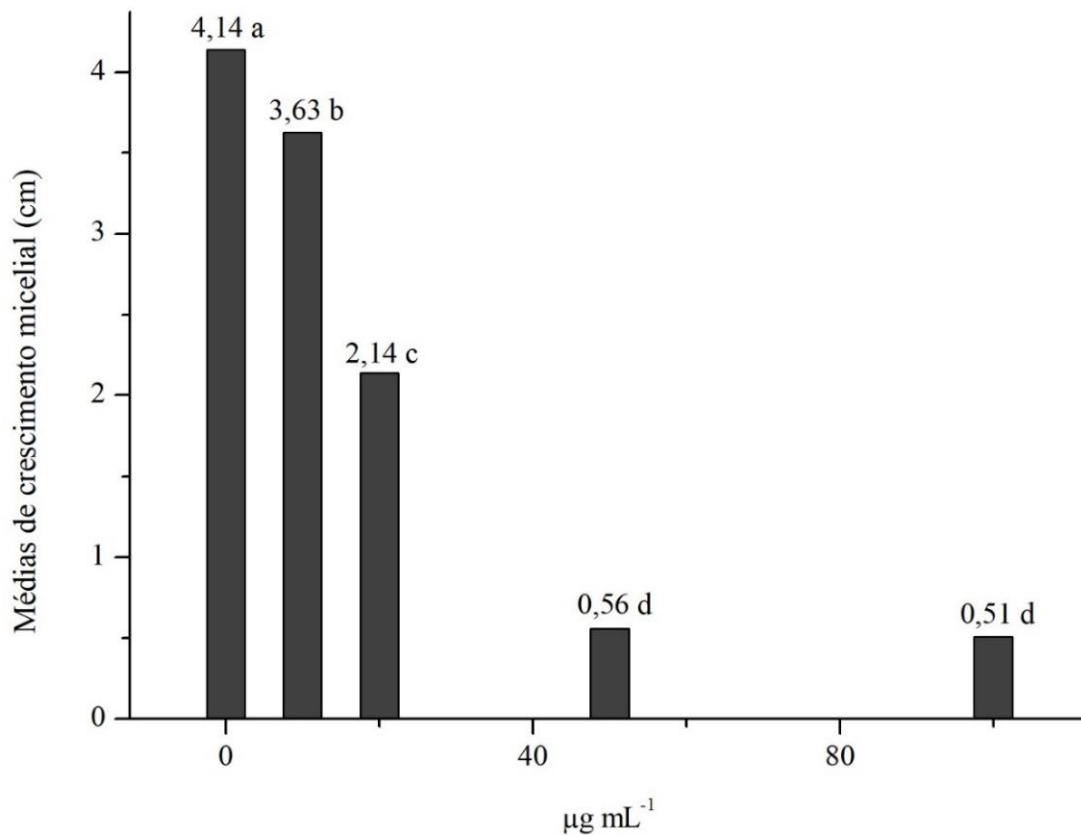
Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a $p < 0,05\%$

O fungo *Fusarium verticillioides* apresentou maior valor de MCM em meio de cultura contaminando com glifosato (Figura 10). Os melhores resultados para as MCM nas concentrações se deram em $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (2,56 cm) seguido da concentração $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (2,33 cm) (Figura 11).

Figura 10. Médias de crescimento micelial em meio de cultura contaminado com glifosato

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a $p < 0,05\%$

Figura 11. Médias de crescimento micelial nas concentrações 0, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de glifosato



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a $p < 0,05\%$

No desdobramento dos fungos dentro de cada nível de concentrações de glifosato, *Penicillium citrinum* apresentou maior MCM em 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, esse fungo também apresentou maior MCM em 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ao lado com *Fusarium verticillioides*, sendo estatisticamente iguais. Em 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ *Fusarium verticillioides* foi o único capaz de se desenvolver. (Tabela 10).

Tabela 10. Desdobramento dos fungos dentro de cada nível de concentrações de glifosato

| Fungos | Concentrações | | | | |
|---------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ |
| <i>A. fumigatus</i> | 3,88 a | 3,12 b | 1,42 b | 0,00 b | 0,00 b |
| <i>F. verticillioides</i> | 4,34 a | 2,90 b | 2,40 a | 1,52 a | 1,68 a |
| <i>P. citrinum</i> | 4,20 a | 4,86 a | 2,60 a | 0,00 b | 0,00 b |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a $p < 0,05\%$

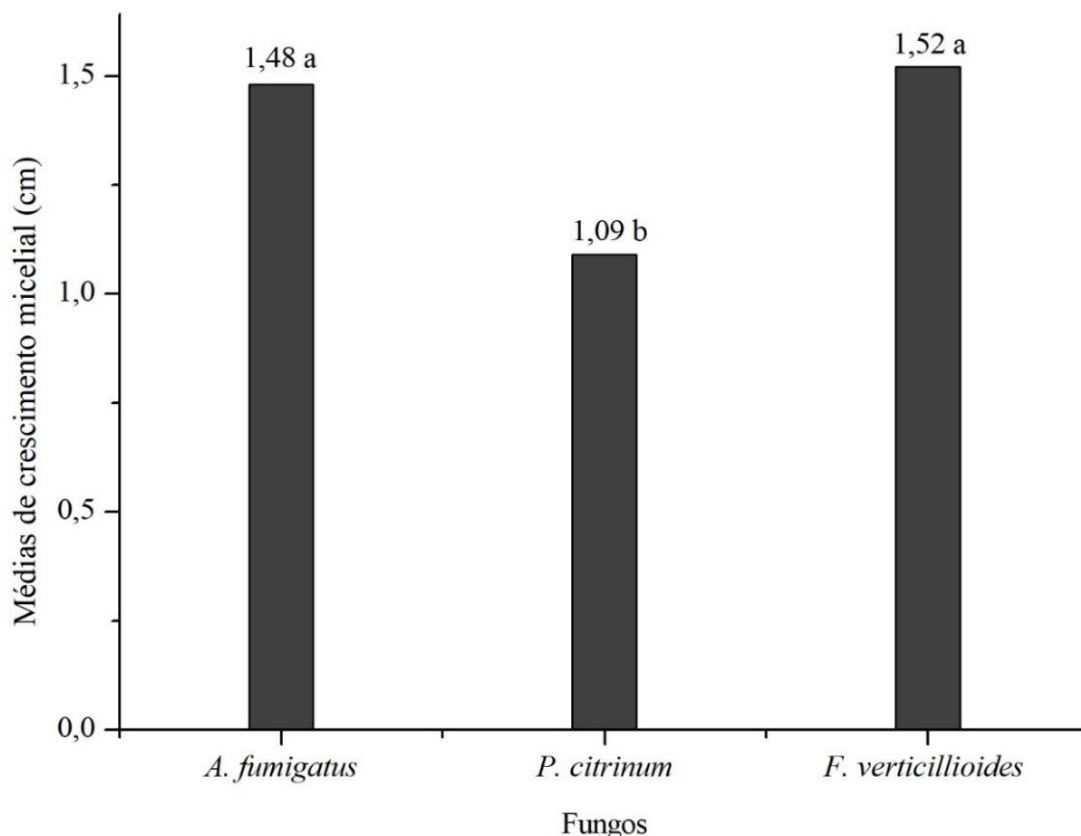
No desdobramento concentrações de glifosato dentro de cada nível de fungos, não houveram diferenças significativas em 0 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ *Fusarium verticillioides* apresentou maior MCM, esse fungo foi o único capaz de desenvolver-se em 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 11).

Tabela 11. Desdobramento das concentrações de glifosato dentro de cada nível de fungos

| Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Fungos | | |
|---|---------------------|---------------------------|--------------------|
| | <i>A. fumigatus</i> | <i>F. verticillioides</i> | <i>P. citrinum</i> |
| 0 | 3,88 a | 4,34 a | 4,86 a |
| 10 | 3,12 b | 2,90 b | 4,20 b |
| 20 | 1,42 c | 2,40 b | 2,60 c |
| 50 | 0,00 d | 1,68 c | 0,00 d |
| 100 | 0,00 d | 1,52 c | 0,00 d |

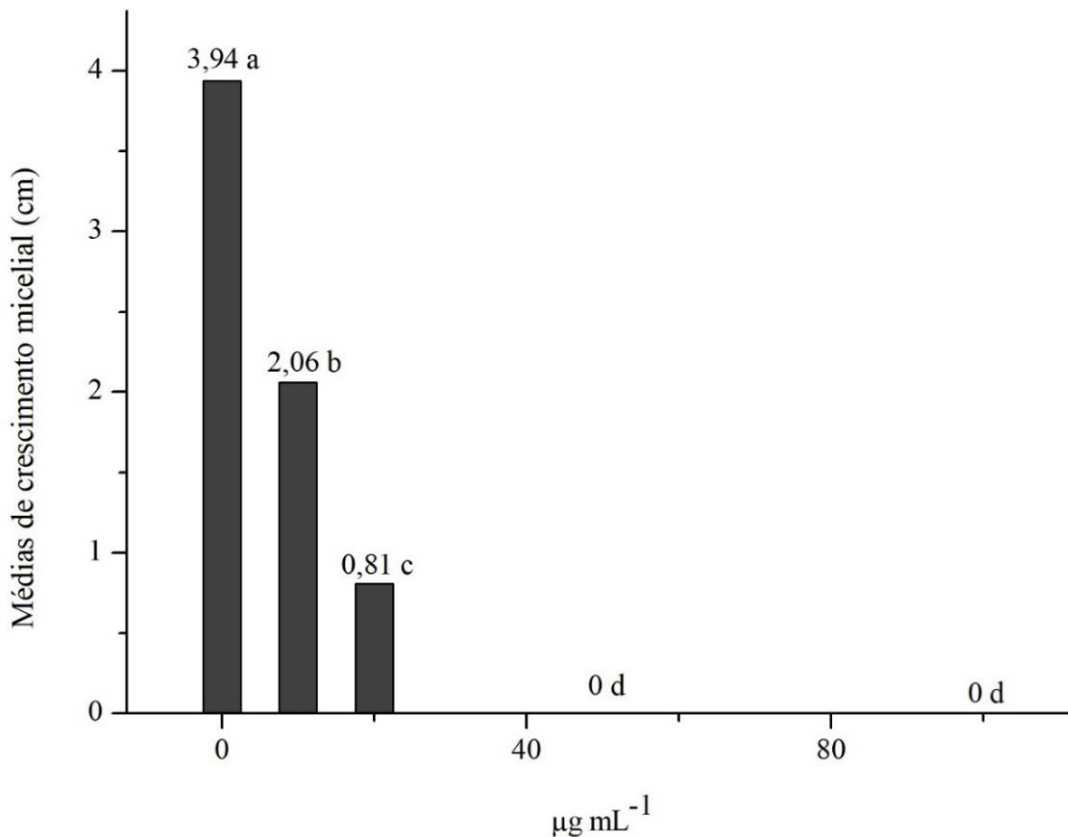
Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a $p < 0,05\%$

Em meio de cultura contaminado com pendimetalina, *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus fumigatus* apresentaram valores de MCM maiores e estatisticamente iguais, com 1,48 e 1,52 cm respectivamente (Figura 12). As MCM para as concentrações, foram mais acentuadas em $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (3,94) seguidas da concentração $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (2,06) (Figura 13).

Figura 12. Médias de crescimento micelial em meio de cultura contaminado com pendimetalina

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a $p < 0,05\%$

Figura 13. Médias de crescimento micelial nas concentrações 0, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de pendimetalina



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a $p < 0,05\%$

No desdobramento dos fungos dentro de cada nível de concentração de pendimetalina *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium verticillioides* apresentaram MCM estatisticamente iguais em 0, 10 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Não houve crescimento micelial em 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 12).

