



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**SELEÇÃO DE FUNGOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOINOCULANTE
PARA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS AGRÍCOLAS IMPACTADOS COM
ATRAZINA**

GIULIANA RAHMEIER BONASSA

Foz do Iguaçu
2021



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS
DA VIDA E DA NATUREZA (ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**SELEÇÃO DE FUNGOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOINOCULANTE PARA
BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS AGRÍCOLAS IMPACTADOS COM ATRAZINA**

GIULIANA RAHMEIER BONASSA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos

Foz do Iguaçu
2021

GIULIANA RAHMEIER BONASSA

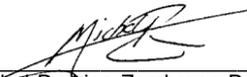
**SELEÇÃO DE FUNGOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOINOCULANTE PARA
BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS AGRÍCOLAS IMPACTADOS COM ATRAZINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA



Orientador: Profa. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos
UNILA



Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini
UNILA



Ma Juliana Kafka Bilha
UNILA

Foz do Iguaçu, 09 de junho de 2021.

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Giuliana Rahmeier Bonassa

Curso: Biotecnologia

Tipo de Documento	
(.....) graduação	(.....) artigo
(.....) especialização	<input checked="" type="checkbox"/> trabalho de conclusão de curso
(.....) mestrado	(.....) monografia
(.....) doutorado	(.....) dissertação
	(.....) tese
	(.....) CD/DVD – obras audiovisuais
	(.....) _____

Título do trabalho acadêmico: Seleção de fungos para o desenvolvimento de bioinoculante para biorremediação de solos agrícolas impactados com atrazina

Nome do orientador(a): Rafaella Costa Bonugli Santos

Data da Defesa: 09/06/2021

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons Licença 3.0 Unported*.

Foz do Iguaçu, 30 de julho de 2021.



Assinatura do Responsável

Dedico este trabalho aos meus pais, Irma
Eleonor Rahmeier e Geraldo Bonassa.

AGRADECIMENTO (S)

Em primeiro lugar agradeço à minha família, meus pais e meus irmãos, por terem me acompanhado na jornada da vida e também durante a minha graduação.

Ao meu professor orientador pela constante ajuda neste trabalho, assim como pela paciência e todo o aprendizado que me foi fornecido.

Aos professores da banca por todas as orientações cedidas.

Aos colegas de curso que me fizeram companhia ao longo dos anos, desde o início da minha jornada pela graduação na UEM, e a todos que me acolheram quando cheguei na UNILA.

Aos meus amigos da internet que, ao longo da pandemia, me fizeram companhia e me ajudaram muito no processo final deste trabalho.

*Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade. **Marie Curie.***

BONASSA, Giuliana Rahmeier. **Seleção de fungos para o desenvolvimento de bioinoculante para biorremediação de solos agrícolas impactados com atrazina**. 2021. 63p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2021.

RESUMO

Defensivos agrícolas vem sendo cada vez mais utilizados e seu impacto no meio ambiente é de muita relevância. A atrazina é um herbicida muito comum e é capaz de perdurar por muito tempo nos solos e corpos d'água. O tratamento da atrazina pode ser feito de várias maneiras, e uma delas é através da biorremediação. A utilização de fungos e bactérias para a remoção desse poluente é muito eficaz. Contudo, não se tem até o momento um processo ou produto capaz de promover o tratamento de solos agrícolas, especialmente frente as características desse agroecossistema. Neste sentido, faz-se necessário o desenvolvimento de um produto que possa ser de fácil aplicação e com manipulação já conhecida, como é o caso do Biochar (carvão ativado) que pode ser utilizado como imobilizante para um bioinoculante (micro-organismo). Visando o desenvolvimento de um bioinoculante, neste trabalho, utilizou-se três fungos previamente isolados de solo contaminado por atrazina para avaliar seu crescimento na presença e ausência do herbicida. *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014, *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018 e *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 foram cultivados na presença de 10 mg/L de atrazina por 10 dias a 28 °C e 140 rpm. Após o crescimento, a biomassa foi quantificada (peso seco) e o sobrenadante analisado (cromatografia líquida, LC-MS/MS) em relação a concentração de atrazina restante após cultivo. A quantificação da biomassa dos fungos *C. rosea* CCMIBA_R018 e *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 apresentou resultados favoráveis, pois o crescimento com e sem atrazina foi semelhante (p-valor >0,05, não houve diferença estatística) indicando que a atrazina não resultou em diminuição no crescimento. Já o *P. lilacinum* CCMIBA_R014 apresentou crescimento menor para o tratamento com atrazina, indicando sensibilidade ao herbicida (p-valor <0,05). Contudo, como *P. lilacinum* é um importante agente de controle biológico sua permanência no bioinoculante deve ser avaliada, mesmo com biomassa menor. Houve redução na concentração da atrazina no cultivo dos três fungos comparado ao controle, resultando na eliminação de 46%, 63% e 68% de atrazina nos cultivos dos fungos *P. lilacinum* CCMIBA_R014, *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 e *C. rosea* CCMIBA_R018, respectivamente. Essa redução pode ser resultado da biodegradação ou da adsorção do contaminante e estudos futuros serão realizados visando a confirmação da atividade biológica. Com a confirmação do potencial de biodegradação, o planejamento e escolha dos fungos será realizada para delineamento das próximas etapas da formulação do bioinoculante. Espera-se que o processo de biorremediação resultante do produto mostre uma melhora da qualidade física, química e biológica do solo a ser tratado e resultando no aumento da produtividade baseado numa agricultura sustentável, a partir de um desenvolvimento biotecnológico.

Palavras-chave: Atrazina. Fungo. Biorremediação. Herbicida. Biomassa.

BONASSA, Giuliana Rahmeier. **Selection of fungi for the development of a bioinoculant for bioremediation of agricultural soils impacted with atrazine**. 2021. 63p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, ano.

ABSTRACT

Pesticides are being used more and more and, their impact on the environment is of great relevance. Atrazine is a very common herbicide and can last for a long time in soils and rivers. Atrazine can be treated in several ways, one of which is through bioremediation. The use of fungi and bacteria to remove this pollutant is very effective. However, so far, there is no process or product capable of promoting the treatment of agricultural soils, especially given the characteristics of these agro-ecosystem. In this sense, it's necessary to develop a product that can be easily applied and with manipulation already known, as is the case of biochar (activated carbon) that can be used as immobilizers for a bioinoculant. Aiming at the development of a bioinoculant, in this work, three fungi previously isolated from soil contaminated by atrazine were used to evaluate its growth in the presence and absence of the herbicide. *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014, *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018 and *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 were grown with 10mg/L atrazine for 10 days, at 28°C and 140 rpm. After growth, the biomass was quantified and the supernatant was sent for analysis of the concentration of atrazine (LC-MS/MS). *C. rosea* CCMIBA_R018 and *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 presented good results, since the growth with the atrazine was similar to control (p-value > 0.05, there was no difference statistically) indicating that atrazine did not result in decreased growth. *P. lilacinum* showed less growth for treatment with atrazine, indicating sensitivity to the herbicide (p-value < 0.05). However, as *P. lilacinum* CCMIBA_R014 is an important biological control agent, and its permanence in the bioinoculant must be evaluated, even with smaller biomass. There was a reduction in the concentration of atrazine with the three fungi compared to the control, resulting in the elimination of 46%, 63%, and 68% of atrazine in the cultures of the fungi *P. lilacinum* CCMIBA_R014, *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 and *C. rosea* CCMIBA_R018, respectively. This reduction may be is from biodegradation or contamination adsorption. Future studies will be carried out to confirm the biological activity. With the confirmation of the biodegradation potential, the planning and choice of fungi will be carried out to outline the next steps in the bioinoculante formulation. It is expected that the bioremediation process resulting from the product will show an improvement in the physical, chemical, and biological quality of the soil to be treated, showing the productivity increased based on sustainable agriculture, based on a biotechnological development.

Key words: Atrazine. Fungus. Bioremediation. Pesticide. Biomass.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dose de aplicação da atrazina nos diferentes cultivos e diferentes tipos de solo.....	16
Tabela 2: Informações médicas relacionadas à intoxicação por atrazina.....	21
Tabela 3: Alguns estudos recentes realizados na área de biodegradação de atrazina por fungos.....	33
Tabela 4: Proporção de produtos formados a partir de cada tipo de pirólise.....	36
Tabela 5: Composição do meio utilizado para a reativação dos fungos.....	41
Tabela 6: Peso seco do fungo <i>P. lilacinum</i> CCMIBA_R014 cultivado na presença (lote 1) e ausência da atrazina (lote 2).....	46
Tabela 7: Peso seco do fungo <i>C. rosea</i> CCMIBA_R018 cultivado na presença (lote 1) e ausência da atrazina (lote 2).....	49
Tabela 8: Estudos realizados com <i>Bjerkandera</i> sp. na biorremediação.....	50
Tabela 9: Peso seco do fungo <i>Bjerkandera</i> sp. CCMIBA_R111 cultivado na presença (lote 1) e ausência da atrazina (lote 2).....	51
Tabela 10: Resultados do teste ANOVA para o fungo CCMIBA_R014.....	52
Tabela 11: Resultados do teste ANOVA para o fungo CCMIBA_R018.....	52
Tabela 12: Resultados do teste ANOVA para o fungo CCMIBA_R111.....	53
Tabela 13: Resultado do ensaio de cromatografia líquida com espectrofotômetro de massa (LC-MS/MS).....	55

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação molecular e nome IUPAC da atrazina.....	15
Figura 2: Estrutura do fotossistema II.....	18
Figura 3: Representação molecular da lignina.....	26
Figura 4: Classificação das peroxidases.....	27
Figura 5: Mecanismo de ação da LiP.....	28
Figura 6: Ciclo catalítico da MnP.....	29
Figura 7: Ciclo catalítico da lacase.....	31
Figura 8: Alguns mediadores químicos utilizados pela lacase.....	32
Figura 9: Vias de degradação de atrazina.....	34
Figura 10: Mecanismos fúngicos de biodegradação de compostos poluentes e recalcitrantes.....	35
Figura 11: Experimento com os extratos fúngicos e <i>Allium cepa</i>	43
Figura 12: Aspecto morfológico dos ensaios realizados.....	44
Figura 13: Resultado do cultivo de uma amostra de atrazina em meio sólido, pré-filtragem.....	45
Figura 14: Crescimento fúngico nas cebolas utilizadas no experimento.....	45
Figura 15: <i>Purpureocillium lilacinum</i> após cultivo de 14 dias em meio de cultivo com extrato de malte (a-c); (d, e) conidióforos bem definidos; (f) conídios fusiformes.....	47
Figura 16: (a) Morfologia do <i>C. rosea</i> em meio de cultivo BDA; (b, c) conidióforos; (d) conídios.....	49
Figura 17: <i>Bjerkandera adusta</i> encontrado no tronco de árvores.....	51
Figura 18: Crescimento do fungo <i>Bjerkandera</i> sp. em meio malte.....	52
Figura 19: Boxplot dos resultados obtidos para peso seco da biomassa fúngica.....	53
Figura 20: Gráfico comparando os valores médios na análise cromatográfica.....	56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 ATRAZINA.....	15
2.2 BIODEGRADAÇÃO DE ATRAZINA E ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS.....	21
2.3 BIOCHAR.....	34
2.3.1 Qualidade do solo agrícola e aplicação do Biochar.....	38
3 OBJETIVOS.....	40
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
4 METODOLOGIA.....	41
4.1 CULTIVO DOS FUNGOS.....	41
4.2 CRESCIMENTO FÚNGICO EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO ATRAZINA.....	41
4.3 PESO SECO DOS FUNGOS.....	42
4.4 ANÁLISE QUANTITATIVA DA DEGRADAÇÃO DA ATRAZINA.....	42
4.5 ENSAIOS DE TOXICIDADE COM <i>ALLIUM CEPA</i>	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
6 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Defensivos agrícolas possuem um papel importante na agricultura e sua utilização vem aumentando cada vez mais. Porém, é conhecido que esses agentes químicos podem causar muitos danos no meio ambiente e nos mais variados seres vivos, afetando muito o ecossistema como um todo. A atrazina é um herbicida que é capaz de matar uma grande diversidade de plantas. Ele atua inibindo a fotossíntese e impede o desenvolvimento de plantas indesejadas, principalmente no cultivo de milho (GAO, et al. 2019; ZHU, et al. 2018).

A atrazina possui um tempo de meia-vida longo (entre 41 e 231 dias), tem baixa adsorção em solos e moderada solubilidade em corpos d'água, e vem causando grandes problemas de contaminação. Muitos países já proibiram o uso desse herbicida, como por exemplo Itália, Dinamarca e Alemanha, porque seus resíduos persistem por muitos anos no meio ambiente. Além dos riscos à saúde, vários fatores que contribuem para a degradação do solo têm sido atribuídos às práticas agrícolas insustentáveis, como o uso de defensivos químicos. É urgente a descoberta de uma maneira para diminuir o impacto desse xenobiótico que vem causando grandes danos nas mais variadas espécies, incluindo o ser humano (SINGH, et al. 2018).

O tratamento de pesticidas como a atrazina pode ser realizado por mais de um mecanismo, podendo ser abiótico ou biótico. Mecanismos abióticos incluem processos químicos e físicos. Já os mecanismos bióticos utilizam organismos vivos para fazer a remoção desse poluente do solo ou da água, processo conhecido como biorremediação. A pesquisa utilizando fungos e bactérias para realizar esse procedimento acontece desde a década de 90, quando esses microrganismos foram isolados de ambientes contaminados com a atrazina (LEVIRAM, et al. 2019; DESHMUKH, et al. 2016).

Contudo, devido às características e peculiaridades dos sistemas agrícolas, a biorremediação de solos é um processo desafiador e pouco explorado, apesar dos potenciais biológicos. Na área agrícola, o biochar já demonstrou ter grande eficiência no tratamento de solos contaminados, reduzindo a biodisponibilidade de compostos tóxicos e reduzindo, assim, a

transferência desses compostos para os cultivos agrícolas (SOLAIMAN, et al. 2019). O biochar é um produto obtido através da pirólise de uma biomassa, e é uma alternativa para “estocar” a matéria orgânica presente na biomassa (perdurando por mais de 100 anos). Ele possui um largo espectro de aplicação, podendo ser utilizado para produzir energia (visando a substituição de combustíveis fósseis), possuindo também aplicação na agricultura e pecuária e setor da construção civil (O’CONNOR, et al. 2018; WEBER & QUICKER, 2018; LENG, et al. 2019).

O biochar pode ser aplicado no solo como um tipo de fertilizante, ajudando no desenvolvimento dos cultivos agrícolas e também da microbiota ali presente. Estudos relatam que há um aumento da população de micorrizas no solo em resposta ao biochar, provavelmente porque esse material rico em matéria orgânica proporciona um micro-habitat favorável, tanto para fungos como também para bactérias. Além disso, os fungos podem realizar sua esporulação dentro do biochar (SOLAIMAN, et al. 2019).

O presente projeto teve como objetivo a seleção de fungos capazes de crescer em ambientes impactados com atrazina para o desenvolvimento de um bioinoculante a base de biochar. Essa etapa faz parte do projeto: Desenvolvimento de bioinoculante para biorremediação de solos agrícolas impactados com atrazina, em desenvolvimento no laboratório de Bioquímica e Microbiologia da Unila, sob coordenação da Professora Rafaella Costa Bonugli Santos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ATRAZINA

Defensivos agrícolas, popularmente conhecidos como micropoluentes, pesticidas ou agrotóxicos, de uma maneira geral, são definidos como compostos químicos orgânicos ou inorgânicos, usados para o controle de pragas e controle de plantas indesejadas nos mais variados cultivos agrícolas, visando sempre o aumento da produtividade. Estes compostos atingem solos e corpos d'água, e fazem parte dos poluentes mais comuns encontrados ao redor do mundo. Uma vez que ele é introduzido ao ecossistema, pode sofrer várias transformações e apresentar riscos à saúde humana e animal, e estudos já mostraram sua relação com as mais diversas patologias, incluindo o câncer. Além disso, podem interferir diretamente nas mais diversas interações biológicas que acontecem nos ecossistemas (CARBONERAS; et al, 2017).

