

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS FRANCISCO BELTRÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA AMBIENTAL: ANÁLISE E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

ELIZABETH MARTINEZ HUERGO

**POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DE ATRAZINA POR BACTÉRIAS
ISOLADAS DE SOLO AGRÍCOLA**

**FRANCISCO BELTRÃO/PR
2024**

ELIZABETH MARTINEZ HUERGO

**POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DE ATRAZINA POR BACTÉRIAS
ISOLADAS DE SOLO AGRÍCOLA**

**POTENTIAL FOR BIODEGRADATION OF ATRAZINE BY BACTERIA ISOLATED
FROM AGRICULTURAL SOIL**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em Engenharia
Ambiental da Universidade Tecnológica
Federal do Paraná (UTFPR).

Linha de Pesquisa: Análise Ambiental

Orientadora: Profa. Dr (a) Elisete Guimarães

Co-orientadora: Profa. Dr (a) Rafaella Costa
Bonugli Santos

**FRANCISCO BELTRÃO/PR
2024**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Francisco Beltrão**



ELIZABETH MARTINEZ HUERGO

POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DE ATRAZINA POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE SOLO AGRÍCOLA

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Engenharia Ambiental: Análise E Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Meio Ambiente.

Data de aprovação: 30 de Abril de 2024

Dra. Elisete Guimaraes, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Davi Zacarias De Souza, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini, Doutorado - Universidade Federal da Integração Latino-Americana (Unila)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 30/04/2024.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a meu DEUS, meus padres e esposo pelo apoio incondicional, pela colaboração e incentivo durante esta jornada acadêmica e a vida.

À minha orientadora Elisete Guimaraes e à Coorientadora Rafaella Costa Bonugli Santos, cuja orientação sábia, paciência e incentivo constante foram fundamentais para a conclusão deste trabalho, obrigada por compartilhar seu conhecimento e experiência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da UTFPR, Campus Francisco Beltrão pela valiosa contribuição para a minha formação científica.

À Coleção de Cultura de Microrganismos de Importância Biotecnológica e Ambiental (CCMIBA) alocada no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA) e UTFPR por abrir um espaço para realizar o experimento do projeto neste e viabilizaram a realização desta pesquisa.

Ao Laboratório de Análises- LabAna da UTFPR, Campus Francisco Beltrão, pela realização das análises cromatográficas.

À técnica de laboratório Carla e às alunas de graduação, obrigada por trocar ideias, pela ajuda nos momentos em que eu não sabia nada e que os equipamentos se estragavam.

Aos professores e pesquisadores da banca que contribuíram para o meu crescimento acadêmico, minha sincera gratidão por compartilhar suas valiosas perspectivas. Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, tornando possível transformar uma ideia em realidade.

RESUMO

O herbicida atrazina é amplamente utilizado na América do Sul para o controle de ervas daninhas em diversas culturas, como milho, sorgo, cana-de-açúcar e paisagismo. Sua presença como contaminante em solos agrícolas e águas subterrâneas e superficiais levanta preocupações ambientais devido à sua persistência e tempo de vida média. Embora a degradação da atrazina ocorra naturalmente no solo, tanto por fatores abióticos quanto bióticos, ainda há incertezas sobre seu comportamento frente às comunidades bacterianas locais. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a degradação da atrazina utilizando cinco bactérias (CCMIBA 1.2; 2; 3; 4 e 5), isoladas de solos agrícolas com histórico de exposição ao herbicida por mais de 10 anos. Os isolados estão depositados na Coleção de Cultura de Microrganismos de Importância Biotecnológica e Ambiental (CCMIBA) da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA). No presente estudo foram selecionados, com base na literatura, quatro variáveis independentes, ou seja, condições que podem impactar no potencial de degradação, sendo: concentração do inóculo, concentração da atrazina, NH_4Cl e pH. Os ensaios foram delineados a partir de um planejamento experimental fracionário 2^{5-1} . Os ensaios que apresentaram melhores crescimento foram selecionados para avaliação da fitotoxicidade e degradação da atrazina: ensaio 4 (sem sacarose e, pH 9), e ensaio 17 (com sacarose, NH_4Cl e pH 7). A degradação foi avaliada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), revelando uma degradação total de 99% no ensaio 4 e 100% no ensaio 17. Entretanto, os testes de fitotoxicidade com sementes de pepino, indicaram manutenção da toxicidade, mesmo após a degradação, devido possivelmente a presença de metabólitos tóxicos, sugerindo ausência de mineralização da atrazina. Os resultados deste estudo apontam para o potencial da bactéria estudada poderá ser utilizada na biorremediação da atrazina e sugerem para estudos posteriores a otimização no processo de degradação, bem como o uso de um consórcio bacteriano como uma alternativa promissora para a degradação completa deste poluente, reduzindo sua toxicidade.