Tabela 12. Desdobramento dos fungos dentro de cada nível de concentrações de pendimetalina

| Fungos | Concentrações | | | | |
|---------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ |
| <i>A. fumigatus</i> | 3,80 a | 2,46 a | 1,32 a | 0,00 | 0,00 |
| <i>F. verticillioides</i> | 4,10 a | 2,20 a | 1,10 a | 0,00 | 0,00 |
| <i>P. citrinum</i> | 3,92 a | 1,52 b | 0,00 b | 0,00 | 0,00 |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a $p < 0,05\%$

No desdobramento das concentrações de pendimetalina dentro de cada nível de fungos, as maiores MCM se deram em 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, seguida de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os fungos não apresentaram MCM em 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Na concentração 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ *Penicillium citrinum* não se desenvolveu (Tabela 13).

Tabela 13. Desdobramento das concentrações de pendimetalina dentro de cada nível de fungos

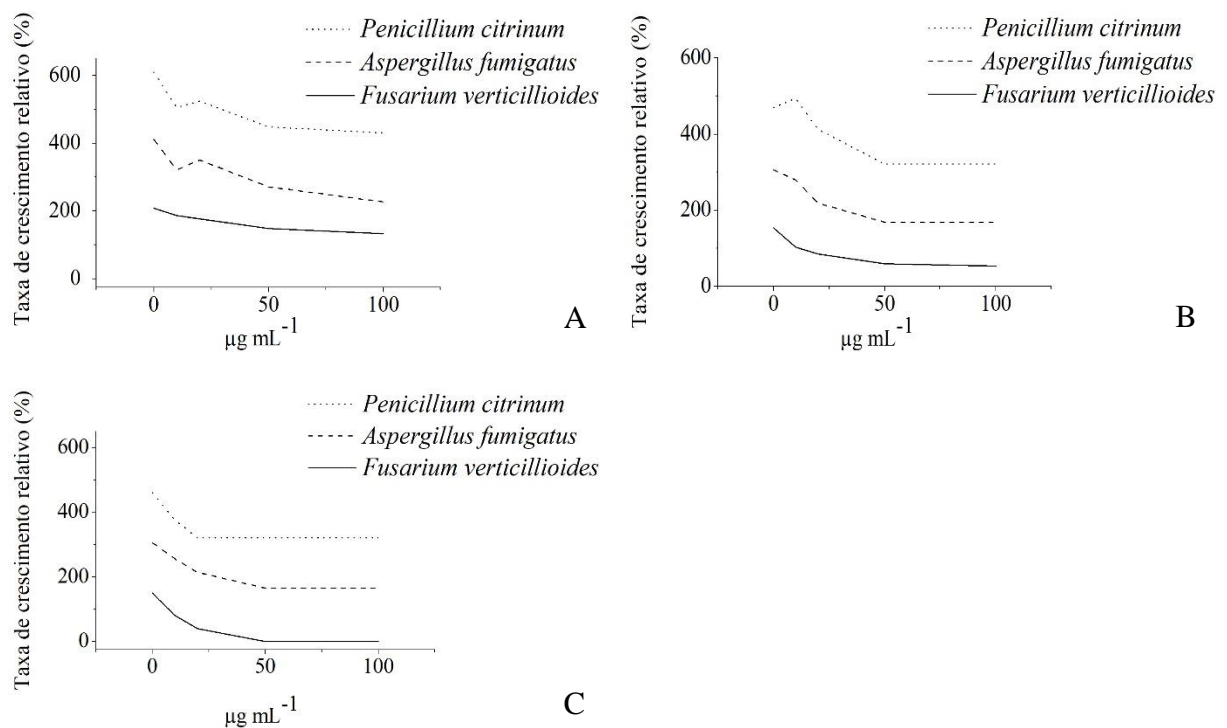
| Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Fungos | | |
|---|---------------------|---------------------------|--------------------|
| | <i>A. fumigatus</i> | <i>F. verticillioides</i> | <i>P. citrinum</i> |
| 0 | 3,80 a | 4,10 a | 3,92 a |
| 10 | 2,46 b | 2,20 b | 1,52 b |
| 20 | 1,32 c | 1,10 c | 0,00 c |
| 50 | 0,00 d | 0,00 d | 0,00 c |
| 100 | 0,00 d | 0,00 d | 0,00 c |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey a $p < 0,05\%$

5.3.1 Crescimento relativo

Os resultados das taxas de crescimento de relativo (TCR) demonstram que as MCM tendem a decrescer com o aumento da concentração dos herbicidas (Figura 14). A concentração $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ é a mais favorável para o crescimento dos fungos em meio de cultura contaminado com atrazina, exceto para *Fusarium verticillioides* que apresentou maior crescimento na concentração $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 14 A). A concentração $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ é a mais favorável para os microrganismos em meio de cultura contaminado com dos herbicidas glifosato e pendimetalina, conforme a Figura 14 B e Figura 14 C.

Figura 14. TCR (%) dos fungos em meio de cultura contaminado com atrazina, glifosato e pendimetalina nas concentrações 0, 10, 20, 50 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, após 3 dias de incubação

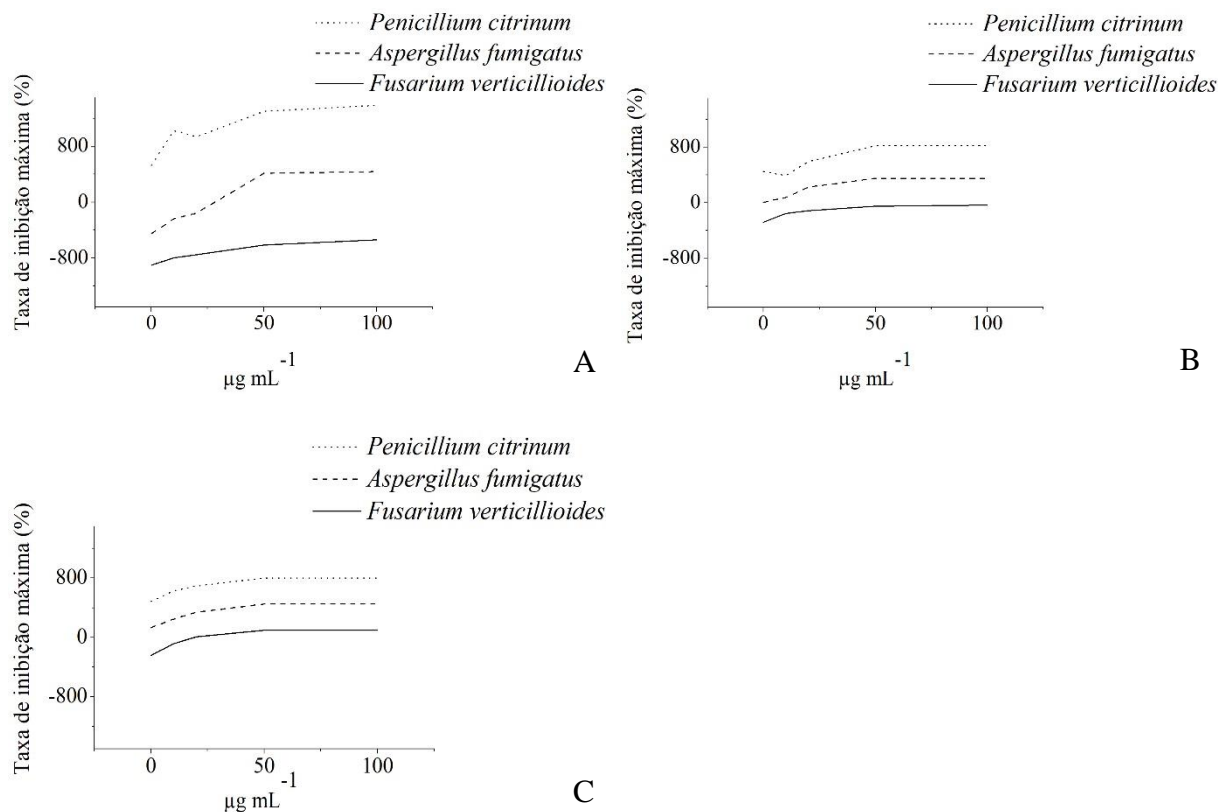


(A) TCR (%) dos fungos em meio de cultura contaminado com atrazina (B) TCR (%) dos fungos em meio de cultura contaminado com glifosato (C) TCR (%) dos fungos em meio de cultura contaminado com pendimetalina

5.3.2 Inibição máxima

Os resultados a seguir demonstram as taxas de inibição máxima (TIM), os sinais negativos indicam a estimulação do crescimento (Figura 15). Em meio de cultura contaminado com atrazina e glifosato, os fungos apresentaram TIM na concentração 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, observando-se o aumento da inibição do crescimento nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ conforme a Figura 15 A e Figura 15 B. Em meio de cultura contaminado com pendimetalina, a concentração com maior TIM foi a de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com inibição total de crescimento nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 15 C).

Figura 15. TIM (%) dos fungos em meio de cultura contaminado com atrazina, glifosato e pendimetalina nas concentrações 0, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, após 1 dia de incubação



(A) TIM (%) dos fungos em meio de cultura contaminado com atrazina (B) TIM (%) dos fungos em meio de cultura contaminado com glifosato (C) TIM (%) dos fungos em meio de cultura contaminado com pendimetalina

Nos estudos de biodegradação de xenobióticos por fungos, o crescimento micelial em meio de cultura contaminado é considerado uma ferramenta útil para estabelecer o possível potencial de biodegradação de cepas fúngicas (TAMILSELVAN *et al.*, 2014). Fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium*, têm ação sobre herbicidas e são capazes de degradá-los em taxas acima de 68% do produto aplicado (MOHAMED *et al.*, 2011). O fungo *Fusarium*

verticillioides apresentou bom crescimento para os três herbicidas neste trabalho, enquanto *Aspergillus fumigatus* apresentou maior MCM em meio contaminado com pendimetalina.

Sene *et al.* (2010) mostraram que fungos de solo como *Aspergillus spp.*, *Rhizopus spp.*, *Fusarium spp.* e *Penicillium spp.* tem a capacidade de degradar parcialmente a atrazina. Barberis *et al.* (2018) indicaram que as cepas de *Aspergillus oryzae* são tolerantes a altos níveis de atrazina, e pode ser considerada potencial agentes de biorremediação. Um fungo do mesmo gênero, *Aspergillus fumigatus*, apresentou tolerância a todas as concentrações de atrazina utilizados neste estudo, porém as concentrações 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos herbicidas glifosato e pendimetalina foram limitantes para o desenvolvimento desse microrganismo.

Krzyśko-Lupicka e Orlik (1997) utilizaram o herbicida glifosato como agente de seleção para isolar cepas fúngicas capazes de degradar esse composto, no estudo houve a predominância de *Mucor*, *Trichoderma* e *Fusarium* em meios contendo glifosato. No presente experimento, o fungo *Fusarium verticillioides* apresentou ótimo crescimento micelial na presença de glifosato, utilizando o herbicida como fonte de carbono.

Em meio de cultura ágar-glicose-czapek o glifosato exerceu um aumento significativo na contagem de fungos *Acremonium strictum*, *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium glabrum*, porém *Penicillium f uniculosum* foi completamente eliminado em placas com meio de cultura contaminado com 46 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de glifosato (ABDEL-MALLEK *et al.* 1993). O fungo *Aspergillus fumigatus* apresentou a menor MCM em meio contaminado com glifosato nesta pesquisa.