A atrazina (6-cloro-N²-etil-N⁴-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina) (figura 1) segundo herbicida mais utilizados no mundo, utilizada principalmente para o controle de ervas daninhas nos cultivos de soja, cana-de-açúcar, trigo, sorgo, milho, entre outros, está atrás apenas do glifosato na utilização agrícola. No Brasil, também se trata de um herbicida de ampla comercialização. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA), o composto ativo da atrazina esteve na lista dos 10 principais mais vendidos no país, entre os anos de 2009 e 2016 (SINGH, et al. 2018; PENN, et al. 2018; DIAS, et al; 2018).

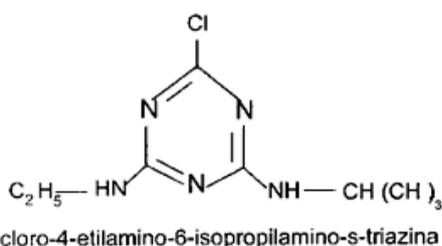


Figura 1: Representação molecular e nome IUPAC da atrazina.

Segundo a Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR), a atrazina é comercializada em uma concentração de 500 g/L (50,0% m/v), e sua comercialização se dá na forma líquida. Além da atrazina, existem outros compostos não identificados pelos fabricantes que estão na formulação desse agrotóxico, numa concentração de 572 g/L (57,2% m/v) a 604,7 g/L dependendo do fabricante. Algumas marcas que comercializam o produto no Brasil são Nortox S/A, Atanor, Syngenta e Alamos. A aplicação da atrazina é feita, geralmente, após o momento da colheita (em plantas com mais de um período de colheita), e pode ser aplicada de maneira pré-emergencial (antes do aparecimento de plantas daninhas) ou pós-emergencial (após o aparecimento de plantas daninhas). A quantidade de pesticida que é aplicada depende do tipo de cultivo e também do tipo de solo (tabela 1). A aplicação é feita no solo, através de pulverização. O composto ativo é classificado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como classe III de toxicidade (medianamente tóxico) e sua classificação do potencial de periculosidade ambiental é II (produto muito perigoso ao meio ambiente).

Tabela 1: Dose de aplicação da atrazina nos diferentes cultivos e diferentes tipos de solo.

Cultura	Época de aplicação	Dose/hectare					
		Solo leve		Solo médio		Solo pesado	
		Kg i.a	L p.c	Kg i.a	L p.c	Kg i.a	L p.c
Cana-de-açúcar	Cana planta: após o plantio	2,5	5,0	3,25	6,50	4,0	8,0
	Cana soca: após o corte	2,5	5,0	3,25	6,50	4,0	8,0
Milho e sorgo	Pós-semeadura	1,5	3,0	2,5	5,0	3,25	6,50

P.C = produto comercial; I.A = ingrediente ativo

Fonte: ADAPAR.

A atrazina é um herbicida que possui baixa adsorção em solos e moderada solubilidade em água, resultando em alto potencial de contaminação não apenas de solos agrícolas, como também de corpos d'água como lençóis freáticos. Devido esse alto potencial de contaminação, esse herbicida já foi

banido em vários países (p. ex. Itália, Alemanha e Dinamarca) e, em 1991, sua utilização foi proibida em toda a União Europeia, por causa do seu alto grau de persistência na superfície aquosa ao longo dos anos (SINGH, et al; 2018).

A atrazina possui características físico-químicas que contribuem para a sua persistência no meio ambiente, favorecendo processos de escoamento e lixiviação. O favorecimento da lixiviação, juntamente com a sua alta solubilidade em água, colabora para que esse xenobiótico seja encontrado em corpos d'água em vários lugares do mundo, como nos Estados Unidos, União Europeia, e também no Brasil. Além disso, a atrazina e seus derivados também foram detectados em solos após 22 anos da aplicação (MARTINS, et al. 2018). A atrazina é uma base fraca e, dependendo do pH do solo, ela tem mais facilidade em se solubilizar. Em lugares com abundância de chuva, há mais chances de ser transportada para águas subterrâneas e possui uma forte afinidade com ácidos húmicos, que também tem influência no acúmulo de micropoluentes no solo (SALAZAR-LEDESMA, et al. 2017). É um composto de alta persistência no ambiente, e seu intervalo de meia-vida foi reportado entre 10 dias e 15 anos.

A aplicação da atrazina se dá pelo solo, e ela se move na planta como resposta à transpiração, através de uma translocação pelo xilema. Devido a esse mecanismo, é um herbicida que pode ser utilizado também em tratamentos pós-emergentes, que é feito após o aparecimento das ervas daninhas nas plantações (MARCHI, et al. 2008).

Herbicidas que atuam inibindo a fotossíntese no fotossistema II, como as triazinas (grupo o qual a atrazina pertence), são os mais frequentemente detectados no meio ambiente. Seu mecanismo de ação se dá pela inibição do fluxo de elétrons no fotossistema II (figura 2) (GAO, et al. 2019). Apesar da interrupção do fluxo de elétrons, os cloroplastos continuam captando energia solar. Isso resulta em um aumento da carga energética das moléculas de clorofila e, como os elétrons em excesso não são armazenados como ATP e NADPH (devido à ausência do fluxo no fotossistema II), eles acabam formando radicais livres, o que resulta na peroxidação de lipídeos (degradação oxidativa) nas membranas, com posterior morte da planta (MARCHI, et al. 2008).

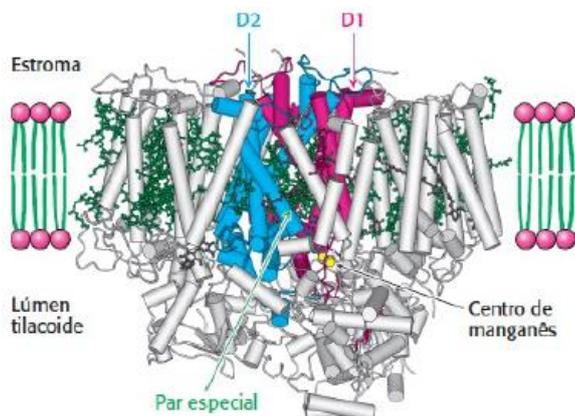


Figura 2: Estrutura do fotossistema II. O fotossistema II catalisa a transferência de elétrons da água para a plastoquinona, processo que é feito pela indução da luz solar. As subunidades D1 e D2 estão em vermelho e azul (respectivamente) e as moléculas de clorofila estão em verde. O mecanismo de ação da ATZ se dá pela ligação ao sítio da plastoquinona da proteína D1, inibindo o fluxo de elétrons no fotossistema II. Essa inibição resulta no acúmulo de carga energética nas moléculas de clorofila, formando radicais livres que, posteriormente, causam a morte da planta. Fonte: BERG et al, 2014; GAO et al, 2019; MARCHI et al, 2008.

Triazinas simétricas, como a atrazina, sofrem degradação em muitas espécies de plantas que são resistentes ao herbicida, através de um mecanismo que não deixa com que o herbicida chegue aos cloroplastos da planta. Esse processo é chamado de detoxificação, e acontece por meio da enzima glutatone-S-transferase, que é responsável pela metabolização de triazinas em compostos não tóxicos. Tal enzima está presente em espécies de milho e sorgo, e atua na junção de glutatona a vários substratos hidrofóbicos que geralmente apresentam citotoxicidade, produzindo compostos solúveis em água diminuindo a sua toxicidade. Outro mecanismo de detoxificação envolve enzimas como citocromo 450, peroxidases, esterases, oxigenases, redutases, entre outras. Porém, não são todas as espécies que possuem esses mecanismos, e o efeito da atrazina em plantas não-alvo podem trazer algumas consequências (JUNIOR, 2011; SINGH, et al. 2018; MARCHI, et al. 2008; CATANEO, et al. 2003).

Herbicidas podem causar efeitos indesejados e, dentre eles, um dos principais está relacionado com plantas não-alvo. A atrazina pode causar completa morte dessas plantas, como também um prejuízo no seu crescimento,

na translocação de substâncias pelo xilema e pelo floema, bem como alteração fenotípica que podem envolver as mais variadas mutações (SINGH, et al; 2018). A atrazina comumente é absorvida pelas raízes e transportada pelo xilema, mas também pode ser absorvida pelas folhas. As plantas não-alvo que não são capazes de fazer a detoxificação da atrazina sofrem estresse oxidativo pois a presença do xenobiótico gera espécies reativas de oxigênio. A presença da atrazina em corpos d'água também traz sérias consequências para a flora aquática.

Assim como a flora aquática, a fauna dos corpos d'água também pode sofrer consequências devido à ação de herbicidas. Estudos mostram que a atrazina apresentou toxicidade em espécies de peixes e sapos, apresentando perturbação no processo de osmorregulação e nas células das brânquias (NWANI, et al. 2011; ORTON, et al. 2006; MELA et al, 2013). Estudos mostram que a atrazina também causa efeitos em outras espécies, como a tartaruga-da-orelha-vermelha (*Trachemys scripta*), causando danos em alguns aspectos do sistema imunológico, como um número reduzido de leucócitos e da atividade fagocítica, entre outros parâmetros que demonstram uma relação entre a presença da atrazina e esses efeitos imunossupressores (SOLTANIAN, 2016).

Assim como os animais aquáticos, animais terrestres também podem sofrer consequências por causa da ingestão de herbicidas. Diversos estudos já comprovaram os mais variados efeitos em várias espécies de vertebrados e invertebrados. Como por exemplo, efeitos no sistema neuro-endócrino através da mudança de níveis de hormônios como o FSH (hormônio folículo-estimulante) e o LH (hormônio luteinizante). Níveis alterados de LH prolonga a secreção da prolactina que, por sua vez, vai estimular alterações na glândula mamária, fator que está associado ao aparecimento de carcinomas (SINGH, et al. 2018). Além disso, a exposição à atrazina por afetar células germinativas, através da redução da motilidade e quantidade de espermatozoides, que foi comprovada em estudos feitos com ratos.

Outros efeitos da exposição à atrazina em animais terrestres pode envolver os sistemas imunológico, nervoso e cardiovascular (SINGH et al, 2018). A atrazina também pode interferir no processo de meiose, afetando a produção de espermatozoides em camundongos. Além disso, estresse oxidativo

e desbalanço de cálcio têm um papel muito importante na indução de imunotoxicidade em camundongos.

Em humanos, o principal alvo atingido pela toxicidade da atrazina é o sistema endócrino, mas também pode ocorrer estresse oxidativo através da formação de espécies reativas de oxigênio. Isso resulta no comprometimento do sêmen, como já foi demonstrado em anfíbios, porcos e ratos. O herbicida também possui toxicidade às fêmeas, podendo causar alterações nos níveis de hormônios e de receptores de estrógeno, bem como irregularidades no ciclo ovariano, podendo causar aborto e malformação de fetos. Através dessas espécies reativas de oxigênio, a atrazina pode causar quebra da dupla-fita de DNA. Já foram relatados alguns problemas de saúde em pessoas que tomaram água contaminada por atrazina, apresentando alguns problemas como dor abdominal e diarreia, além de irritação nos olhos ao contato. Por esse motivo, a concentração máxima permitida de atrazina na água potável é muito baixa no mundo inteiro, sendo de 0,003 mg/L nos Estados Unidos e 0,0001 mg/L na União Europeia, por exemplo (SINGH, et al. 2018; SALAZAR-LEDESMA, et al. 2017).

Estudos mais recentes também demonstram consequências devido a exposição à atrazina. Segundo Henderson et al (2019), a exposição aguda *in vitro* ao herbicida causa aumento do consumo de glicose, causando um número reduzido de blastocistos em bovinos. Tais efeitos podem aumentar o risco de doenças metabólicas e outros problemas de saúde na vida adulta. Além disso, há provas de que a atrazina pode prejudicar a aprendizagem e a memória, danificando a morfologia do hipocampo e reduzindo a expressão de genes relacionados a aprendizagem e memória no hipocampo (WANG, et al. 2019). Alguns dados referentes a intoxicações causadas pela atrazina podem ser observados na tabela 2.

Em adição, a aplicação descontrolada de pesticidas pode afetar indiretamente na qualidade da produção agrícola através da contaminação do solo, eliminando organismos não-alvo. Eles podem danificar a biomassa do solo e microrganismos, como bactérias, fungos e outros organismos importantes para a qualidade do solo, como as minhocas. A biomassa microbiana é um componente lábil da matéria orgânica do solo e tem um papel importante no ciclo

dos nutrientes do solo resultando na baixa produção, surgimento de outras patogenicidades e perda de qualidade (AZAM, et al. 2003).

Tabela 2: Informações médicas relacionadas à intoxicação por atrazina.

Vias de exposição	Oral, inalatória, ocular e dérmica.
Toxicocinética	A atrazina é metabolizada a seus derivados são excretados primeiramente na urina, e as fezes são uma menor via de excreção.
Sintomas e sinais clínicos	A ingestão desse herbicida é susceptível de ser seguida por vômitos e diarreia. A exposição aguda pode levar a um aumento da temperatura corporal. Em animais, possui relevância carcinogênica no sistema cardiovascular. Pode ocorrer dificuldade para respirar, tosse, bem como irritações no trato respiratório, bronquite ou pneumonia. Caso a exposição seja ocular, pode ocorrer irritação, dor, inchaço, lacrimejamento ou fotofobia. Para exposição dérmica, podem ocorrer irritações.
Tratamento	Não há antídoto conhecido, então o tratamento é sintomático. Deve-se monitorar fluidos e eletrólitos. Monitorar estado mental, sonolência e depressão do Sistema Nervoso Central. Avaliação da função respiratória. A descontaminação gastrointestinal não é recomendada caso aja ingestão. Caso a exposição seja por vias aéreas, o paciente deve ser levado para um local arejado, e deve ser avaliado para possíveis irritações no trato respiratório. Para exposição ocular, os olhos devem ser lavados com água corrente por pelo menos 15 minutos. Para a exposição dérmica, deve-se remover as roupas contaminadas e a área exposta deve ser lavada com água e sabão. Em qualquer um dos casos, se a irritação ou dor persistir, o paciente deve ser encaminhado para tratamento específico.

Fonte: ADAPAR.

2.2 BIODEGRADAÇÃO DE ATRAZINA E ENZIMAS LIGINOLÍTIICAS

A degradação de atrazina na natureza pode ocorrer através de

fatores abióticos, moderado por processos químicos. As reações químicas que ocorrem no solo são mediadas pela água e as mais comumente relatadas são de hidrólise e oxidação. O solo apresenta uma composição que favorece o acontecimento de tais reações, como a presença de água e oxigênio. Nas reações de hidrólise abióticas, alguns fatores são determinantes para definir a velocidade da reação, como por exemplo o pH, quantidade de matéria orgânica e a presença de íons metálicos dissolvidos (FAY, et al. 2008; GORING, et al. 1975).

Outro mecanismo abiótico de degradação de pesticidas na natureza é a fotoquímica. Esse mecanismo tem relação direta com a incidência de luz solar, onde as moléculas absorvem fótons de energia e, então, as reações fotoquímicas ocorrem. A radiação ultravioleta é capaz de quebrar ligações químicas nas moléculas que a absorvem. A princípio, esse mecanismo de degradação ocorre na superfície do solo ou da água, porém os xenobióticos possuem comportamentos diferentes em cada um desses locais. A fotólise pode resultar em compostos de estrutura única, que não são semelhantes aos compostos resultantes de reações químicas ou biológicas (MANAHAN, 1994; KHAN, 2016).

O tratamento de herbicidas como a atrazina pode ocorrer através de processos químicos, físicos ou biológicos. Os processos químicos e físicos comumente são caros e apresentam dificuldade quando aplicados em larga escala, porém apresentam ótimo desempenho. Processos biológicos, como a biorremediação, podem apresentar uma relação custo-benefício mais favorável, além de não agredir de forma alguma o meio ambiente (LEVIRAM, et al. 2019; DESHMUKH, et al. 2016).