Palavras-chave: biorremediação; herbicida; contaminação; microrganismos; pesticida.

ABSTRACT

The herbicide atrazine is widely used in South America for weed control in various crops, such as corn, sorghum, sugarcane, and landscaping. Its presence as a contaminant in agricultural soils and groundwater and surface waters raises environmental concerns due to its persistence and average lifespan. Although the degradation of atrazine occurs naturally in the soil, both through abiotic and biotic factors, there are still uncertainties about its behavior in relation to local bacterial communities. In this context, this study aimed to evaluate the degradation of atrazine using five bacteria (CCMIBA 1.2; 2; 3; 4, and 5), isolated from agricultural soils with a history of exposure to the herbicide for over 10 years. The isolates are deposited in the Collection of Culturally Important Microorganisms of Biotechnological and Environmental Interest (CCMIBA) at the Federal University for Latin American Integration (UNILA). In the present study, based on the literature, four independent variables were selected, i.e., conditions that could impact the degradation potential, namely: inoculum concentration, atrazine concentration, NH_4Cl , and pH. The assays were designed based on a fractional 2^{5-1} experimental design. The assays that showed the best growth were selected for evaluation of phytotoxicity and atrazine degradation: assay 4 (without sucrose, and pH 9) and assay 17 (with sucrose, NH_4Cl , and pH 7). The degradation was evaluated by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), revealing a total degradation of 99% in assay 4 and 100% in assay 17. However, phytotoxicity tests with cucumber seeds indicated the maintenance of toxicity, even after degradation, possibly due to the presence of toxic metabolites, suggesting a lack of atrazine mineralization. The results of this study indicate the potential of the studied bacteria to be used in the bioremediation of atrazine and suggest for further studies the optimization of the degradation process, as well as the use of a bacterial consortium as a promising alternative for the complete degradation of this pollutant, reducing its toxicity.