Em um estudo realizado por Pinto *et al.* (2012) os fungos *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus oryzae* foram capazes de remover pendimetalina de meio de cultura líquido, no mesmo estudo *Lecanicillium saksenae* removeu 99,5% desse herbida. Kulshrestha *et al.* (2000) obtiveram resultados semelhantes a Pinto *et al.* (2012), utilizando *Fusarium oxysporum* isolado de um solo de campo tratado com pendimetalina, em experimentos laboratoriais de cultura pura fungos dos gêneros citados. Fungos do mesmo gênero, *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium verticillioides*, apresentaram resultados satisfatórios neste estudo, porém o crescimento desses microrganismos foi limitado nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

5.4 Avaliação da atividade de degradação em microcosmos

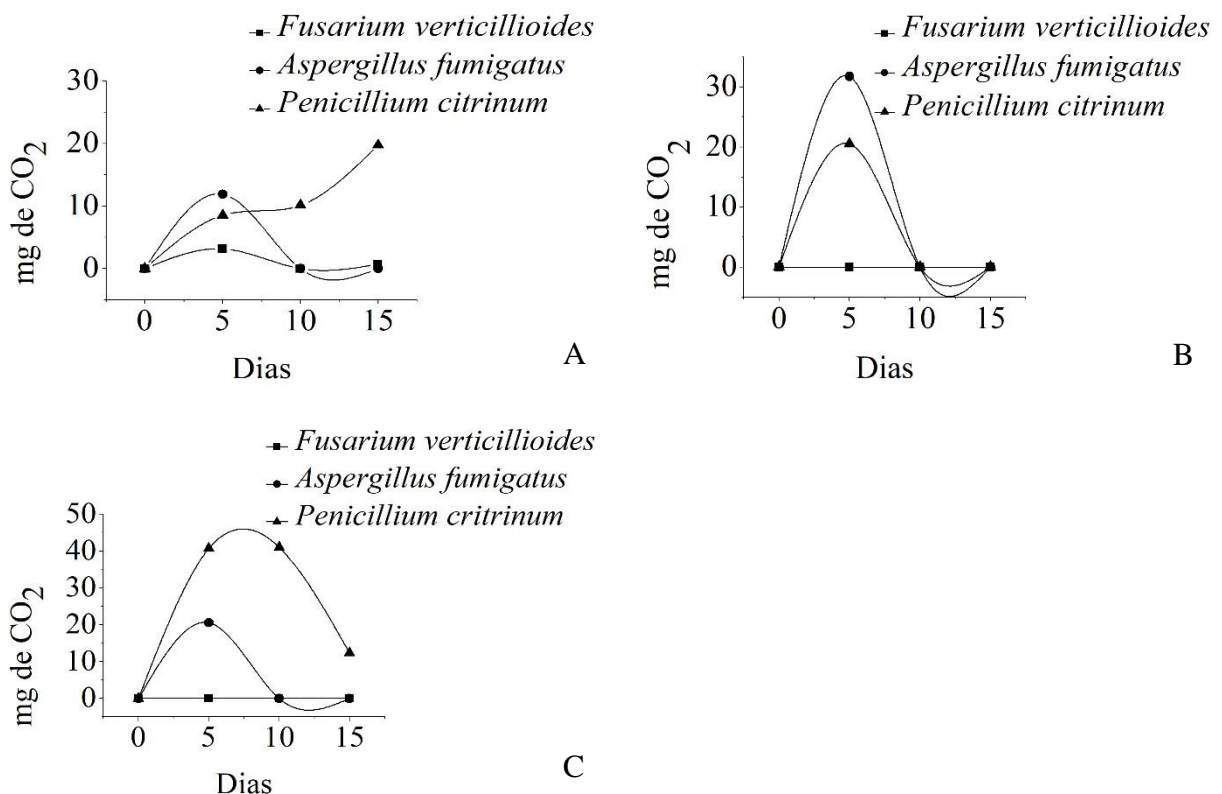
As curvas de crescimento microbiano demonstram que *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium citrinum* se adaptaram rapidamente nos microcosmos contaminados com atrazina e *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium citrinum* nos microcosmos contaminados com glifosato e pendimetalina (Figura 16). Durante a adaptação (fase lag), que

ocorreu no primeiro dia para todos os tratamentos, as células se encontraram em um estado de latência, porém com alta atividade metabólica. A partir do quinto dia as células dos fungos iniciaram o processo de divisão (fase log), sendo esse o período de maior atividade metabólica.

Entre cinco e 10 dias a velocidade de crescimento diminuiu (fase estacionária), nessa fase a morte celular equivale ao surgimento de células novas e a população microbiana se torna estável, porém a atividade metabólica decresce. A partir do décimo dia observou-se a fase de declínio com a morte dos microrganismos, essa fase continua até que a população tenha diminuído ou desaparecido totalmente, pois não há mais herbicida como fonte de carbono.

Nos microcosmos contaminados com atrazina *Penicillium citrinum* não apresentou declínio em 15 dias, o que indica que após esse período ainda havia atrazina ou produtos de degradação, entretanto, para que isso seja confirmado são necessários estudos posteriores (Figura 16 A). Não houve liberação de CO₂ por *Fusarium verticillioides* nos microcosmos contaminados com glifosato e pendimetalina, indicando que esse fungo não foi capaz de metabolizar esses herbicidas, como demonstrado na Figura 16 B e Figura 16 C.

Figura 16. Concentração de CO₂ evoluído pelos fungos em microcosmo com solo contaminado com 50 µg mL⁻¹ de atrazina, glifosato e pendimetalina após 5, 10 e 15 dias

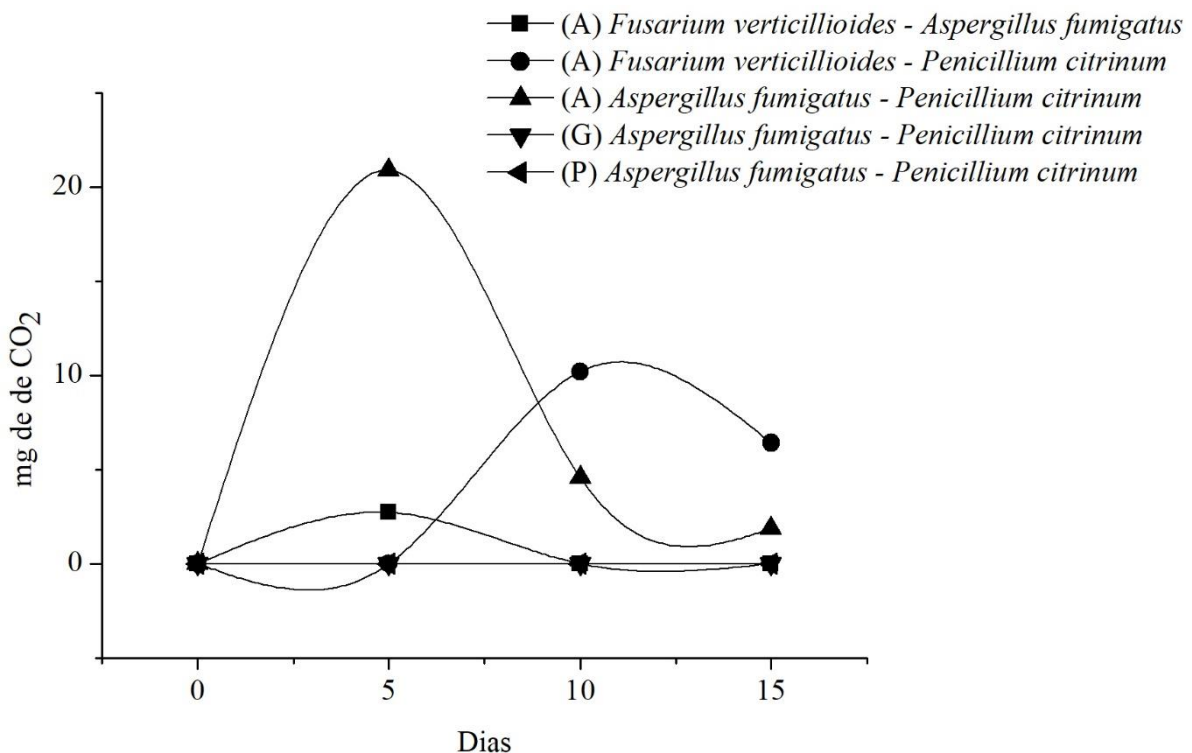


(A) Concentração de CO₂ evoluído pelos fungos em microcosmo com solo contaminado com atrazina (B) Concentração de CO₂ evoluído pelos fungos em microcosmo com solo contaminado glifosato (C) Concentração de CO₂ evoluído pelos fungos em microcosmo com solo contaminado com pendimetalina.

O fungo *Fusarium verticillioides* apresentou uma menor taxa de liberação de CO₂ para atrazina e não apresentou liberação de CO₂ para glifosato e pendimetalina, contrariando as análises de crescimento micelial em que esse microrganismo apresentou bom desempenho para os três herbicidas. Isso pode ter ocorrido pela alta concentração dos herbicidas nos microcosmos, já que 50 µg mL⁻¹ foi limitante para o desenvolvimento desse fungo em meio contendo glifosato e pendimetalina.

As curvas de crescimento microbiano apresentadas na figura 17, demonstram que após cinco, 10 e 15 dias os consórcios *Fv-Af*, *Fv-Pc* e *Af-Pc* inoculados nos microcosmos contaminados com atrazina apresentaram liberação de CO₂ indicando a biodegradação desse herbicida, *Af-Pc* apresentou maior taxa de CO₂. O consórcio *Af-Pc* não se mostrou eficiente na metabolização de glifosato e pendimetalina nos microcosmos, apresentando inibição de crescimento.

Figura 17. Concentração de CO₂ evoluído pelos consórcios fúngicos em microcosmo com solo contaminado com 50 µg mL⁻¹ com atrazina, glifosato e pendimetalina após 5, 10 e 15 dias



(A) Atrazina; (G) Glifosato; (P) Pendimetalina

Chen *et al.* (2015) avaliaram o efeito de duas concentrações de atrazina, dose recomendada (2 mg kg⁻¹ de solo) e cinco vezes a dose recomendada (10 mg kg⁻¹ de solo), sobre índices relacionados à comunidade bacteriana do solo, em microcosmos, durante 28 dias. Os resultados indicaram tendência de pequena redução na diversidade microbiana comparada aos

controles sem atrazina, porém houve aumentos tanto na mineralização de nitrogênio quanto na nitrificação em comparação com os controles (sem aplicação de atrazina).

Bonfleur *et al.* (2015) relataram que a aplicação de atrazina tendeu a reduzir temporariamente a biomassa microbiana e aumentar a mineralização de carbono do solo e o quociente metabólico da microbiota, indicando situação de estresse causada pela toxicidade da atrazina. Vryzas *et al.* (2007) observaram que a atrazina recentemente aplicada está acessível à degradação microbiana, porém, no estudo, o herbicida não foi completamente mineralizado e permaneceu associado ao solo na forma extraível. Nos estudos de Jablonowski *et al.*, (2009) na Alemanha, a atrazina e seus resíduos foram extraídos de solos mesmo depois de mais de duas décadas após a última aplicação deste herbicida.

A mineralização da atrazina por um único microrganismo é menor quando comparada com consórcio, empregando dois ou mais organismos (SENE *et al.*, 2010). Porém, Chirnside *et al.* (2009) comprovaram que após 160 dias um consórcio microbiano não foi capaz de mineralizar esse herbicida completamente.