Biorremediação é definida como a utilização de organismos vivos para realizarem a conversão de poluentes tóxicos em produtos não tão agressivos ao meio ambiente. A aplicação de microrganismos para realização da biorremediação de ambientes contaminados por xenobióticos envolve várias reações químicas e físicas que fazem parte do metabolismo desses microrganismos, resultando na remoção parcial ou total dos poluentes. A utilização de microrganismos para a remoção de atrazina é considerada uma opção desde a década de 1990, quando foram isolados fungos e bactérias

capazes de degradar a atrazina, que estavam presentes em locais contaminados pelo herbicida. (DESHMUKH, et al. 2016; LEVIRAM, et al. 2019).

No meio ambiente, a degradação de poluentes pelos microrganismos raramente é feita por apenas uma espécie trabalhando sozinha. Geralmente, é um conjunto de espécies que trabalham em consórcio. Já foram relatados vários consórcios bacterianos para a degradação de diferentes poluentes orgânicos, entre eles a atrazina. As interações que ocorrem dentro de consórcios microbianos podem ser muito complexas, e podem afetar tanto a eficiência de degradação dos poluentes, como também a destinação final desses poluentes degradados. Alguns gêneros bacterianos que já foram identificados como degradadores de atrazina incluem *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Nocardioides* e *Klebsiella*. Entre elas, *Pseudomonas* e *Arthrobacter* apresentaram alta eficiência. Geralmente, esses organismos são isolados próximo a áreas contaminadas pelo herbicida (LIU, et al. 2019; KOLEKAR, et al. 2019).

Alguns fatores são muito importantes para garantir uma boa biodegradação microbiana de poluentes, como a aeração. A biodegradação de atrazina pode ser realizada em condições aeróbicas ou anaeróbicas, mas estudos mostram que há maior eficiência na presença de oxigênio. Segundo Elefsiniotis & Wareham (2013), isso ocorre porque os consórcios microbianos anaeróbicos possuíam um metabolismo mais lento. A espécie de microrganismo utilizada também apresenta alta influência, bem como fatores nutritivos do local onde o poluente está para ser tratado (CARBONERAS et al, 2017).

Os fungos também são conhecidos por degradar diversos tipos de xenobióticos no meio ambiente, sendo considerados ótimos agentes biorremediadores. Em estudos realizados com atrazina e outros agrotóxicos, percebeu-se que os tratamentos utilizando atrazina apresentavam maior presença da população fúngica. Em comparação com os ensaios que não possuíam nenhum agrotóxico, não houve muita diferença notável na biodiversidade fúngica. Isso dá aos fungos uma vantagem na sua utilização para a biodegradação da atrazina, já que se notou que as bactérias não apresentaram uma contagem tão boa quanto à dos fungos, naqueles tratamentos em que a atrazina estava presente (GOUMA, et al. 2019; OLADELE; AYODELE, 2017).

Mais especificamente, fungos da podridão branca (white rot fungi – WRF, em inglês) são caracterizados por apresentarem ótima capacidade de degradação de lignina e também de poluentes tóxicos. Além disso, eles possuem uma vantagem com relação às bactérias, que é a sua fácil colonização das áreas poluídas por causa da expansão do seu micélio. O desenvolvimento de suas hifas permite sua penetração no solo, atingindo mais facilmente os agentes poluidores (GOUMA, et al. 2019).

O uso de fungos de podridão branca na degradação de pesticidas acontece porque o potencial de degradação das enzimas ligninolíticas não se aplica somente à lignina. Algumas moléculas derivadas da lignina, ou com estrutura parecida, como é o caso de vários organopoluentes (incluindo substâncias xenobióticas persistentes) também são suscetíveis à ação dessas enzimas. Estudos já comprovaram que a atrazina é um composto recalcitrante que pode ser biodegradado por fungos, através da utilização de enzimas ligninolíticas (CARBONERAS, et al. 2017; HOFRICHTER, 2002).

Os fungos que participam da decomposição da madeira na natureza podem ser divididos em três grandes classes: fungos de podridão branca, fungos de podridão parda e fungos de podridão mole. Os fungos de podridão parda são conhecidos por degradar celulose e hemicelulose presentes na parede celular das plantas. Essa podridão é caracterizada por uma coloração marrom escuro. Na medida que a decomposição ocorre, a madeira escurece e fica marrom. Isso ocorre por causa do acúmulo de resíduos de lignina modificados pelo metabolismo fúngico. Entre os tipos de enzimas produzidas pelos fungos de podridão parda estão: xilanases, endoglucanases e galactosidases. Dentro desse grupo, as espécies que merecem destaque são *Serpula lacrymans* e *Gloeophyllum trabeum* (MADADI, et al., 2017; ARANTES, GOODELL, 2014; JELLISON, et al., 1997).

Os fungos de podridão mole também degradam a madeira. Porém, eles possuem maior atividade por pilhas de lascas de madeira ou palha. Eles podem reduzir a celulose e a hemicelulose de maneira lenta. Também reduzem lignina, mas de maneira menos significativa. Esse grupo de fungos consegue se adaptar mais facilmente a temperaturas e pH diferentes, bem como em condições de oxigênio limitado, quando em comparação com outros fungos.

A decomposição realizada pelos fungos de podridão mole pode ser dividida em duas categorias: formação de cavidade e erosão. A formação de cavidades ocorre dentro das paredes celulares da madeira, e a erosão atinge completamente a parede secundária da planta, com uma pequena modificação na lamela média (HAMED & MONSOUR, 2018; MADADI, et al. 2017).

WRF (white-rot fungi) se trata de um grupo de fungos que, com relação às suas atividades fisiológicas, possuem um ponto em comum: a capacidade de degradar lignina (Fig. 3). O nome “podridão branca” (white-rot) vem da aparência da madeira que é colonizada por esses fungos, que removem a sua lignina e a deixam com uma coloração branca. Dentro desse grande grupo de fungos da podridão branca, o grupo mais conhecido corresponde ao filo Basidiomycota, mas também existem outros grupos de fungos como alguns do filo Ascomycota. Além de degradar a lignina, os WRF são capazes de catabolizar celulose e hemicelulose (outros componentes de tecidos vegetais), e essa catalisação pode acontecer sob várias condições diferentes. A degradação da lignina, por sua vez, ocorre estritamente através de um processo oxidativo na presença de oxigênio. Além disso, a lignina é extremamente recalcitrante. Isso, juntamente com o grupo limitado de organismos que possuem enzimas ligninolíticas, e a produção alta de lignina atualmente, fazem com que a degradação da lignina seja uma etapa muito importante para o ciclo do carbono, em ambientes onde a lignocelulose está muito presente (POINTING, 2001).

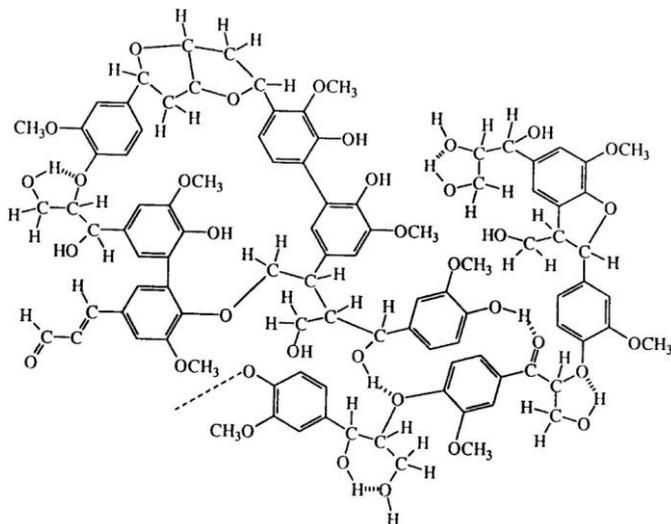


Figura 3: Representação molecular da lignina.

Existem três enzimas principais que, essencialmente, realizam a degradação da lignina. São elas: lignina peroxidase (LiP, E.C. 1.11.1.14), manganês peroxidase (MnP, E.C. 1.11.1.13) e a lacase (Lac, E.C. 1.10.3.2), outras enzimas desse grupo apresentam relações indiretas na atividade ligninolítica, como Glyoxal oxidase (EC 1.2.3.5) entre outras (Janusz et al. 2017). As duas primeiras se tratam de duas peroxidases que possuem grupo heme glicosilado, e a última se trata de uma fenoloxidase contendo cobre no seu sítio ativo. As hifas dos fungos crescem no lúmen das células lenhosas, e secretam essas enzimas ligninolíticas e também enzimas de clivagem de polissacarídeos, degradando a parede celular (que contém lignina) de dentro para fora (POINTING, 2001; HAMMEL, et al. 1993).

O grande grupo das peroxidases (fig. 4) catalisa reações que envolvem a redução de peróxidos, como o H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), através da oxidação de um elétron doador. Elas possuem um papel importante na biodegradação pois são capazes de remover compostos aromáticos, como os fenóis. Esse grupo de enzimas atua no rompimento de anéis aromáticos e na total mineralização de compostos orgânicos. As peroxidases são produzidas pelos mais variados tipos de organismos, entre eles animais, plantas, bactérias e fungos. Como citado anteriormente, as peroxidases produzidas por fungos que

são de interesse para a degradação de lignina são a lignina peroxidase e a manganês peroxidase (OKINO-DELGADO, et al. 2019).

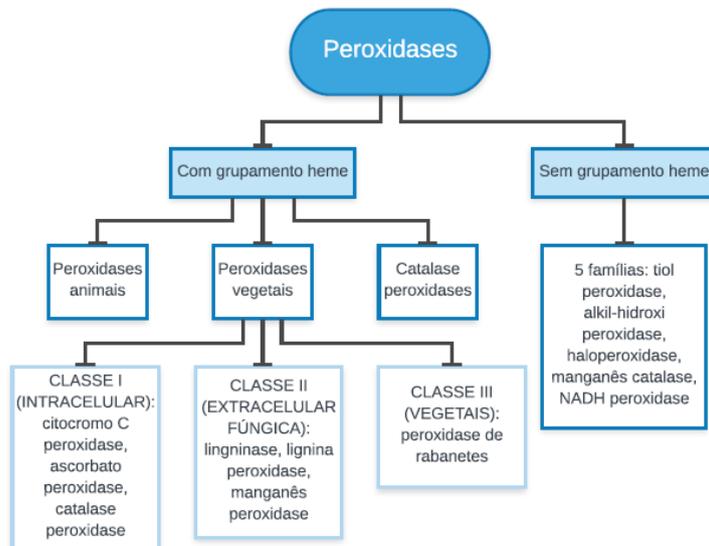


Figura 4: Classificação das peroxidases. Adaptado de OKINO-DELGADO et al (2019).

A lignina peroxidase (LiP) se trata de uma glicoproteína que contém um grupamento heme que é responsável pela catálise da despolimerização oxidativa da lignina, dependente de H_2O_2 . O ciclo catalítico da LiP consiste em uma etapa de oxidação e duas etapas de redução (fig. 5). Essa enzima foi descoberta no meio extracelular, sendo produzida pelo fungo da espécie *Phanerochaete chrysosporium*. Desde a descoberta dessa enzima, em 1983, várias isoenzimas foram identificadas nas mais variadas espécies fúngicas. O seu mecanismo de ação envolve a formação de radicais catiônicos através da oxidação de um elétron, o que leva à clivagem, desmetilação e rearranjos das cadeias laterais da lignina (FALADE, et al. 2016; DATTA, et al. 2017).

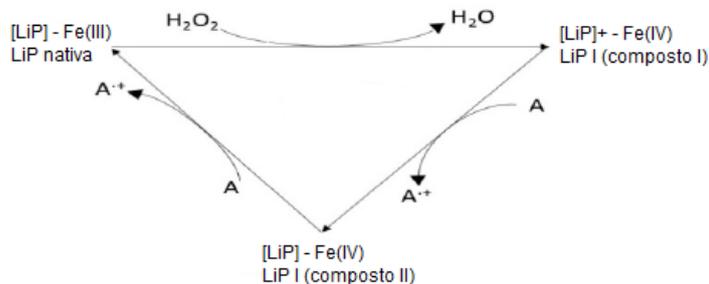


Figura 5: Mecanismo de ação da LiP. Na primeira etapa do ciclo, ocorre a oxidação de dois elétrons da enzima férrica nativa por H_2O_2 para formar o intermediário oxo-férrico I [Fe(IV)]. Na segunda etapa, ocorre a redução do composto I pelo substrato não fenólico (A), para formar o composto II através do ganho de um elétron. Na terceira e última etapa, o composto II volta ao seu estado férrico ganhando mais um elétron do substrato redutor A. Adaptado de Datta, et al. 2017.

Existem outros processos oxidativos que são associados à LiP, sendo eles: hidroxilação de grupos metileno, oxidação de álcoois em seus correspondentes aldeídos ou cetonas e oxidação de fenol. A capacidade oxidativa da LiP sobre a lignina é justificada pelo seu resíduo de triptofano, que forma um radical na superfície da enzima, através da transferência de elétron de longo alcance para o grupo heme. Mudanças no local onde o triptofano está é capaz de modular a atividade enzimática, bem como a estabilidade da enzima e a especificidade ao substrato (FALADE, et al. 2016).

Outra enzima dentro da grande família das peroxidases que atua na degradação de lignina, é a manganês peroxidase (MnP). Ela é a mais comum dentro do grupo de enzimas que degrada lignina, e é produzida por quase todos os basidiomicetos que colonizam madeira, e também por vários fungos saprófitos do solo. A MnP se trata de uma glicoproteína que possui um grupamento heme, e foi descoberta na espécie *Phanerochaete chrysosporium*, assim como a lignina peroxidase. A manganês peroxidase recebeu, então, maior atenção por ser uma enzima produzida em todos os fungos que causam a podridão na madeira que eles colonizam. O seu mecanismo de ação é muito semelhante ao da LiP. O seu diferencial é que a MnP utiliza Mn^{2+} (onipresente em todos os materiais lignocelulóticos) como substrato preferido. A MnP utiliza $\text{Mn}^{2+}/\text{Mn}^{3+}$ como um par redox intermediário, produzindo assim oxalato de Mn^{3+}

como produto final. O seu ciclo catalítico pode ser visto com mais detalhes na figura 6 (HOFRICHTER, 2002; OKINO-DELGADO, et al. 2019; DATTA, et al. 2017).

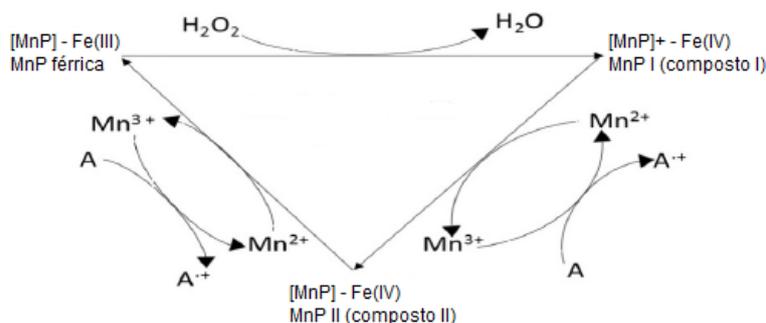


Figura 6: Ciclo catalítico da MnP. Se inicia pela ligação de H₂O₂ à enzima férrica nativa, formando peróxido de ferro. Depois, ocorre uma clivagem que requer uma transferência de 2 elétrons do grupo heme, formando o composto MnP I. A ligação do dioxigênio é clivada e uma molécula de água é liberada. A próxima etapa é uma redução, que sucede através do composto MnP. Um íon Mn² atua como doador de elétron para um intermediário de porfirina e é oxidado a Mn³⁺. A redução do composto MnP II continua, e outro Mn³⁺ é formado a partir do Mn²⁺, levando à geração da enzima nativa e à liberação de uma segunda molécula de água (HOFRICHTER, 2002). Adaptado de Datta, et al. 2017.

Outra grande família de enzimas capazes de degradar a lignina, se trata das lacases. As lacases (Lac) constituem a família de oxidases multicobre, e atuam oxidando o substrato. A lacase foi extraída pela primeira vez na planta *Rhus vernicifera* em 1883, por Yoshida. Um pouco depois, em 1896, foi comprovada pela primeira vez a sua presença em fungos, por Bertrand e Laborde. Desde então, muitos tipos de lacases foram identificadas em fungos, onde os fungos da podridão branca recebem destaque. As lacases podem ser divididas em dois grandes grupos: derivadas de plantas e derivadas de fungos. Essas enzimas são capazes de degradar a lignina na ausência de MnP e LiP. (DATTA, et al. 2017; MAYER, STAPLES, 2002).