Keywords: bioremediation; herbicide; contamination; microorganisms; Pesticide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Fórmula molecular da atrazina.....	17
Figura 2- Mecanismo de ação da atrazina.....	19
Figura 3 - Rota da Atrazina e sua persistência no ambiente	20
Figura 4 - Toxicidade e efeitos prejudiciais da atrazina em seres humanos, plantas, animais e microrganismos.....	23
Figura 5 - Via enzimática de degradação da atrazina.....	25
Figura 6 - Morfologia da semente	26
Figura 7- Amostra bacteriana.....	28
Figura 8 - Pré-inóculo com as linhagens bacterianas.....	30
Figura 9 - Etapas para a condução dos ensaios	32
Figura 10 - Crescimento bacteriano na presença de atrazina	33
Figura 11 - Equação geral da reta	35
Figura 12 - Medição das radículas e hipocótilos das sementes	36
Figura 13 - Resultado da CLAE do ensaio 4	41
Figura 14 - Resultados da CLAE do ensaio 17	42
Figura 15 - Crescimento das sementes (A) ensaio 4 replica a; (b) ensaio 4 replica b; (c) ensaio 17 replica (a).....	44
Figura 16 - Resultados da CLAE do ensaio 4	58
Figura 17- Resultados da CLAE do ensaio 17	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis e valores utilizados no ensaio planejamento experimental fracionário 2 ⁵⁻¹	30
Tabela 2 - Concentrações das variáveis utilizados no ensaio planejamento experimental fracionado 2 ⁵⁻¹	31
Tabela 3 - Crescimento bacteriano (absorbância a 600 nm) dos 20 ensaios da CCMIBA 4 conforme planejamento experimental fracionário 2 ⁵⁻¹	37
Tabela 4 - Ensaio enviados para cromatografia de alta eficiência.....	38
Tabela 5 - Estimativa do efeito de cada variável pelo software Statistica 5.0....	38
Tabela 6 - Porcentagem de degradação da atrazina	41
Tabela 7 - Média do crescimento das sementes (cm) e porcentagem de toxicidade das sementes dos ensaios	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral.....	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	JUSTIFICATIVA.....	16
4	REVISÃO LITERÁRIA	17
4.1	Atrazina	17
4.2	Mecanismo de ação da Atrazina	18
4.3	Destinos da atrazina no solo	19
4.4	Degradação de atrazina por bactérias.....	21
4.5	Atrazina, meio ambiente e saúde.	22
4.6	Biorremediação de solos contaminados com atrazina.....	23
4.7	Enzimas envolvidas no processo de biodegradação da atrazina	24
4.8	Fitotoxicidade	25
4.8.1	<i>Cucumis sativus</i> L.	27
5	MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1	Amostras bacterianas	28
5.2	Reativação e repique.....	28
5.3	Teste de degradação.....	30
5.4	Preparo dos inóculos.....	30
5.5	Tratamento com atrazina	31
5.6	Crescimento bacteriano na presença de atrazina	32
5.7	Avaliação da degradação da atrazina.....	34
5.8	Análise de fitotoxicidade com <i>Cucumis sativus</i> L.	35
5.9	Análises estatísticas	36
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
6.1	Seleção e Crescimento bacteriano na presença de atrazina.....	37
6.2	Avaliação da degradação da atrazina.....	40
6.3	Fitotoxicidade	43
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
	APENDICE A - RESULTADOS DA CLAE.....	57

1 INTRODUÇÃO

Os herbicidas são uma categoria de agroquímicos fundamentais para otimizar a agricultura, com destaque para a atrazina, um herbicida amplamente utilizado em diversos países para controlar o crescimento de plantas daninhas nas lavouras, devido à sua notável eficiência e custo economicamente vantajoso (CAMPANARI, 2017). A atrazina é extensivamente empregada no Brasil desde aproximadamente 1958 (VAIL *et al.*, 2014), sendo classificada toxicologicamente como de classe III (possível cancerígeno para o ser humano), e classificação do potencial de periculosidade ambiental de classe III (produto muito perigoso ao meio ambiente), conforme a classificação da United States Environmental Protection Agency (USEPA).

Devido aos grupos de cloreto e N-alquila, a atrazina tem degradação lenta no meio ambiente, com uma meia-vida variando de 13 a 260 dias no solo (USEPA, 2006). A atrazina é moderadamente a altamente solúvel em água e tem um coeficiente de adsorção no solo relativamente baixo (ARIAS-ESTÉVEZ *et al.*, 2008). Assim sendo, após ser aplicada em áreas cultivadas, pode ser transportada para lençóis freáticos ou águas superficiais, causando poluição nesses ambientes e alterando a ecologia e as interações biológicas dos organismos que vivem nesses ecossistemas (JAMIL *et al.*, 2011).

Portanto, em áreas contaminadas com atrazina, os microrganismos nativos podem adquirir a capacidade de decompor essa molécula (SINGH *et al.*, 2017), podendo ser empregada como fonte de carbono e/ou nitrogênio por esses microrganismos, seja por vias metabólicas aeróbicas ou anaeróbicas, tanto no próprio local (*in situ*) quanto em condições controladas em laboratório (ARIOLE & ABUBAKAR, 2015).