Um comportamento semelhante foi observado no presente estudo, *Aspergillus fumigatus* e o consórcio *Fv - Pc* não foram capazes de metabolizar a atrazina completamente em 15 dias, assim como o fungo *Penicillium citrinum* nos microcosmos contaminados por pendimetalina. Esses dois herbicidas têm alta capacidade de sorção em solos, além disso, esse fato pode ser explicado pelo tempo em que ficaram incubados nos microcosmos, podendo não ter sido suficiente para a completa mineralização.

A atividade microbiana do solo tem papel fundamental na degradação do glifosato, determinando sua persistência no ambiente. Os solos com uma microbiota mais ativa, possibilitam uma dissipação mais rápida do herbicida aplicado. Em um estudo sobre a biodegradação do glifosato em dois tipos de solo (Podzólico vermelho-amarelo e Latossolo vermelho) durante 32 dias, Araújo (2002) observou aumento da atividade microbiana após a aplicação desse herbicida. Andréa *et al.* (2003) concluíram que biomineralização do glifosato diminuiu com o aumento de aplicações, indicando efeito desse herbicida sobre a atividade microbiológica do solo.

Busse *et al.* (2001) avaliaram a toxicidade de glifosato sobre a comunidade microbiana do solo e observaram que a atividade microbiana foi estimulada com a presença do composto, entretanto a respiração microbiana foi estimulada em altas doses do herbicida. Strange-Hansen *et al.* (2005) afirmaram que a degradação do glifosato no ambiente do solo é um processo cometabólico e a taxa de decomposição deve depender da atividade geral das populações microbianas, do tipo de solo e das condições ambientais.

Kočárek *et al.* (2015) em um estudo sobre a degradação de pendimetalina em um Chernossolo háplico, sob condições controladas, não observaram efeito algum da pendimetalina sobre a quantidade ou atividade dos microrganismos do solo. Mas foi observado que os fungos *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium citrinum* utilizaram esse herbicida como fonte de carbono nesta pesquisa.

Nayak *et al.* (1994), investigaram o efeito de pendimetalina nas populações de bactérias do solo, fungos e actinomicetos em solo franco-arenoso. Esse estudo concluiu que a pendimetalina reduziu os fungos do solo em 19%, após 25 dias.

Rodrigues (2013) utilizou fungos isolados de solos contaminados, sendo estes *Fusarium oxysporum*, *Lentinula edodes*, *Paecilomyces variotti* e *Trichoderma viride*, para remover os agrotóxicos pendimetalina, terbutilazina, difenoconazol e diflufeniçã de uma biomistura contaminada por esses agrotóxicos, a remoção de pendimetalina por *Fusarium oxysporum* foi de 99,7% da concentração inicial (70 mg Kg⁻¹ de solo) ao fim de 120 dias. A biomistura consistiu em 500 g de solo contaminado, 10 g de cortiça e os isolados fúngicos. A literatura apresenta poucos relatos sobre a degradação da pendimetalina por microrganismos do solo (VEENA *et al.*, 2010).

No presente estudo, os fungos *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium citrinum* foram capazes de mineralizar o glifosato em 15 dias, porém esses fungos consorciados tiveram um efeito de inibição nos microcosmos, o mesmo resultado foi observado para esse consórcio nos microcosmos na presença de pendimetalina.

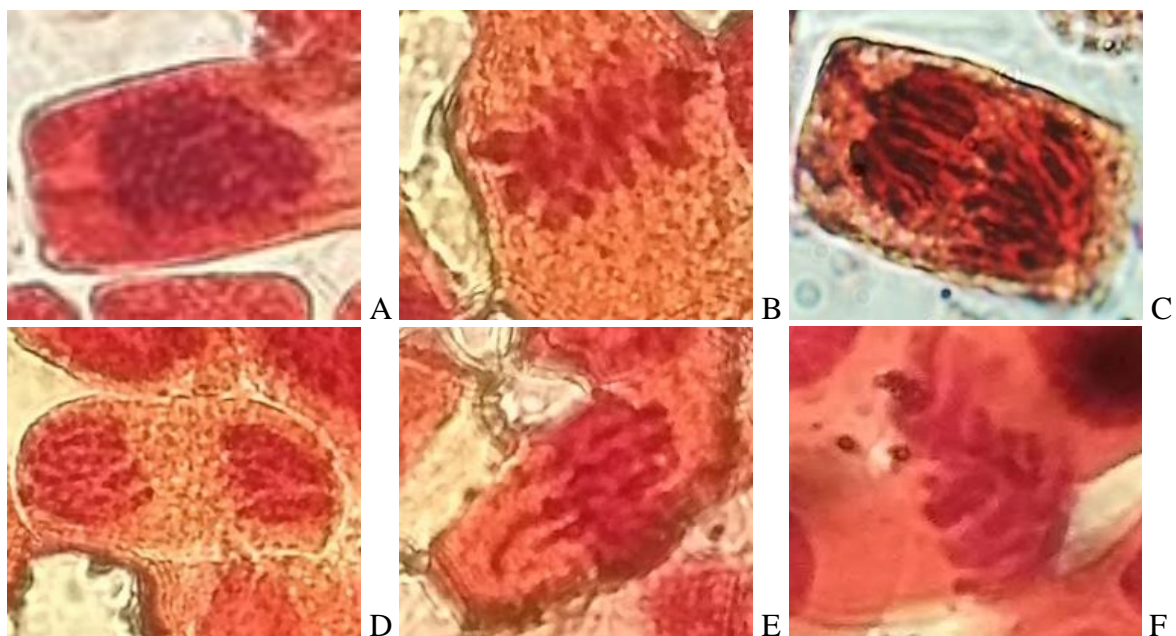
Uma hipótese para explicar tais resultados, seria que a aplicação de uma quantidade excessiva de nutrientes, no caso os herbicidas, sobre as necessidades metabólicas de microrganismos pode resultar na diminuição da atividade de biodegradação (NIKOLOUPOLOU e KALOGERAKIS, 2009). Porém, não houve inibição do crescimento dos fungos quando inoculados individualmente nos microcosmos, na mesma concentração dos herbicidas quando inoculados em consórcio.

O antagonismo entre esses fungos, pode ser considerado, pois provoca a inibição do crescimento. Segundo Pelczar Jr. (1996), em alguns casos as interações entre microrganismos são benéficas para uma ou mais espécies envolvidas; em outros, as interações podem ser inibitórias. Em competições microbianas por nutrientes disponíveis no solo, os microrganismos podem formar produtos metabólitos tóxicos, como enzimas e substâncias não-voláteis, que inibem o crescimento e o desenvolvimento de outros microrganismos (ORTIZ e ORDUZ, 2000). Isso pode ter ocorrido para o consórcio *Af-Pc*, no entanto, são necessários maiores estudos para entender o processo de antagonismo entre esses dois fungos.

5.5 Avaliação do teste de genotoxicidade com *Allium cepa*

A figura 18 apresenta as divisões e alterações celulares que ocorreram após à aplicação dos tratamentos. Foram observadas 12.500 células (250 células por unidade experimental) e ocorreu apenas divisão celular desorganizada na fase metáfase. Não foram encontradas ocorrências de alterações nas divisões celulares das células expostas aos elutriatos de solo na concentração $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos herbicidas. O ciclo celular foi analisado e os resultados obtidos para os tratamentos das células de *Allium cepa* expostas aos elutriatos de atrazina, glifosato e pendimetalina estão descritos nas tabelas 14, 15 e 16 respectivamente.

Figura 18. Divisões e alterações celulares em raízes de *Allium cepa* tratadas com elutriatos dos herbicidas atrazina, glifosato e pendimetalina



(A) Prófase normal (B) Metáfase normal (C) Anáfase normal (D) Telófase normal (E) Metáfase desorganizada (F) Metáfase desorganizada

Tabela 14. Células de *Allium cepa* expostas ao elutriato de solo contaminado com atrazina

| Tratamentos | T <i>Fv-Af</i> | <i>Fv-Af</i> | T <i>Fv-Pc</i> | <i>Fv-Pc</i> | T <i>Af-Pc</i> | <i>Af-Pc</i> |
|----------------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|
| Interfase | 780 | 898 | 796 | 839 | 795 | 822 |
| Prófase | 432 | 319 | 438 | 391 | 430 | 397 |
| Metáfase | 12 | 9 | 4 | 11 | 8 | 11 |
| Anáfase | 17 | 11 | 7 | 3 | 10 | 10 |
| Telófase | 9 | 13 | 5 | 6 | 7 | 10 |
| Total de células | 1250 | 1250 | 1250 | 1250 | 1250 | 1250 |
| Alterações celulares | 0 | 6 | 0 | 5 | 0 | 6 |
| IM (%) | 37,6 | 28,2 | 36,3 | 29,1 | 36,4 | 34,2 |
| OAC (%) | 0 | 1,8 | 0 | 1,4 | 0 | 1,3 |

T (testemunha). *Fv-Af* (*Fusarium verticillioides* - *Aspergillus fumigatus*). *Fv-Pc* (*Fusarium verticillioides* - *Penicillium citrinum*). *Af-Pc* (*Aspergillus fumigatus* - *Penicillium citrinum*)

Tabela 15. Células de *Allium cepa* expostas ao elutriato de solo contaminado com glifosato

| Tratamento | T <i>Af-Pc</i> | <i>Af-Pc</i> |
|----------------------|----------------|--------------|
| Interfase | 805 | 827 |
| Prófase | 408 | 396 |
| Metáfase | 18 | 7 |
| Anáfase | 12 | 9 |
| Telófase | 7 | 11 |
| Total de células | 1250 | 1250 |
| Alterações celulares | 0 | 3 |
| IM (%) | 35,6 | 33,8 |
| OAC (%) | 0 | 0,7 |

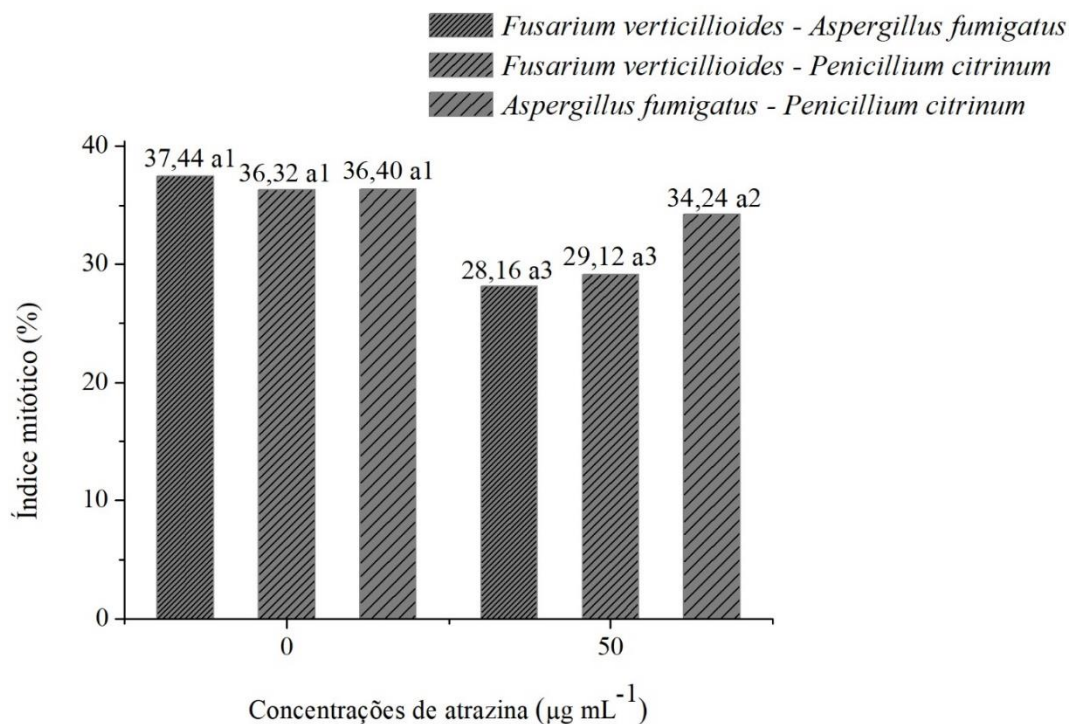
T (testemunha). *Af-Pc* (*Aspergillus fumigatus* + *Penicillium citrinum*)