A quantidade de substratos que a lacase pode utilizar é muito ampla. Qualquer composto semelhante a um difenol (fenol com dois grupos OH) pode servir como substrato. Vários tipos de poluentes podem ser degradados pela lacase, entre eles: derivados de petróleo (Polihidroxialcanoatos, PHAs),

tintas, plásticos, papel e celulose, fenóis e polifenóis. Existem algumas lacases fúngicas que podem, ainda, degradar compostos como cresol, e até mesmo o ácido ascórbico. Esse amplo espectro de substratos pode ser explicado pela atuação de mediadores, juntamente com a enzima. Mediadores são compostos de pequena massa molecular que são oxidados pela lacase, e depois reduzidos pelo substrato. (MAYER; STAPLES, 2002; OKINO-DELGADO, et al. 2019).

O sítio ativo de cada molécula de lacase possui quatro sítios de cobre: tipo 1 (T1, um átomo de cobre), tipo 2 (T2, um átomo de cobre) e tipo 3 (T3, dois átomos de cobre). Nas enzimas em seu estado natural, todos os quatro átomos estão no estado oxidativo 2+. O mecanismo de ação dessa enzima (figura 7) se dá por quatro oxidações envolvendo um elétron de um substrato redutor, juntamente com duas reduções de dois elétrons de dióxido de oxigênio em água. Então, em termos estequiométricos, há quatro moléculas de substrato redutor para cada oxigênio molecular, envolvendo uma transferência de um total de quatro elétrons (YARAPOLOV, et al. 1994; WONG, 2008).

Na atuação da lacase sobre moléculas fenólicas, como a lignina, há a catálise da subtração de um elétron de grupos hidroxila fenólicos para formar radicais fenoxil, que geralmente vão sofrer polimerização via acoplamento de radicais. A reação também envolve uma desmetilação, resultando na clivagem de anéis aromáticos, presentes na estrutura da lignina (figura 2) (WONG, 2008).

Frequentemente, os substratos utilizados pela lacase não podem sofrer oxidação diretamente, seja por sua cadeia grande ou porque eles possuem um potencial redox particularmente alto. Essa limitação pode ser contornada através da utilização de mediadores químicos (figura 8). Esses mediadores são compostos que agem como substratos intermediários para a lacase, e suas formas oxidadas são capazes de interagir com o grande volume e o alto grau redox dos substratos da enzima (RIVA, 2006).

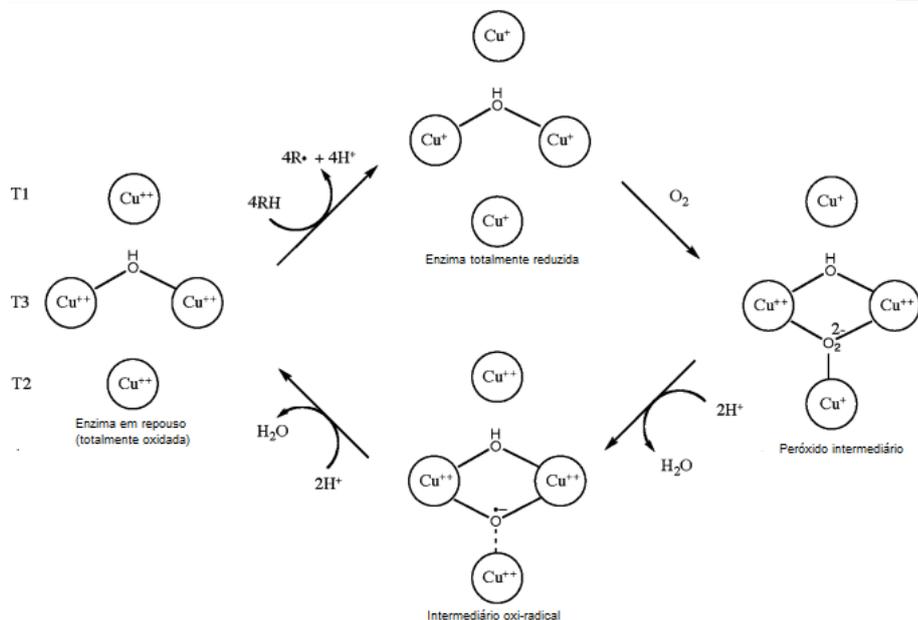


Figura 7: Ciclo catalítico da lacase. O primeiro passo é a redução do substrato pelo cobre (Cu^{2+} a Cu^+) no sítio T1, que é o primeiro acceptor de elétrons. Os elétrons “extraídos” da redução do substrato são transferidos ao sítio trinuclear T2/T3, resultando na conversão de um estado natural (totalmente oxidado) da enzima a um estado totalmente reduzido. Uma oxidação de $4e^-$ precisa acontecer para que a enzima seja totalmente reduzida. A redução do dioxigênio ocorre em duas etapas. A molécula de dioxigênio se liga ao sítio T2/T3, e dois elétrons são transferidos para os cobres do sítio T3, resultando na formação de um peróxido intermediário. O intermediário peróxido decai a um radical oxi e sofre uma clivagem reductora de $2e^-$ da ligação O-O com a liberação de uma molécula de água. Na última etapa, todos os quatro centros de cobre são oxidados e O_2 é liberado como uma segunda molécula de água. Adaptado de Wong, 2008.

A capacidade dos fungos degradarem a atrazina é bastante estudada ao redor do mundo, porém poucas pesquisas apresentam soluções para realizar a retirada desse xenobiótico que causa tanto impacto no meio ambiente. Pesquisas mais atuais possuem um foco em tentar melhorar a biodegradação desse agrotóxico pelos fungos. O grande problema da atrazina é a sua contaminação em corpos d’água, pois é a via mais fácil para o pesticida chegar ao ser humano e outros animais. Castro-Gutiérrez et al (2019) realizaram um processo de bioaumentação utilizando consórcio de fungos juntamente com bactérias, como um sistema de biopurificação de águas contaminadas. Já

Marinho et al (2017) avaliaram a capacidade do fungo *Aspergillus niger* na degradação de atrazina em águas residuais. A tabela 3 apresenta outros exemplos de estudos feitos nessa área.

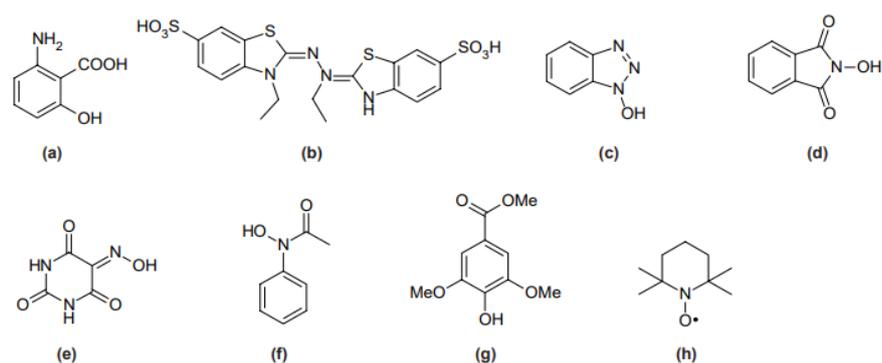


Figura 8: Alguns mediadores químicos utilizados pela lacase. (a) Ácido 3-hidroxiantranílico (HAA); (b) ABTS; (c) N-hidroxibenzotriazol (HBT); (d) N-hidroxiptaimida (HPI); (e) Ácido violúrico (VLA); (f) N-hidroxiacetanilida (NHA); (g) Metil ester do ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzoico (ácido siríngico); (h) 2,2,6,6-tetrametilpiperidina1-yloxi (TEMPO) (Riva, 2006).

As rotas metabólicas de degradação de atrazina por espécies microbianas acontecem por vias hidrolíticas ou vias que são uma mistura entre hidrolítica e oxidativa. Em uma dessas vias, a atrazina é transformada em ácido cianúrico, onde o cloreto e as cadeias laterais N-aquil são removidas da molécula (figura 9). Considera-se que os fungos são responsáveis por fazer a N-dealquilação das cadeias laterais da atrazina, para que as bactérias continuem a degradação desse pesticida. Como já foi citado, os fungos conseguem degradar a atrazina por causa de enzimas como a peroxidase, a lacase e a oxidase. Porém, há vias metabólicas intracelulares que também participam dessa biodegradação. Isso pode ser observado na figura 10. (SINGH et al., 2018; SINGH & SINGH, 2016; MARINHO, et al. 2017; LEVANON, 1993).

Tabela 3: Alguns estudos recentes realizados na área de biodegradação de atrazina por fungos.

Título do trabalho	Objetivo	Referência
Fungal and Bacterial Co-Bioaugmentation of a Pesticide-Degrading Biomixture: Pesticide Removal and Community Structure Variations during Different Treatments	Elaboração de uma biomistura complementada pela adição de <i>Trametes versicolor</i> para avaliar a eliminação de uma mistura de herbicidas sob diferentes condições de tratamento	CASTRO-GUTIÉRREZ, Víctor et al., 2019.
Potential of the filamentous fungus <i>Aspergillus niger</i> AN 400 to degrade Atrazine in wastewaters	Avaliar a capacidade da espécie <i>A. niger</i> AN 400 em metabolizar atrazina em águas residuais modelo	MARINHO, G. et al., 2017.
Atrazine degradation by fungal co-culture enzyme extracts under different soil conditions	Determinação da degradação de atrazina por extratos de enzimas fúngicas num microcosmo de solo argiloso contaminado à taxa aplicada em campo; estudo das diferentes condições de solo	CHAN-CUPUL, Wilberth; HEREDIA-ABARCA, Gabriela; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, Refugio. 2016.
Immobilization of the white-rot fungus <i>Anthracoxyllum discolor</i> to degrade the herbicide atrazine	Formular um suporte peletizado para imobilizar o fungo <i>Anthracoxyllum discolor</i> para melhorar a sua capacidade de degradar a atrazina, utilizando um sistema de biopurificação	ELGUETA, Sebastian et al., 2016.
Transcriptome analysis of <i>Glomus mosseae</i> / <i>Medicago sativa</i> mycorrhiza on atrazine stress	Avaliar o efeito de <i>Glomus mosseae</i> / <i>Medicago sativa</i> micorrízicos na degradação da atrazina	SONG, Fuqiang et al, 2016.

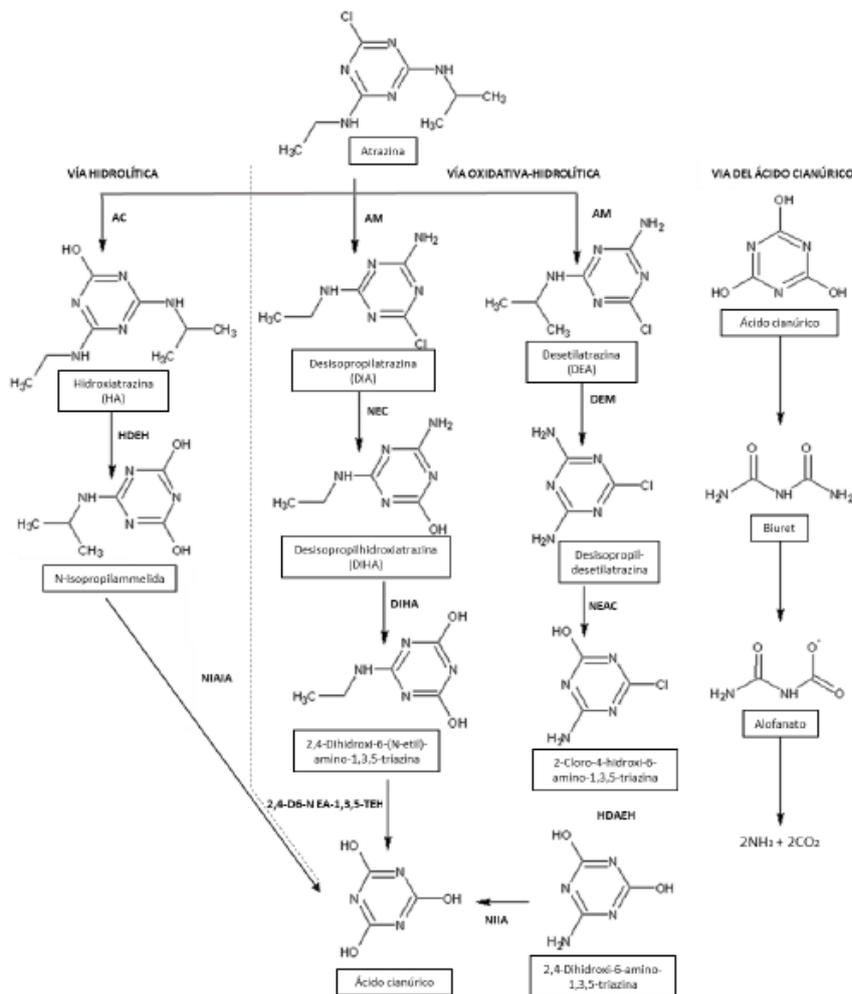


Figura 9: Vias de degradação de atrazina. À esquerda: conversão da atrazina em ácido cianúrico (intermediário comum). À direita: via de degradação do ácido cianúrico. Fonte: Esparza Naranjo, 2018.

2.3 BIOCHAR

A biomassa, que se trata de qualquer material orgânico que provém de organismos que armazenam energia (principalmente carbono) pode ser utilizada para a produção de combustíveis sólidos, líquidos e gasosos, visando a substituição de combustíveis fósseis utilizados pelo ser humano. Porém, altos teores de carbono presentes na biomassa a tornam muito

suscetível à degradação natural. O biochar (ou biocarvão, em português) vem como uma alternativa para “estocar” essa matéria orgânica da biomassa (por mais de 100 anos) através de um tratamento térmico, como a pirólise. A pirólise é feita em uma temperatura entre 300 e 1000°C, na ausência de oxigênio e sem a presença de solventes (WEBER, QUICKER et al. 2018; LENG, et al. 2019).

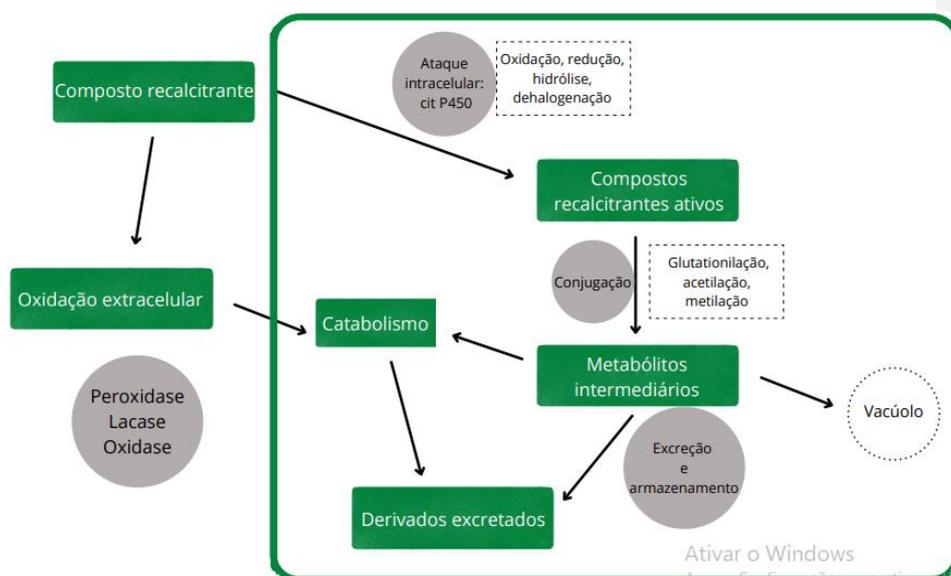


Figura 10: Mecanismos fúngicos de biodegradação de compostos poluentes e recalcitrantes. As enzimas peroxidase, oxidase e lacase fazem parte de vias metabólicas extracelulares, enquanto o citocromo P450 monooxigenase faz parte de vias metabólicas intracelulares de biodegradação. Fonte: Deshmukh et al., 2016.