Tabela 16. Células de *Allium cepa* expostas ao elutriato de solo contaminado com pendimetalina

| Tratamento | T <i>Af-Pc</i> | <i>Af-Pc</i> |
|----------------------|----------------|--------------|
| Interfase | 806 | 855 |
| Prófase | 415 | 375 |
| Metáfase | 12 | 3 |
| Anáfase | 9 | 10 |
| Telófase | 8 | 7 |
| Total de células | 1250 | 1250 |
| Alterações celulares | 0 | 7 |
| IM (%) | 35,5 | 31,6 |
| OAC (%) | 0 | 1,8 |

T (testemunha). *Af-Pc* (*Aspergillus fumigatus* + *Penicillium citrinum*)

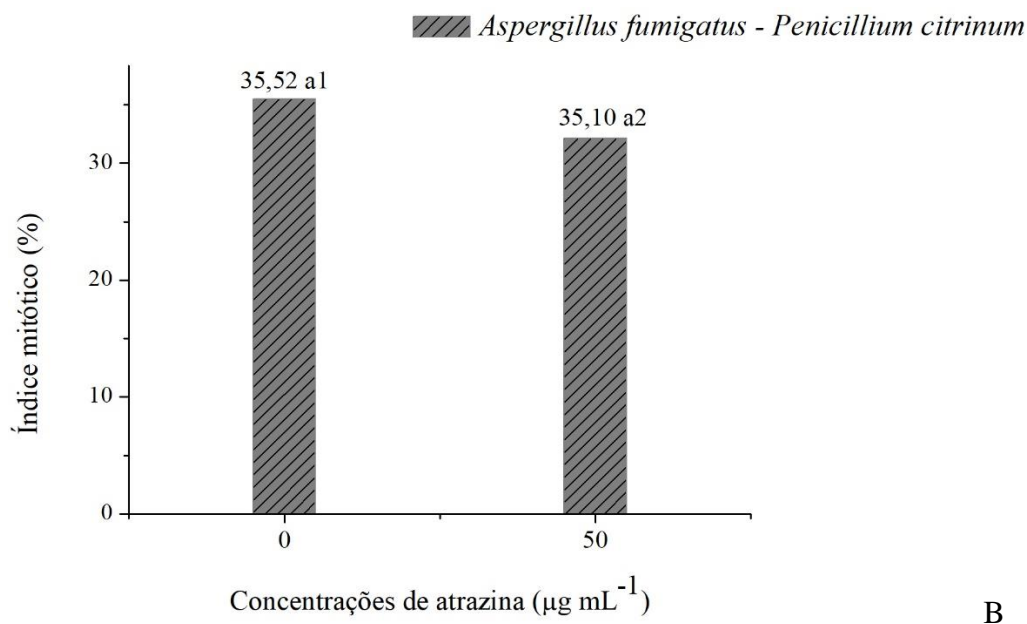
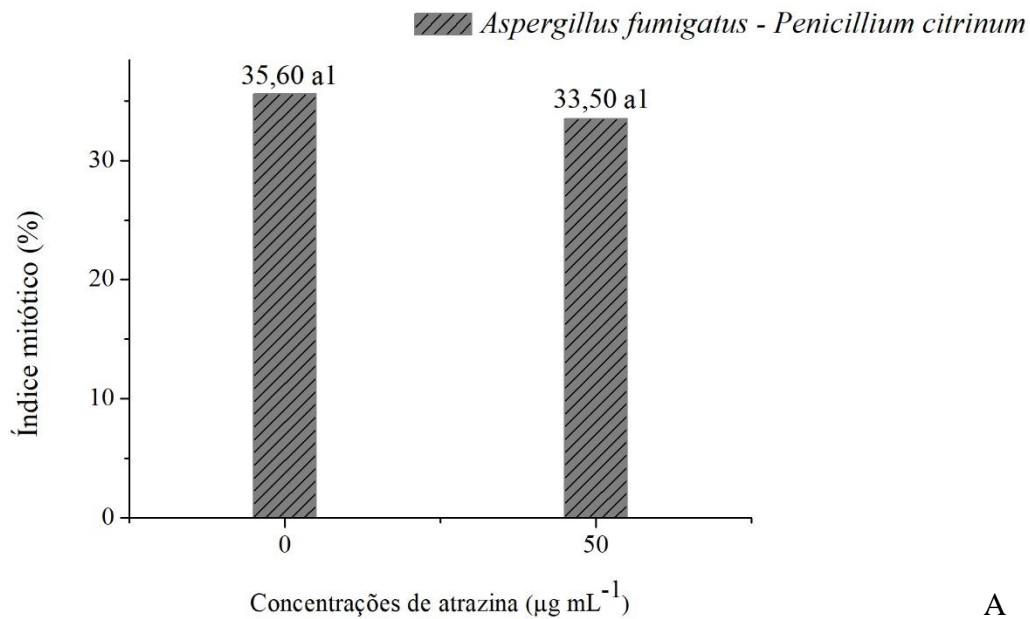
Houve diferença significativa entre os tratamentos para IM das células expostas ao elutriato de solo contaminado com atrazina (Figura 19). Observa-se que em $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ os IM foram maiores que nos tratamentos com $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Há uma diminuição da divisão celular ao aumentar a concentração, o que indica que o herbicida interferiu na proliferação celular.

Figura 19. Médias do índice mitótico (%) das células expostas ao elutriato de solo contaminado com atrazina nas concentrações 0 e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, após 24 horas

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Fisher a $p < 0,05\%$

O IM das células expostas ao elutriato de solo contaminado com glifosato e tratado com o consórcio *Af-Pc* demonstra que não houve a influência do herbicida (Figura 20 A). Os resultados para os tratamentos com raízes de *Allium cepa* expostas ao elutriato de solo contaminado com pendimetalina e tratado com o consórcio *Af-Pc*, indicam que o herbicida foi capaz de interferir na proliferação celular, pois o teste mostrou-se significativo (Figura 20 B).

Figura 20. Médias do índice mitótico (%) das células expostas ao elutriato de solo contaminado com glifosato e pendimetalina nas concentrações 0 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, após 24 horas



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Fisher a $p < 0,05\%$

(A) Médias do IM (%) das células expostas ao elutriato de solo contaminado com glifosato (B) Médias do IM (%) das células expostas ao elutriato de solo contaminado com pendimetalina

Não foi possível realizar o teste estatístico para a ocorrência de alteração celular (OAC) nas raízes de *Allium cepa* que estiveram expostas ao elutriado dos herbicidas, tendo em vista que não houve OAC na concentração $0 \mu\text{g mL}^{-1}$, como era esperado, porém na concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi observado alterações celulares para os três herbicidas.

A OAC variou nos tratamentos para o elutriado contaminado com atrazina, a OAC foi menor para as células expostas ao elutriado contaminado com glifosato e tratado com o consórcio *Af-Pc*. O índice de OAC para o elutriado contaminado com pendimetalina e tratado com *Af-Pc* foi igual ao índice encontrado no tratamento com o consórcio *Fv-Af* na presença de atrazina (Tabelas 14, 15 e 16).

Os herbicidas apresentam capacidade de interferir diretamente na divisão celular de plantas, no alongamento e/ou na diferenciação celular, causando distúrbios no funcionamento das raízes ou dos tecidos vasculares. Já nos animais, os herbicidas podem atuar em diversos tecidos ou órgãos, estando, muitas vezes, associados a processos tumorigênicos (NATARAJAN, 2002).

Segundo Cotelle *et al.* (1999), o teste de *Allium cepa* promove um diagnóstico rápido sobre reações causadas por herbicidas. Há indícios de severa inibição no índice mitótico de células de *Allium cepa*, quando estas são submetidas ao solo contaminado por vários metais pesados e herbicidas. Alguns herbicidas têm uma ação comprovada na indução de efeitos clastogênicos e aberrações cromossômicas em testes com *Allium cepa*.

Em um estudo realizado por Bolle *et al.* (2004) a atrazina produziu um aumento relacionado à concentração no número total de aberrações cromossômicas em células de *Allium cepa*, detectando atraso no índice mitótico em relação a testemunha e alterações celulares nas concentrações acima 5 g L^{-1} , que são provavelmente concentrações encontrada em um local comum de contaminação por atrazina. Estes dados estão de acordo com estudos em que 3 g L^{-1} de atrazina causaram heterogeneidade cromossômica em células (RAYBURN *et al.*, 2001). O índice mitótico encontrado nos tratamentos com atrazina, no presente estudo, também apresentaram atraso comparado a testemunha.

Srivastava e Mishra (2009) em um estudo sobre os efeitos citogenéticos do herbicida atrazina, nas concentrações 15, 30 e 60 mg L^{-1} , em células meristemáticas das raízes de *Allium cepa* e *Vicia faba* observaram que após 24 horas de exposição das raízes ao herbicida houve a inibição do índice mitótico e a formação de micronúcleos em ambos os sistemas testados, também houve o aumento das aberrações cromossômicas.

Ainda citando Srivastava e Mishra (2009), o número de aberrações aumentou com o aumento da concentração de atrazina, para *Allium cepa*, a porcentagem das aberrações foram

4,33% para 15 mg L⁻¹, 5,33% para 30 mg L⁻¹ e 6,43% para 60 mg L⁻¹, valores altos comparados as ocorrências de alteração celulares apresentados no presente estudo e o índice mitótico foi de 5,2% para 15 mg L⁻¹, 5,9% para 30 mg L⁻¹ e 7,1% para 60 mg L⁻¹.

Após 24 horas, as células de *Allium cepa* utilizadas nesta pesquisa, também apresentaram alterações celulares, porém em menor índice em comparação ao trabalho citado, o que indica que os consórcios fúngicos degradaram a atrazina quase que completamente, pois ainda houve ocorrência de alteração celular, porém em níveis baixos.

Segundo ANVISA (2005), ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade têm sido negativos para glifosato. A baixa toxicidade dessa molécula pode ser devida à sua modalidade bioquímica de ação em um caminho metabólico nas plantas, chamado mecanismo do ácido chiquímico, similar ao existente em alguns microrganismos (SILVA *et al.*, 2005a). Giesy *et al.* (2000) verificaram que o glifosato quando utilizado nas doses recomendadas não causa alterações sobre a microbiologia do solo.

Em contrapartida, estudos observaram uma alta genotoxicidade do glifosato em diversos organismos, como plantas (ALVAREZ-MOYA *et al.*, 2011). Efeitos tóxicos e genotóxicos do glifosato foram descritos para células de *Allium cepa* por Krüger (2009). Barzotto *et al.* (2017) encontraram um aumento significativo de anormalidades nas fases anáfase e telófase, relacionadas com o aumento das concentrações de glifosato, bem como uma significativa redução no índice mitótico nas concentrações de 130 µl L⁻¹ e 260 µl L⁻¹, quando comparados aos resultados das cebolas do controle.

Neste trabalho o índice mitótico nas células tratadas com o elutriato contaminado com glifosato e tratado com o consórcio *Af-Pc*, não apresentaram diferenças significativas e a ocorrência de alteração celular foi baixa, confirmando os resultados das pesquisas realizadas pela ANVISA (2005), por Silva *et al.* (2005a) e por Giesy *et al.* (2000).

Não foram encontrados trabalhos avaliando o efeito citotóxico da pendimentalina. No entanto, Tomlin (2011) afirma que esse herbicida quando absorvido por raízes e folhas, inibe a divisão celular e o alongamento celular. A ocorrência da alteração celular para o tratamento com o elutriato contaminado com pendimentalina e tratado com o consórcio *Af-Pc* foi alta entre os tratamentos, como não houve a mineralização desse composto nos microcosmos, visto que não houve a liberação de CO₂ pelo consórcio, supõe-se que a pendimentalina causou alterações nas células analisada.

6 CONCLUSÕES

Dos fungos isolados, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium citrinum* mostram-se resistentes e aptos à degradação dos herbicidas atrazina, glifosato e pendimetalina.

O fungo *Fusarium verticillioides* apresenta maior média de crescimento micelial em meio de cultura contaminado com atrazina, nas concentrações 10 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e glifosato, na concentração 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Em meio de cultura contaminado com pendimetalina os fungos *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus fumigatus* apresentam as maiores médias de crescimento micelial e o crescimento é mais acentuado em 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Nos experimentos em microcosmos, os consórcios *Fusarium verticillioides* e *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium citrinum* e, *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium citrinum* apresentam capacidade de metabolizar o herbicida atrazina, porém, *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium citrinum* demonstra maior eficiência.

Nos microcosmos contaminados com glifosato e pendimetalina, o consórcio *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium citrinum* apresenta inibição de crescimento e não se mostra eficiente para metabolizar esses herbicidas.

No teste de genotoxicidade, observa-se atraso no índice mitótico das células de *Allium cepa* expostas ao elutriado de solo contaminado com atrazina e pendimetalina na concentração 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, após o experimento em microcosmos. As células expostas ao elutriado de solo contaminado com glifosato na concentração 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e tratado com o consórcio *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium citrinum* não apresentam atraso no índice mitótico.

Foram encontradas apenas divisão celular desorganizada na fase metáfase das células expostas aos elutriados de solo na concentração 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos três herbicidas. As alterações ocorridas foram consideradas baixas, indicando que há a degradação de parte dos herbicidas.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MALLEK, A. Y.; ABDEL-KADER, M. I. A.; SHONKEIR, A. M. A. Effect of glyphosate on fungal population, respiration and the decay of some organic matters in Egyptian soil. **Microbiological Research**, 149(1), 69–73, 1994.
- ABNT. Resíduos em solos - **Determinação da biodegradação pelo método respirométrico**. ABNT/NBR 14.283. Projeto 01:603.06-007:1997. Rio de Janeiro, RJ, 1999, p.8.
- ALFENAS. A. C.; ZAUZA. E. A. V.; MAFIA. R. G. Produção. Determinação e Calibração da Concentração de Inóculo em Suspensão. In: ALFENAS. A. C.; Mafia. R. G. (Ed.). **Métodos em fitopatologia**, Vicçosa: UFV. 2007, p. 103-116.
- ALVAREZ-MOYA, C.; REYNOSO SILVA, M.; VALDEZ RAMÍREZ, C.; GÓMEZ GALLARDO, D.; LEÓN SÁNCHEZ, R.; CANALES AGUIRRE, A.; FERIA VELASCO, A. Comparison of the in vivo and in vitro genotoxicity of glyphosate isopropylamine salt in three different organisms. **Genetics and Molecular Biology**, 37(1), 105–110, 2014
- ALVES. E. W. S.; ORLANDA. J. F. F. Screening de fungos rizosféricos com capacidade de degradação do herbicida atrazina. **Arquivo Brasileiro de Microbiologia Básica e Aplicada**. Volume 1. N2. 2013. Disponível em: <<https://pt.slideshare.net/flaviohfb/artigo-abmba-v1n2201305>> Acesso em: 19 fev. 2018.
- ANDRÉA, M. M.; PERES, T. B.; LUCHINI, L. C.; BAZZARIN, S.; PAPINI, S.; MATALLO, M. B.; SAVOY, V. L. T. Influence of repeated applications of glyphosate in its persistence and soil bioactivity. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.11, p.1329-1335, 2003.
- ANDREU, V.; PICÓ, Y. Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. **Trends in Analytical Chemistry**, 23, 772-789, 2004.
- ANVISA. **Agrotóxicos**. Brasília: ANVISA, 2005. p. 25-58. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm> > Acesso em: 10 jan. 2018.
- ANDRADE. J. A.; AUGUSTO. F.; JARDIM. I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética química**, v.35, n.3, p.17- 43. São Paulo, 2010.
- APPLEBY. A.P.; DAWSON. J.H. Microbial and non-microbial breakdown of herbicides in soil. In: **Intensive course on the activity, selectivity, behavior, and fate of herbicides in plants and soils**. West Lafayette. USA: Purdue University. Departments of Horticulture. Agronomy. Botany and Plant Pathology. and Forestry and Natural Resources. 1994, p. 446-462.
- ARAUJO. A. S.; MONTEIRO. R. T.; ABARKELI. R. B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. **Chemosphere**, Oxford. v.52, n.52, p.799-804, 2003.

ARAÚJO, A. S. F. **Biodegradação, extração e análise de glyphosate em dois tipos de solos.** Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002, 72 p.

ARNOLD, W. A. **Investigation of the abiotic reduction of the herbicides trifluralin and pendimethalin.** Disponível em: <<https://www.wrc.umn.edu/projects/ag-impacts/investigation-abiotic-reduction-herbicides-trifluralin-and-pendimethalin>> Acesso em: 13 dez. 2018.

ATAGANA. H. I.; HAYNES. R. J.; WALLIS. F. M. Fungal Bioremediation of creosote contaminated soil: a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 172, p. 201-219, 2006.

BAMFORTH. S.; SINGLETON. I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Sussex. v.80, n.7, p.723-736, 2005.

BARBERIS, C. L.; CARRANZA, C. S.; MAGNOLI, K.; BENITO, N.; MAGNOLI, C. E. Development and removal ability of non-toxicogenic *Aspergillus* section Flavi in presence of atrazine, chlorpyrifos and endosulfan. **Revista argentina de microbiologia**, pii: S0325-7541(18)30032-4, Jun. 6, 2018.

BARBOSA, N. P. S.; NASCIMENTO, I. V.; SILVA, P. S. B.; CAVALCANTE, D. L. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo manejado com herbicidas. **Cadernos de Agroecologia**, [S.l.], v. 8, n. 2, ISSN 2236-7934, dez, 2013

BARZOTTO, A.C.; VANINI, J.; BUSIN, C.S. Avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade do Glifosato em *Allium cepa*. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 38, n. 1 - Supl 1, p. 98, maio/jun. 2017.

BENTO. F. M.; CAMARGO. F. A. O.; OKEKE. B.; FRANKENBERGER. W. T. Bioremediation approaches for soil contaminated with diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo v. 34, n. 1, p. 65-68, 2003.

BOLLAG. J. M.; LIU. S. Y. **Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling.** In: CHENG. H. H. (Ed). Soil Science Society of America book series. Am: Madison, n. 2, p. 169, 1990.

BOLLE, P.; MASTRANGELO, S.; TUCCI, P.; EVANDRI, M. G. Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 43(2), 137–141, 2004.

BONFLEUR, E. J.; TORNISIELO, V. L.; REGITANO, J. B.; LAVORENTI, A. The Effects of Glyphosate and Atrazine Mixture on Soil Microbial Population and Subsequent Impacts on Their Fate in a Tropical Soil. **Water Air Soil Pollut**, 226:21, 2015.

BONONI, V.L.R.; GRANDI, R.A.P (Eds) **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas.** Instituto de botânica, São Paulo, SP. 1998, p. 68-105.

BOOPATHY, R. Factors Limiting Biorremediation Technologies. **Bioresource Technology**, Los Angeles, v. 74, p. 63-67, 2000.

BOOTH, C. **The genus *Fusarium***. Commonwealth Mycological Institute. GB, Kew, 1971, 231 p. 1971.

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**, [S.l.], v. 30, p. 418- 426, 2001.

BRASIL. **Decreto nº 4.074. de 4 de janeiro de 2002**. Diário Oficial da União. Brasília. DF. 08 jan. 2002. p1. Disponível em:
<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm> Acesso em: 20 jan. 2019.

BRASIL. **Portaria ANVISA nº 03. de 16 de janeiro de 1992**. Diário Oficial da União. Brasília. DF. 16 jan. 1992. Disponível em:
<http://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/fitossanidade/JOAQUIMGONCALVESMA CHADONETO/port_%200392_anvisa_class_toxicol.pdf> Acesso em: 19 fev. 2018.

BUSSE, M. D.; RATCLIFF, A. W.; SHESTAK, C. J.; POWERS, R. F. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.33, p.1777-1789, 2001.

CARNEIRO, F.F.; PIGNATI, W.A.; RIGOTTO, R.M.; AUGUSTO, L.G.S.; RIZZOLO, A.; MULLER, N.M.; ALEXANDRE, V.P.; FRIEDRICH, K. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: **Abrasco**, pt. 188 p., 2012.

CARRANZA, C. S.; BARBERIS, C. L.; CHIACCHIERA, S. M.; MAGNOLI, C. E. Assessment of growth of *Aspergillus* spp. from agricultural soils in the presence of glyphosate. **Revista Argentina de Microbiología**, 49(4), 384, 2017.

CHANDER, M.; ARORA, D. S.; BATH, H. K. Biodecolourisation of some industrial dyes by white-rot fungi. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 31. n. 2, p. 94-97, 2004.

CHANG, S.C.; MACÊDO, D.P.C.; SOUZA-MOTTA, C.M.; OLIVEIRA, N.T. Use of molecular markers to compare *Fusarium verticillioides* pathogenic strains isolated from plants and humans. **Genetics and Molecular Research**, 12 (3): 2863-2875, 2013.

CHEN. M.; XU. P.; ZENG. G.; YANG. C.; HUANG. D.; ZHANG. J. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. petroleum. pesticides. chlorophenols and heavy metals by composting: Applications. microbes and future research needs. **Biotechnology Advances**, v. 33, p.745–755, 2015.

CHIRNSIDE, A. E. M.; RITTER, W. F.; RADOSEVICH, M. Biodegradation of Aged Residues of Atrazine and Alachlor in a Mix-Load Site Soil by Fungal Enzymes. Applied and Environmental. Volume 2011, Article ID 658569, 10 p., **Soil Science**, 2011.

CHELINHO, S.; MOREIRA-SANTOS, M.; LIMA, D.; SILVA, C.; VIANA, P.; ANDRÉ, S.; LOPES, I.; RIBEIRO, R.; FIALHO, A. M.; VIEGAS, C. A.; SOUSA, J. P. Cleanup of atrazine-contaminated soils: ecotoxicological study on the efficacy of a bioremediation tool with *Pseudomonas* sp. ADP. **Journal of Soils and Sediments**, v. 10, p. 568 - 578, 2010.

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. In: **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v. 32, n. 3, p. 809-813. maio/jun., 2008.

COLLINA, E.; BESTETTI, G.; DI GENNARO, P.; FRANZETTI, A.; GUGLIERSI, F.; LASAGNI, M.; PITEA, D. Naphthalene biodegradation kinetics in an anaerobic slurryphase bioreactor. **Environment International**. p. 167-171, 2005.

COSTA, E. M. B.; OLIVEIRA, V.; PIMENTA, F. C. Citocromos P450 e Biotransformação Microbiana. **Revista de Patologia Tropical**, 33, 21-31, 2004.

COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S. T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. Mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Ecotoxicol e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 15, p.65-72, 2005.