A pirólise feita para a produção do biochar resulta em três produtos: um gás, um bio-óleo e um biocarvão sólido. A proporção entre esses três produtos depende muito da taxa de aquecimento (tabela 4). A pirólise lenta (onde o aquecimento é feito por segundos ou minutos) pode ser implantada como um processo contínuo, onde a matéria-prima (livre de oxigênio) é transportada através de um forno aquecido externamente (com um fluxo de gás que remove gás voláteis, e o carvão emergindo na outra extremidade). Já a pirólise rápida depende de uma transferência muito rápida de calor. O caráter do produto carbonizado formado ao final do processo é afetado pela extensão da pirólise (temperatura máxima atingida) e pelo tempo de permanência no forno.

Essa carbonização (pirólise) decompõe parte da biomassa, mas mantém uma grande parte do seu teor de carbono (MCMILLAN, 2018; SOPHI, et al. 2010; WEBER, QUICKER, 2018).

Tabela 4: Proporção de produtos formados a partir de cada tipo de pirólise.

Processo	% Líquidos (bio- óleo)	% sólidos (biocarvão)	% gases
Pirólise rápida: temperatura moderada (~500°C), curto tempo de permanência em vapor quente (2s)	75 (25% de água)	12	13
Pirólise intermediária: temperatura de baixa a moderada, tempo de permanência em vapor quente moderado	50 (50% de água)	25	25
Pirólise lenta: temperatura alta (>800°C), longo tempo de permanência em vapor quente.	5 (5% de água)	10	85

Adaptado de Sophi et al. 2010.

O biochar possui um grande espectro de aplicação, podendo ser utilizado para produzir calor (energia), limpeza de gases de combustão, também possui aplicação na agricultura e pecuária, em materiais de construções e também na área da saúde. Nos últimos anos, vem ganhando bastante visibilidade na aplicação visando substituir combustíveis fósseis. Na área agrícola, especificamente, o biochar já demonstrou ter grande eficiência no tratamento de solos contaminados, reduzindo a biodisponibilidade de certos xenobiótico e reduzindo, assim, a transferência desses poluentes para as culturas agrícolas. O biochar também pode ajudar no desenvolvimento dos cultivos (como um tipo de fertilizante) aumentando seu rendimento, bem como pode ajudar na revegetação de solos poluídos (O'CONNOR, et al. 2018; WEBER, QUICKER, 2018).

Sendo assim, a utilização do biochar em solos vem despertando muito interesse para a proteção do meio ambiente do solo, através do sequestro de carbono, remediação, conservação do solo e aumento de produção agrícola. Um dos parâmetros utilizados para avaliar a capacidade de sequestro de

carbono de um biochar é a sua resistência às degradações bióticas e abióticas as quais ele está suscetível. A Iniciativa Internacional do Biochar (International Biochar Initiative – IBI) reuniu pesquisadores renomados do mundo inteiro, que propuseram que a razão entre H/C orgânico é um indicador de estabilidade adequado para avaliar o biochar. Ainda assim, pesquisadores continuam explorando outras maneiras de avaliar a estabilidade do biochar (LENG, et al. 2019; WEBER, QUICKER, 2018).

De uma maneira geral, existem três maneiras de avaliar a estabilidade de um biochar (atualmente): a qualificação ou quantificação (direta ou indireta) das estruturas de carbono presentes no biochar (como os graus de compostos aromáticos); qualificação ou quantificação de carbono estável ou instável através de uma oxidação termoquímica; persistência do biochar avaliada pela incubação em solo e por um modelo de mineralização de carbono (LENG, et al. 2019).

Apesar de possuir vários efeitos positivos, o biochar também pode trazer efeitos negativos ao solo e sua composição microbiana. Gaur e Adholeya (2000) descobriram que o biochar pode limitar a quantidade de fósforo que é absorvida pelas plantas, quando comparado a meios sem o biochar. Outros pesquisadores também relataram uma redução na disponibilidade de carbono orgânico e nitrogênio no sistema micorrízico. Os efeitos negativos causados pelo biochar podem ser explicados por causa da relação C/N alta que esse composto possui, o que pode levar à uma imobilização do nitrogênio (WARNOCK, et al. 2007).

Com o passar dos anos, o biochar vem chamando atenção para a sua aplicação em atividades agrícolas pois é capaz de estimular a fertilidade (biológica) do solo. Já foi demonstrado que esse composto é capaz de aumentar a retenção de água no solo, por causa da sua área de superfície que é alta. Os biochars também têm altas concentrações de nutrientes relevantes para as plantas e as atividades agrícolas, como por exemplo o fósforo. O biocarvão também pode aumentar o crescimento da planta em diferentes graus, e oferecer uma resposta positiva em condições de estresse por seca. Além disso, alguns estudos relatam o aumento da colonização micorrízica em resposta ao biochar, em contradição com outros trabalhos acima relatados. Isso pode ser explicado

porque o biochar proporciona um micro-habitat favorável, tanto para fungos como bactérias e os fungos podem realizar sua esporulação dentro do biocarvão (SOLAIMAN, et al. 2019).

2.3.1 Qualidade do solo agrícola e aplicação do Biochar

O solo é composto por matéria inorgânica (minerais) e matéria orgânica (produto de decomposição). Além dos componentes sólidos, também estão presentes no solo componentes líquidos e gasosos, que ocupam os poros ali presentes. A fase líquida é responsável pela nutrição das plantas e a fase gasosa é a que fornece oxigênio (e outros gases também) às raízes vegetais e outros organismos que vivem no solo. Em conjunto, todos os componentes auxiliam no desenvolvimento de plantas e de outros organismos que ali habitam. Um solo saudável é aquele que possui a capacidade de sustentar sua atividade biológica e prover saúde para todos os organismos que dependem dele. (EMBRAPA, 2013; ROESE, 2018).

Um solo degradado é aquele que apresenta um declínio persistente da sua capacidade de fornecer serviços ao ecossistema. Apesar das tentativas ao redor do globo para impedir a degradação do solo, as áreas afetadas continuam aumentando. A degradação do solo com o passar dos anos vem apresentando uma grande ameaça à segurança alimentar. Vários fatores são associados à essa degradação, incluindo a irresponsável prática agrícola que ignora os processos naturais que ocorrem no solo e o quanto isso é benéfico para o agroecossistema (KURIA, et al. 2018; CROSSLAND, et al. 2018).

Para avaliar a qualidade do solo e a sua taxa de degradação, utilizam-se alguns indicadores que podem ser químicos, físicos e biológicos. Os indicadores químicos avaliam a matéria orgânica presente no solo, ciclagem de nutrientes, pH, quantidade de carbono orgânico, nitrogênio total e as relações hídricas. Para o agroecossistema, os parâmetros de maior relevância são a matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes. Por causa das práticas de manejo agrícola, a matéria orgânica pode ser alterada, e ela também está correlacionada com outras propriedades do solo. Então, sua alteração, culmina na modificação de outros parâmetros também. O processo de ciclagem também pode sofrer um

desequilíbrio que resulta dos processos de mineralização dos poluentes (BARRIOS, 2007; MIELNICKZUK, 1999).

Os indicadores físicos são importantes pois estão envolvidos no suporte ao crescimento das raízes, armazenamento de água e nutrientes, além de possuírem papel importante nas trocas gasosas e na atividade biológica. Esses indicadores estão relacionados com a compactação, espessura, porosidade, resistência à penetração, retenção de água, condutividade hidráulica e estabilidade de agregados (SCHLOTTER et al., 2003). Todas essas características encontram-se intimamente relacionadas com o desenvolvimento vegetal e também de outras espécies que habitam no solo, como microrganismos, alguns deles possuindo papéis importantes como indicadores biológicos.

Os indicadores biológicos são as espécies microbianas, vegetais e animais que estão no solo e desempenham funções importantes para o funcionamento do ecossistema. Os microrganismos presentes no solo possuem papel importante na decomposição de compostos orgânicos, sendo de grande importância no agroecossistema também, pois eles realizam uma ciclagem de nutrientes (fazendo possível a assimilação desses nutrientes pelas plantas), bem como desintoxicam o solo que pode conter moléculas contaminantes (SCHLOTTER et al., 2003).

Desses indicadores, as micorrizas são os mais importantes e mais eficientes na estruturação do solo. As micorrizas formam uma rede de hifas que melhora as características físicas do solo e a resistência à erosão. Além disso, uma grande diversidade fúngica torna o solo mais resistente a estresses e a doenças do solo, assim mantendo maiores chances de manter seus processos ecológicos após algum distúrbio no ecossistema. As atividades agrícolas estão intimamente relacionadas com o desbalanço desses indicadores citados (ROESE, 2018; ASMELASH, et al., 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Selecionar fungos capazes de crescer em ambientes contaminados com atrazina para aplicações de biorremediação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar para os testes fungos isolados de solo agrícola da Coleção de Cultura de Micro-organismos de Importância Biotecnológica e Ambiental – CCMIBA, da UNILA;
- Comparar o peso seco de massa fúngica entre os cultivos com e sem atrazina;
- Avaliar o potencial de diminuição da toxicidade da atrazina nos cultivos fúngicos através do teste com *Allium cepa*.
- Avaliar a redução da atrazina após o cultivo fúngico.
- Avaliar o potencial dos fungos testados para o desenvolvimento de um bioinoculante para biorremediação de solos agrícolas impactos com atrazina.

4 METODOLOGIA

4.1 CULTIVO DOS FUNGOS

Para o desenvolvimento do experimento foram avaliados os fungos pertencentes à Coleção de Cultura de Micro-organismos de Importância Biotecnológica e Ambiental – CCMIBA, da UNILA, obtidos no trabalho intitulado "Avaliação da diversidade genética e funcional de fungos filamentosos em solo com atrazina" em desenvolvimento pelo grupo de pesquisa coordenador pela Profa. Rafaella Costa Bonugli Santos.

Após análise do banco de dados da coleção, foram selecionados três fungos para a realização dos experimentos. Esses fungos haviam sido previamente testados qualitativamente para a produção de enzimas ligninolíticas, e todos testaram positivo. Esses fungos foram identificados como *Bjerkandera* sp. (R111), *Clonostachys rosea* (R018) e *Purpureocillium lilacinum* (R014). Em adição, para a elaboração do consórcio e inoculação no Biochar é importante que os isolados sejam capazes de crescer em conjunto, sem que haja inibição. Assim, os fungos selecionados foram submetidos ao teste de antagonismo paralelamente a este projeto pelo grupo de pesquisa.

A primeira etapa deste experimento foi a reativação dos isolados em meio malte 2% sólido (tabela 5). Posteriormente, esses fungos foram passados para meio líquido.

Tabela 5: Composição do meio utilizado para o cultivo dos fungos.

Componente	Concentração
Malte	2%
Ágar	1,5%
Peptona	0,2%

4.2 CRESCIMENTO FÚNGICO EM MEIO LÍQUIDO CONTENDO ATRAZINA

Os fungos previamente cultivados em meio sólido foram transferidos para meio MA2 líquido (tabela 5, sem adição de Ágar). Nesse teste,

foi feita a divisão dos ensaios em dois lotes. No lote 1, o meio de cultivo continha atrazina. No lote 2, o cultivo foi feito apenas com o meio malte 2%, sem atrazina (cultivo controle). Esse teste foi feito num volume de 100 mL por réplica, em erlenmeyers de 125 mL. Cada fungo em cada lote foi cultivado em tréplica.

Para o lote 1 (ensaio em que continha atrazina), foi utilizada a atrazina comercial, de marca desconhecida, adquirida como doação, que tinha na composição 900 g/kg de atrazina. Ela foi diluída em 1 g/L de água deionizada esterilizada. Antes de ser adicionada ao meio de cultivo, a solução de atrazina foi filtrada em filtros de seringa de 0,22 µm. Em ensaios anteriores, essa atrazina demonstrou contaminação, então essa filtração foi feita para evitar que isso acontecesse. Após filtração, foram adicionados 10 mg/L da solução de atrazina aos ensaios do lote 1.

Além dos ensaios com fungos, também foi realizado um ensaio de controle negativo. Neste, não foi inoculado nenhum fungo, contendo apenas o meio de cultivo com atrazina. Todos os erlenmeyers foram colocados para cultivo em shaker, a 140 rpm e 28°C, por um período de 10 dias.

4.3 PESO SECO DOS FUNGOS

Passados os 10 dias de cultivo, as amostras foram retiradas do shaker e tiveram seu extrato líquido separado da massa celular. Para isso, utilizou-se um funil e papel filtro. Os extratos foram filtrados e armazenados na geladeira, enquanto a massa celular foi colocada em placas de Petri para secagem em estufa (80°C).

As amostras que continham o fungo R014 precisaram ser centrifugadas para que fosse possível realizar a separação da massa celular e do extrato devido a característica do crescimento (produção de esporos). A secagem dos fungos foi acompanhada dia após dia, e as amostras secas pesadas.

4.4 ANÁLISE QUANTITATIVA DA DEGRADAÇÃO DA ATRAZINA

O mesmo experimento descrito no item 4.3, para o lote 1 e controle foi repetido em volume (500 mL) para ser enviado à cromatografia.

Todas as réplicas foram mantidas no shaker a 140rpm e 28°C por 10 dias.

Como descrito anteriormente, neste ensaio também foi feita a separação da massa celular e do extrato líquido. Porém, neste caso, a massa celular foi descartada, e somente o extrato líquido foi armazenado, em frascos de 500 mL autoclavados. Esses ensaios foram enviados ao Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP), localizado no campus da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), no Rio Grande do Sul, para análise da concentração de atrazina por cromatografia. O método de extração utilizado foi em fase sólida (SPE) e as amostras analisadas usando cromatografia líquida acoplada ao espectrofotômetro de massa (LC-MS/MS), com um limite de detecção de 0,300 µg/L e limite de quantificação de 1 µg/L

4.5 ENSAIOS DE TOXICIDADE COM *ALLIUM CEPA*

Primeiramente, as cebolas foram descascadas e tiveram suas raízes cortadas por completo. Então, elas foram colocadas com a raiz submersa em água destilada autoclavada para avaliar se estavam com a atividade de crescimento de raiz inibida. As cebolas foram deixadas nesse estado por cinco dias, e as que não apresentaram crescimento na raiz foram descartadas.

As cebolas selecionadas tiveram suas raízes colocadas de maneira submersa nos extratos obtidos nos ensaios descritos no item 4.2 Cada cebola foi colocada em um extrato diferente, em trélicas. Nesse ensaio também utilizou-se um tratamento somente com água destilada autoclavada, como controle positivo, e um tratamento com uma solução concentrada de atrazina, como controle negativo (figura 11). Todos os ensaios foram feitos em tréplica, e as cebolas foram retiradas dos extratos após 7 dias.



Figura 11: Experimento com os extratos fúngicos e *Allium cepa*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando a aparência dos fungos, todos apresentaram um crescimento regular (figura 12). Comparando os dois lotes, com e sem atrazina, não foi notada nenhuma diferença significativa na aparência dos cultivos. Além disso, o controle negativo, que não apresentava nenhum inóculo (apenas a atrazina filtrada), não apresentou crescimento de nenhum contaminante (figura 15).

Em um ensaio realizado anteriormente com a atrazina não filtrada, notou-se crescimento no controle negativo de uma massa celular, muito provavelmente alguma levedura ou bactéria, dado o aspecto do meio de cultivo. Algumas gotas desse ensaio foram colocadas em meio sólido numa placa de Petri para identificar se realmente havia algum contaminante, como mostra a figura 13. Por este motivo optou-se pela filtragem da atrazina antes da sua adição aos ensaios.