CORREIA, F. V.; LANGENBACH, T. Dinâmica da distribuição e degradação de atrazina em argissolo vermelho-amarelo sob condições de clima tropical úmido. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 1, p. 183-192, 2006.

CRAPEZ, M. A. C.; BORGES, A. L. N.; BISPO, M. G. S.; PEREIRA, D. C. Biorremediação: Tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**. v. 32, n. 179, p. 32-37, 2002.

COTELLE, S.; MASFARAUD, J.F., FÉRARD, J.F. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia* - micronucleus and the *Tradescantia* - micronucleus assays. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 426, p. 167-171, 1999.

DEMICHELLI, F. N.; MOURA, G. S.; FRANZENER G.; BITENCOURT, T. B.; PASSOS, C. T.; CAZAROLLI, L. H. Caracterização de microrganismos isolados de solo contaminado com Glifosato na região sul do Brasil. **Cadernos de Agroecologia**, ISSN 2236-7934 – Anais do VI CLAA, X CBA e V SEMDF – Vol. 13, N° 1, Jul. 2018.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. **Compendium of soil fungi**, Academic Press, New York, 859p. 1980.

ELLIS, L. B.; HOU, B.K.; KANG, W.; WACKETT, L. P. The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: post-genomic data mining. **Nucleic Acids Research**, Jan 1;31(1):262-5, 2003.

FERRI, M. V. W.; VIDAL, R. A.; FLECK, N. G.; CASSOL, E. A.; GOMES, P. A. Lixiviação do herbicida acetoclor em solo submetido à semeadura direta e ao preparo convencional. **Pesticidas: Revista Ecotoxicológica e Meio Ambiente**, Curitiba. v. 13, n. 2, p. 147-156, 2003.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, vol.38. n.2. p. 109-112. 2014.

FISKESJÖ, G. The *Allium cepa* test in wastewater monitoring. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v.8, p.291-298, 1993.

FREITAS, L. A., RAMBO, C. L., FRANSCESCON F., BARROS, A. F. P., LUCCA, G. S., SIEBEL, A. M., SCAPINELLO, J., LUCAS, E. M., DAL MAGRO. J. Coal extraction causes sediment toxicity in aquatic environments in Santa Catarina, Brazil. **Revista Ambiente & Água**, vol. 12 n. 4 Taubaté – Jul. / Aug. 2017.

GARRETT, B. C.; DIXON, D.A.; CAMAIONI, D.M.; CHIPMAN, D. M.; JOHNSON, M.A. ZWIER, T. S. Role of water in electron-initiated process and radical chemistry: issues and scientific advances. **Chemical Review**, v.105, p.355-389, 2005.

GALLEGO, J.L.R.; MARTINEZ, M.J.G.; LLAMAS, J.F.; BELLOCH, C.; PELÁEZ, A.I; SANCHÉZ, J. Biodegradation of oil tank bottom sludge using microbial consortium. **Biodegradation**, v.18, n 3, p. 269-281, 2007.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação - Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília. v. 8, n. 34, p. 36-43, 2005.

GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.167, n.1, p.35-120, 2000.

GEVAO. B; SEMPLE. K. T.; JONES. K. C. Bound pesticide residues in soils: a review. **Environmental Pollution**, Barking. v. 108, p. 3-14, 2000.

GHIDEY, F.; BLANCHARD, P.E.; LERCH, R.N.; KITCHEN, N.R.; ALBERTS, E.E.; SADLER, E. J. Measurement and simulation of herbicide transport from the corn phase of three cropping systems. **Journal of Soil and Water Conservation**, 60(5):260-273, 2005.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 1991p. 2002.

IBAMA. **Portaria normativa nº 84. de 15 de outubro de 1996**. Publicada no D.O.U. de 18/10/96 e republicada no Diário Oficial da União. Brasília. DF. 23 out. 1996. Disponível em: <https://servicos.ibama.gov.br/ctf/manual/html/Portaria_84.pdf> Acesso em: 20 fev. 2018.

IBAMA. **Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos: E.2 - Teste para a avaliação da mobilidade**. IBAMA: Brasília DF, 1990.

INMET, Instituto Nacional de Meteorologia. **Estações automáticas**, Imperatriz – Maranhão. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/sonabra/pg_dspDadosCodigo_sim.php?QTiyNQ==> Acesso em: 18 dez. 2018.

JACQUES, R. J. S.; SILVA, K. J.; BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 280 – 287, 2010.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1192 – 1201, 2007.

JABLONOWSKI, N. D.; KÖPPCHEN, S.; HOFMANN, D.; SCHÄFFER, A.; BURAUDEL, P. Persistence of ¹⁴C-labeled atrazine and its residues in a field lysimeter soil after 22 years. **Environmental Pollution**, 157. 2126-2131, 2009.

KHAN, F. I.; HUSAIN, T.; HEJAZI, R. An overview and analysis of site remediation technologies. **Journal of Environmental Management**, 71: 95–122, 2004.

KHINDARIA, A.; GROVER, T.A.; AUST, S.D. Reductive dehalogenation of aliphatic halocarbons by lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **Environmental Science Technology**, v. 29, p.719-725, 1975.

KOČÁREK, M.; ARTIKOV, H.; VOŘÍŠEK, K.; BORŮVKA, L. Pendimethalin Degradation in Soil and Its Interaction with Soil Microorganisms. **Soil and Water Research**, 2015.

KODAMA, T.; DING, L.; YOSHIDA, M.; YAJIMA, M. Biodegradation of an s-triazine herbicide, simazine. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, [S.l.], v. 11, n. 4/6, p. 1073-1078, 2001.

KOSKINEN, W.C.; HARPER, S.S. The retention process: mechanisms. In: Cheng, H.H. (Ed.). **Pesticides in the soil environment: processes, impacts, and modeling**. Madison. EUA: Soil Science Society of America, 1990, p. 51-77.

KREMER, R.J.; MEANS, N.E. & KIM, S. Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere microorganisms. Intern. **Journal of Environmental Analytical Chemistry**, 85:1165-1174, 2005.

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

KRZYŚKO-LUPICKA, T., & ORLIK, A. The use of glyphosate as the sole source of phosphorus or carbon for the selection of soil-borne fungal strains capable to degrade this herbicide. **Chemosphere**, 34(12), 1997.

KRZYŚKO-LUPICKA, T., SUDOL, T. Interactions between glyphosate and autochthonous soil fungi surviving in aqueous solution of glyphosate. **Chemosphere**, 71, 1386-1391. 2008.

KULSHRESTHA, G.; SINGH, S.B.; LAL, S.P.; YADURAJU, N.T. Effect of long-term field application of pendimethalin: enhanced degradation in soil. **Pest Management Science**, 56: 202–6. 2000.

LEONEL, L. V.; NASCIMENTO, E. G.; BERTOZZI, J.; VILAS BÔAS, L. A.; VILAS BÔAS, G. T. Biorremediação do solo. **Terra e cultura**, n. 51, ano 26, Jul a Dez, 2010.

LIMA, D. F.; OLIVEIRA, O. M. C.; CRUZ, M. J.M. utilização dos fungos na biorremediação de substratos contaminados por petróleo: Estado da arte. **Cadernos de Geociências**, v. 8, n. 2, nov 2011.

MAPA. Agrofit - **Relatório Consolidado de Ingredientes Ativos** 11-JUL-16 17:40:21. Disponível em < <http://dados.contraosagrototoxicos.org/dataset/agrofit/resource/d7f067c1-2349-45b6-987f-f23e0f413a02>> Acesso em: 13 mar. 2019.

MARIANO, A. P.; ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. Monitoramento de indicadores geoquímicos e avaliação de biodegradação em área contaminada com óleo diesel. **Engenharia Sanitária Ambiental**, Rio de Janeiro. v. 12, n. 3, p. 296-304, 2007.

MATTOS, M. L. T.; PERALBA, M. do C. R.; VERNETTI JUNIOR, F. de J.; SANTOS, I. B. Metodologia para Obtenção de Fungos Degradadores do Herbicida Glifosato, 24p. **Embrapa Clima Temperado**, 2010.

MELO, M.M. **Produção de esporos e inoculação de *Corynespora cassiicola* em soja**. 76p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo. 2009. Disponível em: < <http://www.ppgagro.upf.br/download/marciamuliterno.pdf>> Acesso em: 20 fev. 2018.

MENDES FILHO, P.F.; VASCONCELLOS, R.L.F.; PAULA, A.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Evaluating the potential of forest species under microbial management of the restoration of degraded mining areas. **Water, Air, & Soil Pollution**, v.208. n.1/4, p.79-89, 2010.

MERILES, J. M.; VARGAS GIL, S.; HARO, R. J.; MARCH, G. J.; GUZMÁN, C. A. Glyphosate and previous crop residue effect on deleterious and beneficial soil-borne fungi from a peanut - corn - soybean rotations. **Journal of Phytopathology**, v. 154, n. 5, p. 309-316, 2006.

MOHAMED, A. T.; EL HUSSEIN, A. A.; EL SIDDIG, M. A.; OSMAN, A. G. Degradation of oxyfluorfen herbicide by soil microorganisms biodegradation of herbicides. **Biotechnology**, v. 109, p. 274-279, 2011.

MOLLEA, C.; BOSCO, F.; RUGGERI, B. Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies. **Chemosphere**, v. 60. N. 5, p. 636 – 643, 2005.

MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade**. 1 Ed.. Lavras: UFLA, 2010, 368 p.

MORENO-MATEOS, D.; MELI. P.; VARA-RODRÍGUEZ, M.I.; ARONSON. J. Ecosystem response to interventions : lessons from restored and created wetland ecosystems. **Journal of Applied Ecology**, v. 52. n. 6, p. 1528–1537, 2015.

NATARAJAN, A.T. Chromosome Aberrations: past, present and future. **Mutation Research**, Leiden, v. 504, p. 3-16, 2002.

NAYAK, B.S.; PRUSTY, J.C.; MONHANTY, S.K. Effect of herbicides on bacteria, fungi and actinomycetes in sesame (*Sesamum indicum*) soil. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, 64: 888–890, 1994.

NOBLES, M.K. Identification of cultures of wood-inhabiting. Hymenomycetes. **Canadian Journal of Botany**. v. 43, p. 1097-1139, 1975.

NOBRE, M. M.; NOBRE, R. C. M. – Remediação de solos – Técnicas que melhoram o desempenho. **Revista Química e Derivados**, Disponível em: <<https://www.quimica.com.br/remediacao-de-solos-tecnicas-alternativas-melhoram-desempenho/>> Acesso em: 30 jan. 2018.

OH, S.M; SHIM, S.H; CHUNG, K.H. Antiestrogenic action of atrazine and its major metabolites in vitro. **Journal of Health Science**, v. 49, n. 1, p. 65-71, 2003.

OLIVEIRA, M. F. Comportamento de herbicidas no ambiente. In: OLIVEIRA JR.. R. S.; CONSTANTIN. J. (Ed.). **Plantas daninhas e seu manejo**, Guaíba: Agropecuária. 2001. v.1, cap. 10, p. 315-362.

OLIVEIRA, JR. R. S.; REGITANO. J. B. Dinâmica de pesticidas no solo. In: MELO. V. F.; ALLEONI. L. R. F. (Ed.). **Química e mineralogia do solo: aplicações**. Viçosa. MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Parte II, 2009, p. 187-248.

ORTIZ, A.; ORDUZ, S. In vitro evaluation of Trichoderma and Gliocladium antagonism against the symbiotic fungus of the leaf - cutting ant *Atta cephalotes*. **Mycopathologia**, v. 150, n.2, p. 53 – 60, 2000.