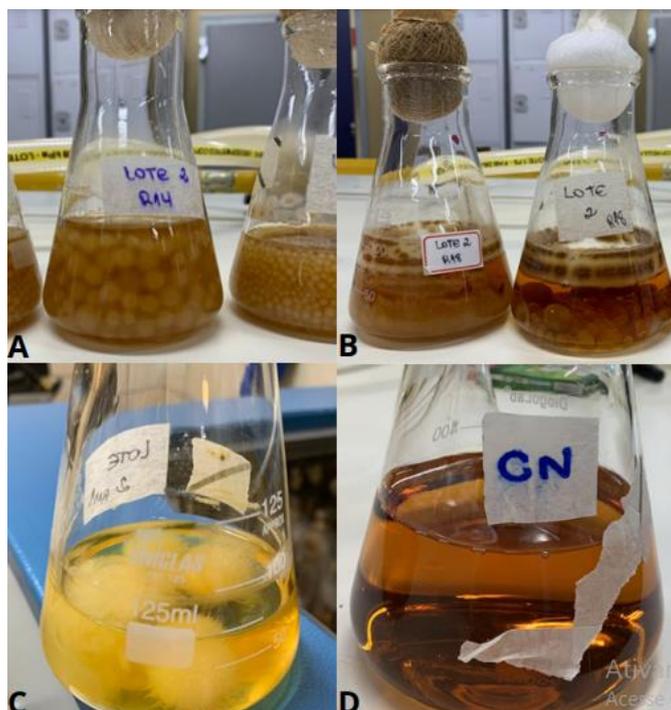


Figura 12: Aspecto morfológico dos ensaios realizados. (A) *Purpureocillium lilacinum* (CCMIBA_R014); (B) *Clonostachys rosea* (CCMIBA_R018); (C) *Bjerkandera* sp. (CCMIBA_R111); (D) Controle negativo (sem inóculo).

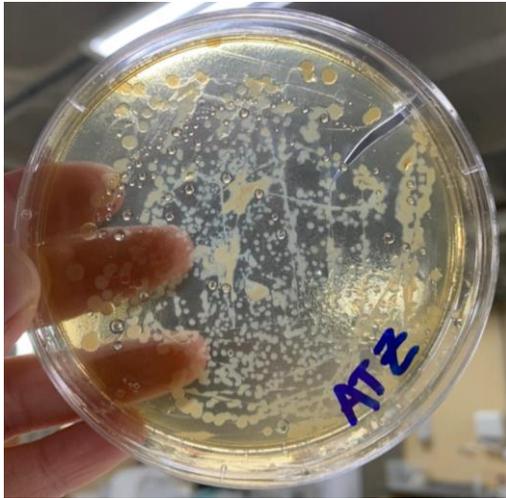


Figura 13: Resultado do cultivo de uma amostra de atrazina em meio sólido, pré-filtragem.

No ensaio de toxicidade com *Allium cepa*, não foram atingidos resultados favoráveis. Nas amostras com atrazina concentrada (controle positivo de toxicidade), observou-se crescimento das raízes da cebola. Este resultado não é esperado pois a atrazina apresenta toxicidade para esse tipo de atividade. Logo, as raízes não deveriam ter crescido. Além disso, as cebolas que foram colocadas nos extratos tirados dos crescimentos com fungo não apresentaram crescimento de raiz, e observou-se crescimento fúngico nessas cebolas (figura 14).



Figura 14: Crescimento fúngico nas cebolas utilizadas no experimento.

O trabalho de Esparza-Naranjo et al. 2019 realizou um estudo similar para avaliar o potencial de detoxificação da atrazina por fungos ligninolíticos. Entretanto, os autores utilizam a atrazina ultra pura para a análise. Como o presente trabalho fez uso da atrazina comercial acredita-se que a característica da formulação comercial tenha permitido o crescimento da raiz no controle positivo. O composto comercial pode possuir na sua formulação emulsificantes, espessantes, dispersantes, conservantes e outros compostos que podem diminuir a toxicidade no teste com *Allium cepa*.

O crescimento do *P. lilacinum* CCMIBA R014 está representado na tabela 6. Observa-se que o lote 2 (ensaio que não continha atrazina) apresentou valores maiores do que o lote 1 (ensaio que continha atrazina), o que fica mais claro quando se compara as médias. Isso é um importante indicativo de que este fungo pode não tolerar muito bem o pesticida, tornando-o um fraco candidato para o estudo quando relacionado ao cultivo com atrazina. Além disso, o valor de p significativo (p-valor 0,001855) confirma a diferença entre os ensaios (lote 1 e lote 2).

Tabela 6: Peso seco do fungo *P. lilacinum* CCMIBA_R014 cultivado na presença (lote 1) e ausência da atrazina (lote 2).

Biomassa (mg)		
Réplica	Lote 1	Lote 2
A	270,4	843
B	396,4	741,6
C	384,9	924,1
Média	350,5	836,2

A micorremediação (remediação realizada por fungos) vem sendo relatada em diversos estudos. Esses estudos incluem tratamento de solos e corpos d'água, que foram poluídos pelos mais diversos tipos de contaminantes. Um dos fungos que vem sendo citado com bastante recorrência é o *Purpureocillium lilacinum* (identificado como *P. lilacinum* CCMIBA R014 no presente estudo), principalmente pelo seu potencial de ftalatos, compostos empregados na produção de telhas de vinil e dispositivos médicos,

providenciando flexibilidade aos plásticos. Os ftalatos são compostos aromáticos, assim como a atrazina. *P. lilacinum* merece uma atenção especial por outro motivo: sua capacidade de controle biológico com nematoides que atacam as plantas (KEPENEKCI et al, 2018; AKHTAR & MANNAN, 2020).

O gênero *Purpureocillium* foi, inicialmente, introduzido na taxonomia com o nome de *Paecilomyces*. A mudança na sua nomenclatura foi introduzida por Luangsa-ard et al. (2011), onde o gênero *Purpureocillium* foi criado para acomodar a espécie *Paecilomyces lilacinus*. Essa nova taxonomia foi proposta, principalmente, pela natureza polifilética que o gênero *Paecilomyces* possuía. Este fungo se trata de um filamento sapróbico, presente em solos, vegetação em decomposição, insetos e nematoides. Além disso, ele pode causar infecções em animais vertebrados, incluindo o ser humano. Morfologicamente, *P. lilacinum* possui uma coloração lilás, possui esporos, e não apresenta formação de clamidósporos (figura 15) (BARON et al, 2020; LUANGSA-ARD et al, 2011).

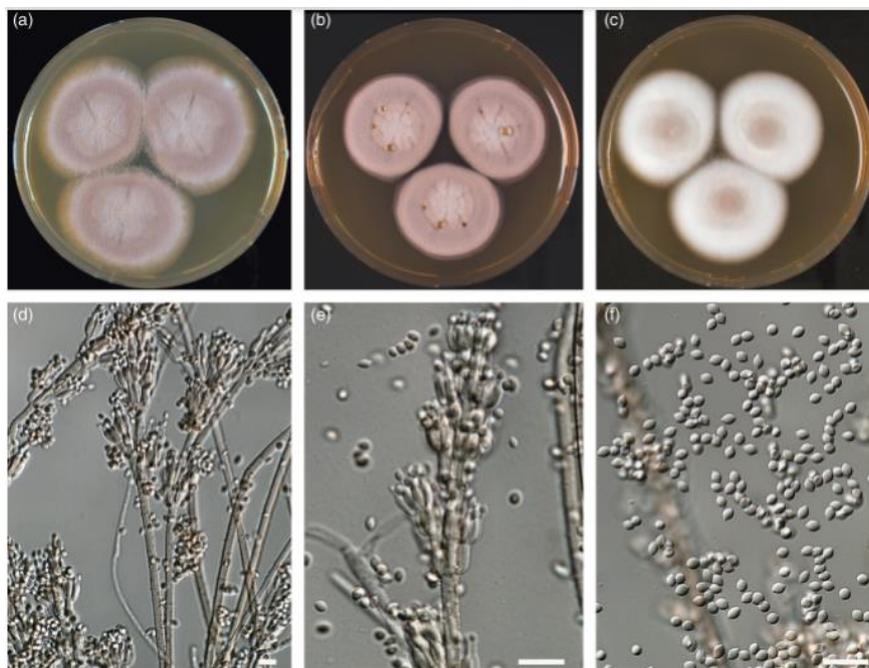


Figura 15: *Purpureocillium lilacinum* após cultivo de 14 dias em meio de cultivo com extrato de malte (a-c); (d, e) conidióforos bem definidos; (f) conídios fusiformes. Fonte: Luangsa-ard et al, 2011.

Contudo, apesar do baixo crescimento na presença da atrazina, *P. lilacinum* CCMIBA_R014 foi selecionado do banco de dados devido sua característica no controle biológico, como um suporte biológico para o sistema de biorremediação. Nematoides causam grandes impactos anualmente no mundo todo, o que torna esse fungo de extrema importância, considerando a urgência que é a diminuição na utilização de agrotóxicos por seus riscos apresentados ao meio ambiente e à saúde humana. O fungo *Purpureocillium lilacinum* já apresentou efetividade no combate a nematoides fitoparasitários como *Meloidogyne* spp. e *Globodera* spp., além de também atuar contra entomopatógenos (KEPENEKCI et al, 2018; DAS et al, 2020).

Estudos apontam que o fungo *P. lilacinum* apresenta resistência aos mais variados produtos químicos, incluindo produtos comumente utilizados na agricultura como inseticidas. Além disso, pode até mesmo ter seu crescimento estimulado por alguns agentes presentes em inseticidas. Alguns herbicidas como atrazina e glifosato podem apresentar toxicidade, mas não em números significativos (ONDRÁČKOVÁ et al, 2019).

Assim como o *P. lilacinum*, *Clonostachys rosea* (*C. rosea* CCMIBA_R018) também é um fungo utilizado no controle biológico, porém ele atua como um micoparasitário. *C. rosea* CCMIBA_R018 (tabela 7) apesar de não apresentar diferença significativa entre os lotes (p-valor 0,368537), pode ter sofrido variação no crescimento na presença de atrazina (lote 1). A ausência de significância deve-se provavelmente a grande variação entre as réplicas. A esporulação é um efeito do crescimento que dificulta a análise através do peso seco, diminuindo a biomassa. As fases do crescimento vegetativo e a produção de esporos podem ser regulados de forma diferente (SUN et al, 2013), o que pode ter resultado na grande variação entre as réplicas.

C. rosea anteriormente fez parte do gênero *Gliocladium* mas, com o passar do tempo, notou-se muita diferença do fungo para com o restante do gênero. *Clonostachys* é um ascomiceto endofítico amplamente distribuído em todo o mundo, principalmente na América do Sul. É comumente encontrado em isolados de solo e nas raízes de diferentes tipos de plantas, como também em alguns insetos e nematoides (SUN et al, 2020; SARAIVA et al, 2014; ANWAR et al, 2018). É um fungo esporulado, e apresenta conídios e clamidósporos. As

cores da sua colônia variam entre branco-acizentado e amarelo/laranja, dependendo da luminosidade do ambiente. O meio de cultivo mais utilizado é o de dextrose de batata (figura 16) (SUN et al, 2020).

Tabela 7: Peso seco do fungo *C. rosea* CCMIBA_R018 cultivado na presença (lote 1) e ausência da atrazina (lote 2).

Réplica	Biomassa (mg)	
	Lote 1	Lote 2
A	781,3	456,3
B	361,7	541,2
C	231,9	1642,3
Média	458,3	879,9

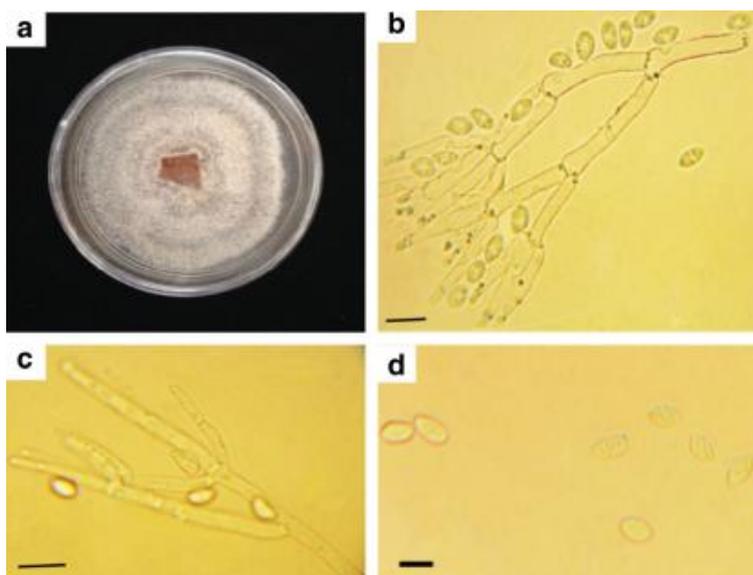


Figura 16: (a) Morfologia do *C. rosea* em meio de cultivo BDA; (b, c) conidióforos; (d) conídios.

Fonte: Afshari & Hemmati, 2017.

C. rosea atua, principalmente, em patógenos presentes na rizosfera, como por exemplo fungos das espécies de *Fusarium*. *C. rosea* foi objeto de estudo para decomposição de alguns alquilfenóis, que são utilizados principalmente na fabricação de detergentes, pesticidas e emulsificantes. Esses

estudos relatam que, entre os pesticidas existentes, apenas fungicidas apresentam inibição no crescimento de *C. rosea.*, resultado não observado em inseticidas e herbicidas (CHANG et al, 2020; MACEDO et al, 2012; NYGREN et al, 2018).

Os resultados dos ensaios para *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 estão apresentados na tabela 8, não houve diferença estatística (p-valor 0,840332) entre os lotes e mesmo com variação entre algumas réplicas as médias foram similares. Esses resultados são promissores e confirmam o potencial desse gênero para a degradação da atrazina.

Tabela 8: Peso seco do fungo *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 cultivado na presença (lote 1) e ausência da atrazina (lote 2).

	Biomassa (mg)	
Réplica	Lote 1	Lote 2
A	155,9	189,8
B	157,4	512,6
C	463,3	171,4
Média	258,9	291,3

Fungos do gênero *Bjerkandera*, como o fungo avaliado no presente trabalho (*Bjerkandera*, sp. CCMIBA_R111) é um fungo que faz parte do grande grupo dos fungos da podridão branca (WRF – White-Rot Fungi), muito conhecidos pela sua degradação de compostos recalcitrantes que comumente poluem solos e corpos d’água, fazendo essa degradação por meio das enzimas ligninolíticas. Além disso, *Bjerkandera* sp. apresenta capacidade de biorremediar solos poluídos por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (conhecidos como PAH) (KOTTERMAN et al, 1998; BARDI et al, 2017; TRIPATHI et al, 2012). Esse gênero faz parte do grande grupo do Filo Basidiomycetos, de aparência branca. Esse fungo geralmente cresce em madeira de angiospermas mortas, e possui ampla distribuição no mundo inteiro (WANG et al, 2021)

Esse fungo já é muito conhecido pelo seu potencial de biorremediação, e são incontáveis os estudos realizados utilizando-o (tabela 9). A espécie mais comumente estudada é *B. adusta* (figura 17). Mais recentemente,

ensaios proteômicos estão sendo realizados para entender melhor a interação desse fungo com o meio ambiente. Nas figuras 17 e 18 é possível observar melhor o cultivo desse fungo *in natura* e em meio com extrato de malte.

Tabela 9: Estudos realizados com *Bjerkandera* sp. na biorremediação.

Composto estudado	Referência
PHA	KOTTERMAN et al, 1998
Dibenzotiofeno, fluoranteno, pireno, criseno	VALENTIN et al, 2007
Hexaclorociclohexano (HCH)	QUINTERO et al, 2007
Antraceno	FIELD et al, 1995
Pentaclorofenol	RUBILAR et al, 2007
Toxafeno	LEÓN-SANTIESTEBAN & RODRIGUEZ-VÁZQUEZ, 2017
Resíduos da indústria têxtil	ROBINSON & NIGAN, 2008
Pesticidas halogenados	DAVILA-VAZQUEZ et al, 2005
Nitrofenóis	TRIPATHI et al, 2011
Tiomorfolina	ERMAKOVA, 2008



Figura 17: *Bjerkandera adusta* encontrado no tronco de árvores. Fonte: desconhecida.

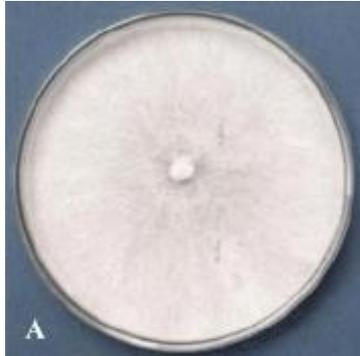


Figura 18: Crescimento do fungo *Bjerkandera* sp. em meio malte. Fonte: Kornilowicz-Kowalska & Rybczyńska, 2012.

Nas tabelas 10, 11 e 12 é possível observar os resultados do teste de ANOVA para os fungos estudados no presente trabalho. Pode-se observar que, para o *P. lilacinum* CCMIBA_R014 houve um valor p significativo. Isso implica que houve diferença na biomassa obtida nos dois lotes testados. Ao comparar as médias obtidas (tabela 14), constata-se que a média do lote 2 (que não continha atrazina) foi bem superior à média do lote 1 (que continha atrazina). Isso pode indicar que o fungo testado não possui uma boa tolerância ao agrotóxico testado, tornando-o baixa prioridade para o estudo, como já discutido anteriormente.

Tabela 10: Resultados do teste ANOVA para o fungo CCMIBA_R014.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	353808,1667	1	353808,1667	53,550556	0,001855	7,708647
Dentro dos grupos	26427,97333	4	6606,993333			
Total	380236,14	5				

Tabela 11: Resultados do teste ANOVA para o fungo CCMIBA_R018

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	266662,0017	1	266662	1,025302	0,368537	7,708647
Dentro dos grupos	1040325,927	4	260081,5			
Total	1306987,928	5				

Tabela 12: Resultados do teste ANOVA para o fungo CCMIBA_R111.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	1574,64	1	1574,64	0,04619658	0,840332	7,708647
Dentro dos grupos	136342,5533	4	34085,63833			
Total	137917,1933	5				

Observando os dados obtidos para os fungos *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018 e *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111, ambos os ensaios não resultaram em p-valor significativo. Esse dado indica que, entre um tratamento e outro (com e sem atrazina), não houve diferença notável na medida de biomassa. Isso significa que o xenobiótico utilizado não teve grande impacto no desenvolvimento do fungo, tornando-os bons candidatos para o desenvolvimento do bioinoculante para biorremediação.

Os fungos *P. lilacinum* CCMIBA_R014 e *C. rosea* CCMIBA_R018 apresentaram maior taxa de crescimento nos ensaios (figura 19), mas a biomassa produzida pelo fungo *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 foi inferior. As próximas etapas do projeto é a elaboração do consórcio para imobilização no Biochar. Para tanto, frente aos resultados obtidos no presente trabalho se faz necessário aumentar a biomassa do *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111.

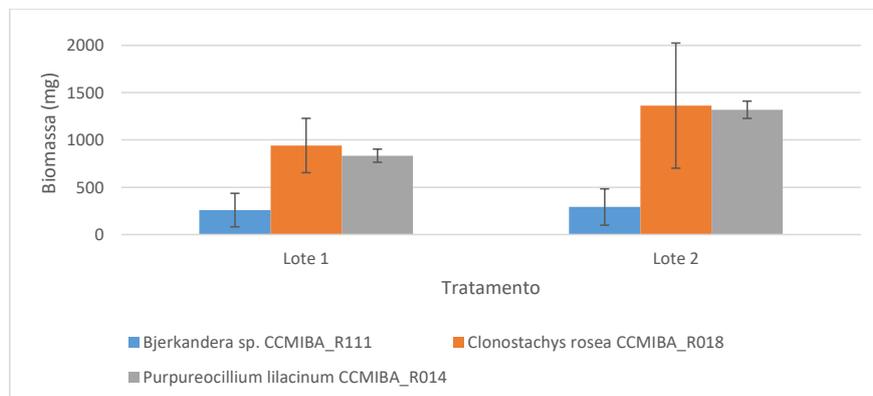


Figura 19: Boxplot dos resultados obtidos para peso seco da biomassa fúngica.

O fungo *Bjerkandera* sp. apresenta um crescimento semelhante quando se utiliza meio de cultivo MEA (extrato de malte) ou BDA (batata

dextrose), sem produção do basídio (figura 17), produzindo uma biomassa menor (figura 18), um fator que pode explicar sua baixa produção em comparação com outros fungos do trabalho. Em adição outro fator que pode explicar o porquê deste fungo apresentar um crescimento menor do que os outros no meio com extrate de malte é a temperatura utilizada. Todos os fungos foram incubados a 28°C, e a temperatura ótima de crescimento do *Bjerkandera* sp. é 24°C (RECH et al, 2020; MESTER & FIELD, 1997). Novos estudos devem ser realizados visando o aumento da biomassa, como substratos lignocelulolíticos.

O monitoramento de pesticidas no meio ambiente é feito através da identificação desses compostos, bem como da sua quantificação. A quantificação é feita através de técnicas analíticas, sendo a cromatografia a mais comum entre elas. As cromatografias gasosa e líquida são as mais utilizadas para fazer essa quantificação de poluentes nas mais diversas matrizes. Tratando-se especificamente de análise de pesticidas, é preferível a utilização da cromatografia líquida, já que são compostos que não evaporam facilmente (MASIÁ et al, 2014; SOUSA, 2020; LIU et al, 2017).

Num geral, a cromatografia gasosa e a líquida se complementam. A cromatografia líquida, devido à sua grande versatilidade, é aplicada num grande espectro de herbicidas, incluindo a atrazina. Geralmente ela é aplicada na identificação de pesticidas pertencentes à uma mesma classe. Estudos feitos com atrazina e outros pesticidas comumente utilizam desse método para suas análises, em conjunto com a espectrometria de massas (SKAGGS et al, 2021; SANTOS-HERNÁNDEZ et al, 2018; MELO et al, 2003).

No presente estudo, as amostras foram analisadas através de uma cromatografia líquida com espectrofotômetro de massa (LC-MS/MS) (com um limite de detecção de 0,300 µg/L e limite de quantificação de 1 µg/L), e o resultado pode ser observado na tabela 13. O método de extração utilizado foi em fase sólida (SPE), que é comumente utilizado para isolamento de analitos, principalmente se tratando de amostras complexas. Esse método de extração permite que os analitos sejam identificados mesmo em concentrações muito baixas (JARDIM, 2010; POOLE, 2003).

Tabela 13: Resultado do ensaio de cromatografia líquida com espectrofotômetro de massa (LC-MS/MS).

Concentração de atrazina (mg/L)				
	R014	R018	R111	CN
A	4,444	3,147	2,712	8,795
B	4,702	3,136	4,061	
C	4,994	2,213	2,969	
Média	4,713	2,832	3,247	8,795

Houve redução na concentração da atrazina no cultivo dos três fungos comparado ao controle, resultando na eliminação de 46%, 63% e 68% de atrazina nos cultivos dos fungos *P. lilacinum* CCMIBA_R014, *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 e *C. rosea* CCMIBA_R018, respectivamente. Essa redução pode ser resultado da biodegradação ou da redução do contaminante pelo mecanismo de adsorção na biomassa. Conhecendo agora o potencial agora novos ensaios serão realizados analisando a concentração da atrazina não apenas o sobrenadante, mas também na biomassa.

Na figura 20, observa-se melhor os resultados dessa análise. Ao comparar as médias dos valores obtidos na cromatografia, é possível notar uma certa diminuição na concentração da atrazina, entre o controle negativo (cultivo sem nenhum inóculo) e os as outras amostras. Essa diminuição pode comprovar que os fungos utilizados neste trabalho são capazes de diminuir a presença do pesticida, além de apresentarem tolerância a ele. É possível observar que os dois fungos que apresentaram um resultado favorável com relação ao crescimento, também apresentaram maior degradação de atrazina (R018 e R111). Porém, mesmo *P. lilacinum* CCMIBA_R014 demonstrando pouca tolerância ao pesticida, houve redução, indicando talvez o processo de adsorção na biomassa.

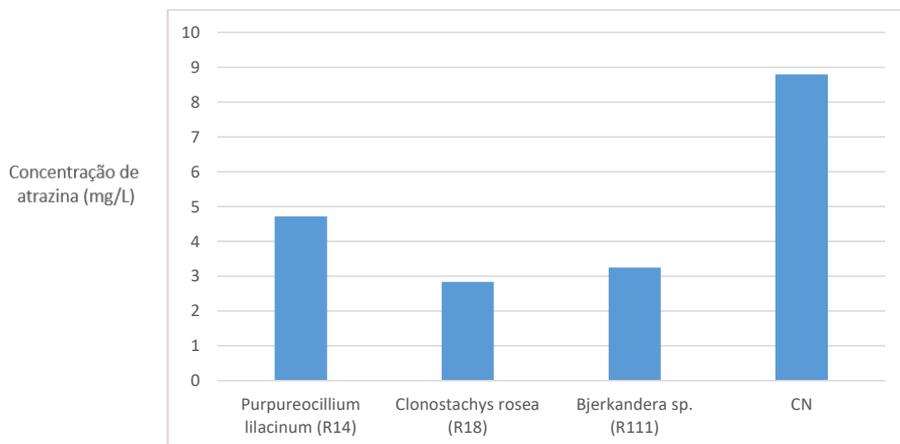


Figura 20: Gráfico comparando os valores médios obtidos na análise cromatográfica.

Considerando os resultados obtidos neste estudo, pode-se dizer que os fungos foram selecionados com sucesso, já que apresentaram tolerância no crescimento e redução da concentração da atrazina. Como próximo passo, é preciso entender por qual motivo o fungo CCMIBA_R014 (*Purpureocillium lilacinum*) apresentou diminuição no seu crescimento na presença da atrazina e qual o mecanismo de redução (biodegradação ou adsorção). Além disso, precisa-se encontrar mecanismos para inocular esses fungos no biochar, para possível utilização do produto *in situ*. A partir dos resultados obtidos, os ensaios serão continuados pelo grupo de pesquisa.

Comentado [R1]: Colocar os nomes dos eixos e tirar o título

6 CONCLUSÃO

Após os estudos realizados, pode-se concluir que o fungo que apresentou o melhor resultado foi o *Clonostachys rosea* (CCMIBA_R018), por apresentar maior massa celular ao final do experimento e melhor redução da concentração da atrazina. O fungo *Purpureocillium lilacinum* (CCMIBA_R014) não apresentou resultados favoráveis, visto que teve um crescimento bem maior no tratamento sem atrazina, apontando que o pesticida pode não ser bom para o desenvolvimento do fungo. *Bjerkandera* sp. (CCMIBA_R111) teve resultados relativamente favoráveis, visto que seu crescimento não foi muito afetado pela atrazina e ainda mostrou eficiente eliminação da atrazina. Mas, ao mesmo tempo, a biomassa adquirida foi um pouco menor. Portanto, se faz necessária uma otimização do processo de cultivo desse fungo, para que haja um valor satisfatório de biomassa.

O desenvolvimento do bioinoculante iniciado no presente trabalho não projeta apenas a degradação da atrazina. A capacidade do solo agrícola em realizar os processos de transformação, retenção e transporte da atrazina estão ligados ao potencial de biodegradação da microbiota do próprio solo, quando a microbiota é ativa, rapidamente consegue responder a entrada do poluente, não resultando em impactos diretos nas características químicas, biológicas e físicas do solo. Por outro lado, quando o solo apresenta um baixo indicador biológico, o defensivo agrícola vai resultar imediatamente na diminuição da microbiota, conseqüentemente na mudança no processo de ciclagem de nutrientes, geração e retenção da matéria orgânica e da água para a nutrição vegetal, alterando diversas características físicas, como compactação, formação de agregados e porosidade do solo. Neste sentido, os resultados obtidos no presente trabalho indicam potencial para melhora da qualidade do solo quando em conjunto com as vantagens do biochar.

REFERÊNCIAS

- AFSHARI, N.; HEMMATI, R. First report of the occurrence and pathogenicity of *Clonostachys rosea* on faba bean. **Australasian Plant Pathology**, v. 46, n. 3, p. 231-234, 2017.
- AKHTAR, Nahid; MANNAN, M. Amin-ul. Mycoremediation: Expunging environmental pollutants. **Biotechnology Reports**, p. e00452, 2020.
- ANWAR, Waheed et al. Entomopathogenic fungus *Clonostachys rosea* as a biocontrol agent against whitefly (*Bemisia tabaci*). **Biocontrol science and technology**, v. 28, n. 8, p. 750-760, 2018.
- ARANTES, Valdeir; GOODELL, Barry. Current understanding of brown-rot fungal biodegradation mechanisms: a review. **Deterioration and protection of sustainable biomaterials**, v. 1158, p. 3-21, 2014.
- ASMELASH, Fisseha; BEKELE, Tamrat; BIRHANE, Emiru. The potential role of arbuscular mycorrhizal fungi in the restoration of degraded lands. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1095, 2016.
- BARDI, Alessandra et al. Recalcitrant compounds removal in raw leachate and synthetic effluents using the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. **Water**, v. 9, n. 11, p. 824, 2017.
- BARON, Noemi Carla; DE SOUZA POLLO, Andressa; RIGOBELLO, Everlon Cid. *Purpureocillium lilacinum* and *Metarhizium marquandii* as plant growth-promoting fungi. **PeerJ**, v. 8, p. e9005, 2020.
- BARRIOS, Edmundo. Soil biota, ecosystem services and land productivity. **Ecological economics**, v. 64, n. 2, p. 269-285, 2007.
- BERG, Jeremy Mark; STRYER, Lubert; TYMOCZKO, John L. **Bioquímica**. 7 ed – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
- BLANCA, María J. et al. Effect of variance ratio on ANOVA robustness: Might 1.5 be the limit?. **Behavior Research Methods**, v. 50, n. 3, p. 937-962, 2018.
- BLANCA, María J. et al. Non-normal data: Is ANOVA still a valid option?. **Psicothema**, v. 29, n. 4, p. 552-557, 2017.
- CARBONERAS, Belen; VILLASEÑOR, José; FERNANDEZ-MORALES, Francisco Jesus. Modelling aerobic biodegradation of atrazine and 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid by mixed-cultures. **Bioresource technology**, v. 243, p. 1044-1050, 2017.
- CASTRO-GUTIÉRREZ, Víctor et al. Fungal and Bacterial Co-Bioaugmentation of a Pesticide-Degrading Biomixture: Pesticide Removal and Community Structure Variations during Different Treatments. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 230, n. 10, p. 247, 2019.

CATANEO, A. C. et al. Atividade de glutatona S-transferase na degradação do herbicida glyphosate em plantas de milho (*Zea mays*). **Planta Daninha**, v. 21, n. 2, p. 307-312, 2003.

CHAN-CUPUL, Wilberth; HEREDIA-ABARCA, Gabriela; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, Refugio. Atrazine degradation by fungal co-culture enzyme extracts under different soil conditions. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 51, n. 5, p. 298-308, 2016.

CHANG, Young-Cheol et al. Biodegradation of alkylphenols by rhizosphere microorganisms isolated from the roots of *Hosta undulata*. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 3, p. 103771, 2020.

CROSSLAND, Mary et al. Implications of variation in local perception of degradation and restoration processes for implementing land degradation neutrality. **Environmental development**, v. 28, p. 42-54, 2018.

DAS, M. Mousumi; HARIDAS, M.; SABU, A. Process development for the enhanced production of bio-nematicide *Purpureocillium lilacinum* KU8 under solid-state fermentation. **Bioresource technology**, v. 308, p. 123328, 2020.

DATTA, Rahul et al. Enzymatic degradation of lignin in soil: a review. **Sustainability**, v. 9, n. 7, p. 1163, 2017.

DAVILA-VAZQUEZ, Gustavo et al. Transformation of halogenated pesticides by versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 2-3, p. 223-231, 2005.

DESHMUKH, Radhika; KHARDENAVIS, Anshuman A.; PUROHIT, Hemant J. Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation. **Indian journal of microbiology**, v. 56, n. 3, p. 247-264, 2016.