PELCZAR JR., J.M.; CHAN, E.C.S. & KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**, Vol.1, 2a ed. São Paulo, Makron Books, 1996.

PEREIRA, A. R. B.; FREITAS, D. A. F. Uso de microorganismos para a biorremediação de ambientes impactados. **Revista eletrônica em gestão, educação e tecnologia ambiental**, Santa Maria, v. 6, n. 6, p. 975-1006, 2012.

PERES, F. Os desafios da construção de uma abordagem metodológica de diagnóstico rápido da percepção de risco no trabalho. pp. 251-282. In F Peres & JC Moreira (orgs.). **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos. saúde e ambiente**. 1Ed.. Fiocruz, Rio de Janeiro, 2003.

PINTO, A. P.; SERRANO, C.; PIRES, T.; MESTRINHO, E.; DIAS, L.; TEIXEIRA, D. M.; ALDEIRA, A. T. Degradation of terbuthylazine, difenoconazole and pendimethalin pesticides by selected fungi cultures. **Science of The Total Environment**, 435-436, 2012.

PROCÓPIO, S. O.; SANTOS, J. B.; PIRES, F. R.; SILVA, A. A.; SANTOS, E. A.; FERREIRA, L. R. Potencial de espécies vegetais para a remediação do herbicida trifloxysulfuron-sodium. **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 9 - 16, 2005.

PROCÓPIO, S. O.; PIRES, F. P.; SANTOS, J. B.; SILVA, A. A. Fitorremediação de solos com resíduos de herbicidas. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 32p. (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros. ISSN 1678-1953; 53), 2009.

- PROSEN, H. Fate and determination of triazine herbicides in soil (Cap. 3). In: HASANEEN. M. N. A. E. (Ed.). **Herbicides – Properties. Synthesis and Control of Weeds**, Rijeka: Intech. p. 43-58, 2012.
- RAMAKRISHNA, M.; MOHAN, S. V.; SHAILAJA, S.; NARASHIMA, R.; SARMA, P. N. Identification of metabolites during biodegradation of pendimethalin in bioslurry reactor. **Journal of hazardous materials**, 151, 658-661 2008.
- RAYBURN, A.L.; BOUMA, J.; NORTHCOTT, C.A. Comparing the clastogenic potential of atrazine with caffeine using Chinese hamster ovary (CHO) cells. **Toxicology Letters**, 121:69–78, 2001.
- REGINATTO, C.; THOMÉ. A.; COLLA, L. M.; CECCHIN. I. Biorremediação de um solo Argiloso contaminado com uma mistura de diesel e biodiesel através da Bioventilação. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, Paraná. v. 14, n. 1, p. 43-58, 2012.
- RODRÍGUEZ-LIÉBANA, J. A.; ELGOUZI, S.; MINGORANCE, M. D.; CASTILLO, A.; PEÑA, A. Irrigation of a Mediterranean soil under field conditions with urban wastewater: Effect on pesticide behavior. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, 185, 176-185. 2014.
- RODRIGUES, S. C. C. **Degradação dos pesticidas terbutilazina, difenoconazol, diflufenicão e pendimetalina por microrganismos selecionados**. Relatório de Estágio de Licenciatura em Bioquímica. Universidade de Évora, Évora, 1-55. 2013.
- ROCA, E.; D'ERRICO, E.; IZZO, A. STRUMIA, S.; ESPOSITO, A.; FIORENTINO, A. In vitro saprotrophic basidiomycetes tolerance to pendimethalin. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Volume 63, Issue 2, Pages 182-186, March 2009.
- ROMANTSCHUK, M.; SARAND, I.; PETÄNEN, T.; PELTOLA, R.; JONSSONVIHANNE. M.; KOIVULA, T.; YRJÄLÄ, K.; HAAHTELA, K. Means to Improve The Effect of In Situ Bioremediation of Contaminated Soil: an overview of novel approaches. **Environmental Pollution**, 107:179- 185, 2000.
- ROSE, T. J.; CLAASSENS, A.; SCANLAN, C.; VAN ZWIETEN. L.; ROSE. M. T. Glyphosate residues in Australian soils and implications for crop growth. **Proceedings of the 18th Australian Society of Agronomy Conference**, 24 – 28 September 2017, Ballarat, Australia, 2017.
- SAMSON, R.A.; FRISVAD, J.C. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. **Studies in Mycology**, 49:1–266, 2004.
- SAMSON, R. A.; VAN REENEN-HOEKSTRA, E.S. **Introduction to food-borne fungi**. Baarn, Delft, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1988.
- SANTOS, J. S. **Remediação de solos contaminados com agrotóxicos pelo tratamento com radiação gama**. 63 p. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear). USP, São Paulo, SP, 2009.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. Cap. 8 In SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI. **Engenharia Bioquímica**, (Biotecnologia Industrial), Ed. Edgard Blucher Ltda, v. 2, São Paulo, 2001.

SENE, L.; CONVERTI, A.; SECCHI, G. A. R.; SIMÃO, R. C. G. New aspects on atrazine biodegradation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 53, 487-496, 2010.

SHANER, D. L. Role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. **Weed Science**, Lawrence. v.57, n. 1, p.118-123, 2009.

SILVA, C. M. S.; MELO, I. S.; FAY, E. F. Biotransformação de Agrotóxicos e Biorremediação. **Agrotóxicos e Ambiente**, (1ª Edição), 145-193, Embrapa, Brasília, 2004.

SILVA, C. M. M. de S.; MELO, I. S.; OLIVEIRA, P. R. Produção de enzimas ligninolíticas por fungos isolados de solos sob cultivo de arroz irrigado. 18 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Meio Ambiente. ISSN 1516-4675; 18). **Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna, 2004.

SILVA, E.; FIALHO, A.M.; SÁ-CORREIA, I.; BURNS, R. G.; SHAW, L. J. Combined bioaugmentation and biostimulation to cleanup soil contaminated with high concentrations of atrazine. **Environmental Science & Technology**, Jan 15;38(2):632-7, 2004.

SILVA, E.; SÁ, CORREIA, I.; FIALHO, A.M. Despoluição biológica de ambientes contaminados com o herbicida atrazina. **Boletim de Biotecnologia**, v. 82. p. 13-27, 2005.

SILVA, J. M.; NOVATO-SILVA, E.; FARIA, H. P.; PINHEIRO, T. M. M. Agrotóxicos e Trabalho: Uma Combinação Perigosa Para a Saúde do Trabalhador Rural. **Ciência & Saúde**, São Paulo, v. 10, n.4, Abr, 2005a.

SINGH, H. **Mycoremediation: fungal bioremediation**. New Jersey: John Wiley & Sons. 2006, 592p.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F. Agrotóxicos no Brasil. **AGEITEC**: Agência Embrapa de Tecnologia. Disponível em:
<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTA_G01_40_210200792814.html> Acesso em: 14 mar. 2019.

SOARES, L. A.; FLORES, A. C.; MENDONÇA, M. M.; BARCELOS, R. P.; BARONI, S. Fungos na biorremediação de áreas degradadas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo. v. 78. n. 2, p.341-35, 2011.

SRIVASTAVA, K.; MISHRA, K. K. Cytogenetic effects of commercially formulated atrazine on the somatic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Volume 93, Issue 1, Pages 8-12, January 2009.

STRANGE-HANSEN, R.; HOLM, P.E.; JACOBSEN, O.S.; JACOBSEN, C. S. Sorção, mineralização e mobilidade de N- (fosfometil) glicina (glifosato) em cinco diferentes tipos de cascalho. **Pest Management Science**, 60, pp. 570 – 578, 2004.

TAMILSELVAN, C.; JOSEPH, S.J.; MUGUNTHAN, G.; KUMAR, A.S.; AHAMED, S.S.M. Biological degradation of metribuzin and profenofos by some efficient bacterial isolates. **International Letters of Natural Sciences**, 14, 26-39, 2014.

TEJADA, M. Evolution of soil biological properties after addition of glyphosate, diflufenican and glyphosate+diflufenican herbicides. **Chemosphere**, 76:365-373, 2009.

THURMAN, E.M.; MEYER, M.T.; MILLS, M.S.; ZIMMERMAN, L.R.; PERRY, C.A.; GOOLSBY, D.A. Formation and transport of deethylatrazine and deisopropylatrazine in surface water. **Environmental Science & Technology**, 28, 2267-2277, 1994.

TOMLIN, C.D.S. **The Pesticide Manual**. Seventeenth Ed., British Crop Protection Council, Farnham, Surrey, UK, 2011.

TONI, L. R. M.; SANTANA, H.; ZAIA, D. A. M. Adsorção de glyphosate sobre solos e minerais. **Química Nova**, São Paulo. v.29, n.4, p.829-833, 2006.

UDIKOVIĆ-KOLIĆ, N.; SCOTT, C.; MARTIN-LAURENT, F. Evolution of atrazinedegrading capabilities in the environment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 96 1175-1189, 2012.

UH, UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE. Footprint. Pesticides database. **Preparazione di strumenti per la valutazione e la gestione del rischio da antiparassitari in Europa**. Disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/>. Acesso em: 5 dez 2018.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 67, 503. [CrossRef], 2003.

VEENA, B.M.; PREETHI, N.T.; ROBERTCYRIL, S.H.; SIKANDAR, I.M.; HARICHANDRA, Z.N. Degradation of Pendimethalin by *Bacillus circulans*. **Indian Journal of Biotechnology**, 9:173-177, 2010.

VIEGAS, C. A.; CHELINHO, S.; MOREIRA-SANTOS, M.; COSTA, C.; GIL, F. N.; SILVA, C.; LIMA, D.; RIBEIRO, R.; SOUSA, J. P. FIALHO, A. M. Bioremediation of soils contaminated with atrazine and other s-triazine herbicides: current state and prospects (Cap. 1). In: DANIELS, J. A. (Ed.) **Advances in Environmental Research**, v. 6. New York: Nova Science Publishers, p. 1-49, 2012.

VEIGA, F.; ZAPATTA, J. M.; MARCOS, F.; ALVAREZ, E. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia. north-west Spain. **The Science of the Total Environment**, v. 271, n.1-3, p.135-144, 2001.

VILLA, R. D.; TROVÓ, A.G.; NOGUEIRA, R.F.P. Environmental implications of soil remediation using the Fenton process. **Chemosphere**, v.7, p.43-50, 2008.

VIERO, C. M.; CAMPONOGARA, S.; CEZAR-VAZ, M. R.; COSTA, V. Z.; BECK, C. L. C. Sociedade de risco: o uso dos agrotóxicos e implicações na saúde do trabalhador rural. **Escola Anna Nery**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 99-105, Mar. 2016.

ZHANG, Y.; CAO, B.; JIANG, Z.; DONG, X.; HU, M.; WANG, Z. Metabolic ability and individual characteristics of an atrazine-degrading consortium DNC5. **Journal of Hazardous Materials**, 237-238. 376-381, 2012.

WHO. **Guidelines for predicting dietary intake of pesticide residues (revised)**: prepared by the Global Environment Monitoring System – Food Contamination Monitoring and Assessment Programme (GEMS/Food) in collaboration with the Codex Committee on Pesticide Residues. Zurich. 1997, 40 p. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/pesticides/en/>>. Acesso em: 17 jan. 2019.

WEBER, B, D.; SANTOS, A, A, Utilização da Biorremediação como ferramenta para o controle da degradação ambiental causada pelo petróleo e seus derivados, **Engenharia ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v, 10, n, 1, p, 114-133, 2013.

YAKUBU, M,B., Biological approach to oil spills remediation in the soil, **African Journal of Biotechnology**, v,6, n, 24, p, 2735-2739, 2007.