ELEFSINIOTIS, Panagiotis; WAREHAM, David G. Biodegradation of industrial-strength 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid wastewaters in the presence of glucose in aerobic and anaerobic sequencing batch reactors. **Environmental technology**, v. 34, n. 9, p. 1167-1174, 2013.

ELGUETA, Sebastian et al. Immobilization of the white-rot fungus *Anthracoxyllum discolor* to degrade the herbicide atrazine. **Amb Express**, v. 6, n. 1, p. 104, 2016.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; Sistema Brasileiro de Classificação do solo. **Embrapa Solos; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 3a edição, Brasília – DF; 2013.

ERMAKOVA, T. et al. Thiomorpholine transformation by the fungus *Bjerkandera adusta*. **Microbiology**, v. 77, n. 5, p. 547-552, 2008.

ESPARZA NARANJO, Samantha Beatriz. **Biodegradación de la atrazina mediante hongos del Parque Nacional do Iguazu**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso.

FALADE, Ayodeji O. et al. Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. **MicrobiologyOpen**, v. 6, n. 1, p. e00394, 2017.

FAY, Elisabeth Francisconi et al. Degradação abiótica de xenobióticos. **Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2008.

FIELD, James A. et al. Oxidation of anthracene in water/solvent mixtures by the white-rot fungus, *Bjerkandera* sp. strain BOS55. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 234-240, 1995.

GAO, Yaping et al. Effects of atrazine on the physiology, sexual reproduction, and metabolism of eelgrass (*Zostera marina* L.). **Aquatic botany**, v. 153, p. 8-14, 2019.

GAUR, Atimanav; ADHOLEYA, Alok. Effects of the particle size of soil-less substrates upon AM fungus inoculum production. **Mycorrhiza**, v. 10, n. 1, p. 43-48, 2000.

GIMENO, Alejandro et al. TaqMan qPCR for quantification of *Clonostachys rosea* used as a biological control agent against *Fusarium graminearum*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1627, 2019.

GORING, C. A. I. et al. Principles of pesticide degradation in soil. In: **Environmental dynamics of pesticides**. Springer, Boston, MA, 1975. p. 135-172.

GOUMA, Sofia et al. Studies on Pesticides Mixture Degradation by White Rot Fungi. **Journal of Ecological Engineering**, v. 20, n. 2, 2019.

HAMED, S. A.; MANSOUR, Maisa Mohamed Ali. Comparative study on micromorphological changes in wood due to soft-rot fungi and surface mold. 2018.

HAMMEL, Kenneth E. et al. Ligninolysis by a purified lignin peroxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 17, p. 12274-12281, 1993.

HENDERSON, Ashleigh J. et al. Acute in vitro exposure to environmentally relevant atrazine levels perturbs bovine preimplantation embryo metabolism and cell number. **Reproductive Toxicology**, v. 87, p. 87-96, 2019.

HOFRICHTER, Martin. Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial technology**, v. 30, n. 4, p. 454-466, 2002.

JANUSZ, Grzegorz et al. Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, n. 6, p.

941-962, 2017.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.

JELLISON, Jody et al. The role of cations in the biodegradation of wood by the brown rot fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 39, n. 2-3, p. 165-179, 1997.

KEPENEKCI, Ilker et al. Application methods of *Steinernema feltiae*, *Xenorhabdus bovienii* and *Purpureocillium lilacinum* to control root-knot nematodes in greenhouse tomato systems. **Crop Protection**, v. 108, p. 31-38, 2018.

KHAN, Shahamat U. **Pesticides in the soil environment**. Elsevier, 2016.

KOLEKAR, Parag D. et al. Microcosm study of atrazine bioremediation by indigenous microorganisms and cytotoxicity of biodegraded metabolites. **Journal of hazardous materials**, v. 374, p. 66-73, 2019.

KIM, Hae-Young. Analysis of variance (ANOVA) comparing means of more than two groups. **Restorative dentistry & endodontics**, v. 39, n. 1, p. 74, 2014.

KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA, Teresa; RYBCZYŃSKA, Kamila. Decolorization of Remazol Brilliant Blue (RBBR) and Poly R-478 dyes by *Bjerkandera adusta* CCBAS 930. **Open Life Sciences**, v. 7, n. 5, p. 948-956, 2012.

KOTTERMAN, Michiel JJ; VIS, Eric H.; FIELD, Jim A. Successive mineralization and detoxification of benzo [a] pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 and indigenous microflora. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 8, p. 2853-2858, 1998.

KURIA, Anne W. et al. Farmers' knowledge of soil quality indicators along a land degradation gradient in Rwanda. **Geoderma Regional**, p. e00199, 2018.

LENG, Lijian et al. Biochar stability assessment methods: a review. **Science of the total environment**, v. 647, p. 210-222, 2019.

LEÓN-SANTIESTEBAN, Héctor Hugo; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, Refugio. Fungal degradation of organochlorine pesticides. In: **Microbe-Induced Degradation of Pesticides**. Springer, Cham, 2017. p. 131-149.

LEVANON, D. Roles of fungi and bacteria in the mineralization of the pesticides atrazine, alachlor, malathion and carbofuran in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, n. 8, p. 1097-1105, 1993.

LEVIRAM, Inbar et al. Real-time analysis of atrazine biodegradation and sessile bacterial growth: A quartz crystal microbalance with dissipation monitoring study. **Chemosphere**, v. 225, p. 871-879, 2019.

LIU, Zhenzhen et al. Multi-pesticides residue analysis of grains using modified magnetic nanoparticle adsorbent for facile and efficient cleanup. **Food chemistry**, v. 230, p. 423-431, 2017.

LIU, Xiaowei et al. Shift in Bacterial Community Structure Drives Different Atrazine-Degrading Efficiencies. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 88, 2019.

LUANGSA-ARD, Jennifer et al. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. **FEMS microbiology letters**, v. 321, n. 2, p. 141-149, 2011.

MACEDO, Paulo EF et al. Sensitivity of four isolates of *Clonostachys rosea* to pesticides used in the strawberry crop in Brazil. **Journal of Pesticide Science**, p. D11-055, 2012.

MADADI, M. et al. Lignin degradation by fungal pretreatment: a review. **J Plant Pathol Microbiol**, v. 8, n. 398, p. 2, 2017.

MANAHAN, S.E. **Environmental chemistry**. 6 ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994. 81 lp

MARCHI, Giuliano; MARCHI, Edilene Carvalho Santos; GUIMARÃES, Tadeu Gracioli. Herbicidas: mecanismos de ação e uso. **Embrapa Cerrados-Documentos (INFOTECA-E)**, 2008.

MARINHO, G. et al. Potential of the filamentous fungus *Aspergillus niger* AN 400 to degrade Atrazine in wastewaters. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 162-167, 2017.

MARTINS, Elisandra Carolina et al. Sorption and desorption of atrazine on soils: The effect of different soil fractions. **Geoderma**, v. 322, p. 131-139, 2018.

MASIÁ, Ana; BLASCO, Cristina; PICÓ, Yolanda. Last trends in pesticide residue determination by liquid chromatography–mass spectrometry. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 2, p. 11-24, 2014.

MAYER, Alfred M.; STAPLES, Richard C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, n. 6, p. 551-565, 2002.

MCMILLAN, Oliver. **Characteristics and mechanisms of atrazine sorption to biochar for land remediation**. 2018. Tese de Doutorado. University of Cambridge.

MELA, M. et al. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 93, p. 13-21, 2013.

MELO, Lucio Flavio Costa et al. Desenvolvimento de metodologias e de novos materiais para determinação multirresíduo de pesticidas em uva e tomate por

cromatografia líquida de alta eficiência. 2003.

MESTER, Tünde; FIELD, Jim A. Optimization of manganese peroxidase production by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. **FEMS microbiology letters**, v. 155, n. 2, p. 161-168, 1997.

MIELNICZUK, J. Matéria orgânica e a sustentabilidade de sistema agrícolas In: SANTOS, GA; CAMARGO, FAO Fundamentos da matéria orgânica no solo. "Ecosistemas tropicais e subtropicais". **Ecosistemas tropicais e subtropicais**". Eds. Porto Alegre: **Gênese**, 1999.

NWANI, C. D. et al. Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 314-322, 2011.

NYGREN, Kristiina et al. The mycoparasitic fungus *Clonostachys rosea* responds with both common and specific gene expression during interspecific interactions with fungal prey. **Evolutionary applications**, v. 11, n. 6, p. 931-949, 2018.

O'CONNOR, David et al. Biochar application for the remediation of heavy metal polluted land: a review of in situ field trials. **Science of the total environment**, v. 619, p. 815-826, 2018.

OKINO-DELGADO, Clarissa Hamaio et al. Enzymatic Bioremediation: Current Status, Challenges of Obtaining Process, and Applications. In: **Microbial Metabolism of Xenobiotic Compounds**. Springer, Singapore, 2019. p. 79-101.

OLADELE, Segun; AYODELE, Olatunde. Glyphosate, 1, 1'-dimethyl-4, 4'-bipyridinium dichloride and Atrazine induces changes in Soil organic carbon, bacterial and fungal communities in a tropical alfisol. **Eurasian Journal of Soil Science**, v. 6, n. 3, p. 238-248, 2017.

OLIVEIRA JÚNIOR, Rubem Silvério de. Mecanismos de ação de herbicidas. **Biologia e manejo de plantas daninhas. Curitiba: Omnipax**, v. 1, p. 141-192, 2011.

ONDRÁČKOVÁ, ELIŠKA; SEIDENGLANZ, MAREK; ŠAFÁŘ, JAROSLAV. Effect of seventeen pesticides on mycelial growth of *Akanthomyces*, *Beauveria*, *Cordyceps* and *Purpureocillium* strains. **Czech Mycology**, v. 7, n. 2, 2019.

ORTON, Frances; CARR, James A.; HANDY, Richard D. Effects of nitrate and atrazine on larval development and sexual differentiation in the northern leopard frog *Rana pipiens*. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 25, n. 1, p. 65-71, 2006.

PENN, Chad J.; GONZALEZ, Javier M.; CHAGAS, Isis. Investigation of atrazine sorption to biochar with titration calorimetry and flow-through analysis: implications for design of pollution-control structures. **Frontiers in chemistry**, v. 6, 2018.

POINTING, S. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 57, n. 1-2, p. 20-33, 2001.

POOLE, Colin F. New trends in solid-phase extraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 6, p. 362-373, 2003.

QUINTERO, Juan Carlos et al. Bioremediation of HCH present in soil by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* in a slurry batch bioreactor. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 60, n. 4, p. 319-326, 2007.

RECH, Katlin Suellen et al. Optimisation of *Bjerkandera adusta* culture conditions for the production of α - α -trehalose. **Natural product research**, p. 1-4, 2020.

RIVA, Sergio. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **TRENDS in Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 219-226, 2006.

ROBINSON, Tim; NIGAM, Poonam Singh. Remediation of textile dye waste water using a white-rot fungus *Bjerkandera adusta* through solid-state fermentation (SSF). **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 151, n. 2, p. 618-628, 2008.

ROESE, A. D. Solo saudável. **Revista Cultivar**. 2018, 229: 15-17.

ROZMAN, Karl K.; DOULL, John; HAYES JR, Wayland J. Dose and time determining, and other factors influencing, toxicity. In: **Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology**. Academic Press, 2010. p. 3-101.

RUBILAR, O. et al. Biodegradation of pentachlorophenol in soil slurry cultures by *Bjerkandera adusta* and *Anthracyllum discolor*. **Industrial & engineering chemistry research**, v. 46, n. 21, p. 6744-6751, 2007.

SALAZAR-LEDESMA, M. et al. Mobility of atrazine in soils of a wastewater irrigated maize field. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 255, p. 73-83, 2018.

SCHLOTTER, M.; DILLY, O.; MUNCH, J. C. Indicators for evaluating soil quality. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 98, n. 1-3, p. 255-262, 2003.

SARAIVA, R. M. et al. Use and prospect of *Clonostachys rosea* as a biocontrol agent. **Revista de Ciencias Agrícolas**, v. 31, n. 1, p. 78-91, 2014.

SANTOS-HERNÁNDEZ, Ana Susana et al. Atrazine and 2, 4-D Determination in Corn Samples Using Microwave Assisted Extraction and On-line Solid-phase Extraction Coupled to Liquid Chromatography. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 62, n. 2, p. 282-294, 2018.

SKAGGS, Christopher S.; LOGUE, Brian A. Ultratrace analysis of atrazine in soil using Ice Concentration Linked with Extractive Stirrer and High Performance

Liquid Chromatography—Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1635, p. 461753, 2021.

SINGH, Baljinder; SINGH, Kashmir. Microbial degradation of herbicides. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 2, p. 245-261, 2016.

SINGH, Simranjeet et al. Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. **Environmental chemistry letters**, v. 16, n. 1, p. 211-237, 2018.

SOLAIMAN, Zakaria M.; ABBOTT, Lynette K.; MURPHY, Daniel V. Biochar phosphorus concentration dictates mycorrhizal colonisation, plant growth and soil phosphorus cycling. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 5062, 2019.

SOLTANIAN, Siyavash. Effect of atrazine on immunocompetence of red-eared slider turtle (*Trachemys scripta*). **Journal of immunotoxicology**, v. 13, n. 6, p. 804-809, 2016.

SOHI, S. P. et al. A review of biochar and its use and function in soil. In: **Advances in agronomy**. Academic Press, 2010. p. 47-82.

SONG, Fuqiang et al. Transcriptome analysis of *Glomus mosseae*/*Medicago sativa* mycorrhiza on atrazine stress. **Scientific reports**, v. 6, p. 20245, 2016.

SOUSA, Emanuella Santos et al. Estratégia para a modelagem de dados de segunda ordem usando cromatografia líquida para a quantificação de pesticidas em hortaliças. 2020.

SUN, Z.-B. et al. Biology and applications of *Clonostachys rosea*. **Journal of applied microbiology**, v. 129, n. 3, p. 486-495, 2020.

TRIPATHI, Astha; UPADHYAY, R. C.; SINGH, Surendra. Mineralization of mononitrophenols by *Bjerkandera adusta* and *Lentinus squarrosulus* and their extracellular ligninolytic enzymes. **Journal of basic microbiology**, v. 51, n. 6, p. 635-649, 2011.

TRIPATHI, Astha; UPADHYAY, R. C.; SINGH, Surendra. Extracellular ligninolytic enzymes in *Bjerkandera adusta* and *Lentinus squarrosulus*. **Indian journal of microbiology**, v. 52, n. 3, p. 381-387, 2012.

VALENTIN, L. et al. Biodegradation of dibenzothiophene, fluoranthene, pyrene and chrysene in a soil slurry reactor by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. BOS55. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 641-648, 2007.

WANG, Chao-Ge; VLASÁK, Josef; DAI, Yu-Cheng. Phylogeny and diversity of *Bjerkandera* (Polyporales, Basidiomycota), including four new species from South America and Asia. **MycoKeys**, v. 79, p. 149, 2021.

WANG, Dandan et al. The Effects of Maternal Atrazine Exposure and Swimming Training on Spatial Learning Memory and Hippocampal Morphology in Offspring

Male Rats via PSD95/NR2B Signaling Pathway. **Cellular and molecular neurobiology**, p. 1-13, 2019.

WARNOCK, Daniel D. et al. Mycorrhizal responses to biochar in soil—concepts and mechanisms. **Plant and soil**, v. 300, n. 1-2, p. 9-20, 2007.

WEBER, Kathrin; QUICKER, Peter. Properties of biochar. **Fuel**, v. 217, p. 240-261, 2018.

WETZELS, Ruud; GRASMAN, Raoul PPP; WAGENMAKERS, Eric-Jan. A default Bayesian hypothesis test for ANOVA designs. **The American Statistician**, v. 66, n. 2, p. 104-111, 2012.

WONG, Dominic WS. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 157, n. 2, p. 174-209, 2009.

YAROPOLOV, A. I. et al. Laccase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, n. 3, p. 257-280, 1994.

ZHU, Meiqing et al. Biointeractions of herbicide atrazine with human serum albumin: UV-Vis, fluorescence and circular dichroism approaches. **International journal of environmental research and public health**, v. 15, n. 1, p. 116, 2018.