Apesar da alta estabilidade da molécula da atrazina e de sua elevada resistência ao ataque microbiano, vários gêneros capazes de degradar atrazina já foram isolados, como as linhagens de *Pseudomonas* (FERNANDES *et al.*, 2018), *Acinetobacter* (SINGH *et al.*, 2004), *Arthrobacter* (WANG & XIE, 2012), e *Citrococcus* (YANG *et al.*, 2018), capazes de utilizar a atrazina como fonte de carbono, além de nitrogênio.

Em bactérias, é comum que a degradação inicial da atrazina inicia com a descloração da molécula por desalogenação hidrolítica com consequente formação de hidroxiatrazina (MANDELBAUM *et al.*, 1993), que é convertida, por sua vez, em N-

isopropilamelida por desaminação, todas essas rotas conduzem para a formação de ácido cianúrico, que depois é mineralizado em água, amônia e CO₂ (SAGARKAR *et al.*, 2013).

Estudos recentes demonstraram o sucesso no isolamento de microrganismos em solos que foram previamente expostos ao herbicida. Isso tem acelerado a formação de novas linhagens bacterianas, levando ao surgimento de variantes capazes de degradar a atrazina. Essa característica pode resultar em avanços significativos nas pesquisas de biorremediação de herbicidas em solos agrícolas (SAGARKAR *et al.*, 2016; NICODEMO, 2021).

Assim sendo, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência na degradação da atrazina por bactérias isoladas de solo agrícola com mais de 10 anos de histórico de utilização deste herbicida, oferecendo uma contribuição significativa para o desenvolvimento de estratégias de biorremediação e controle da poluição causada por esse herbicida.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade de degradação do herbicida atrazina, por bactérias depositadas na Coleção de Cultura de Microrganismos de Importância Biotecnológica e Ambiental da Unila (CCMIBA) e isoladas de um solo agrícola da região de Toledo/PR.

2.2 Objetivos Específicos

- Reativar os isolados e determinar a pureza e viabilidade das culturas bacterianas;
- Cultivar as bactérias em meio líquido contendo atrazina frente a diferentes condições de cultivo;
- Selecionar os ensaios com maior crescimento para avaliação da degradação;
- Quantificar a atrazina degradada nos ensaios selecionados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Avaliar a toxicidade dos ensaios selecionados usando *Cucumis sativus* como modelo de fitotoxicidade;
- Determinar a eficiência de biodegradação da atrazina pela bactéria isolada.

3 JUSTIFICATIVA

No Brasil, a atrazina figura entre os cinco agrotóxicos mais comercializados no período de 2008 a 2021 (MATIAS *et al.*, 2021). Segundo o CEPEA (Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada), os agroquímicos têm contribuído significativamente para o Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro nos últimos anos, atingindo uma participação de 20,5% em 2021 (FUZIWARA, 2023). Com esse aumento, é evidente o incremento no consumo destes produtos tanto no mercado interno brasileiro quanto nas exportações, acompanhado do surgimento de novos produtos que têm sido desenvolvidos e patenteados, alcançando em 2021 um recorde de 562 produtos agroquímicos inéditos, representando o maior número da história do país (FUZIWARA, 2023).

A atrazina, vetada na União Europeia desde os anos 90, é um herbicida persistente no solo que se encontra em altas concentrações em águas superficiais e subterrâneas devido à sua alta solubilidade e potencial de lixiviação. Isso causa desequilíbrios nos ecossistemas e forma plumas de contaminação devido à sua mobilidade. A principal preocupação é a persistência ambiental da atrazina, que leva à bioacumulação, toxicidade crônica e exposição dos organismos vivos (PROSEN *et al.*, 2012; DA SILVA, 2020; FUZIWARA, 2023).

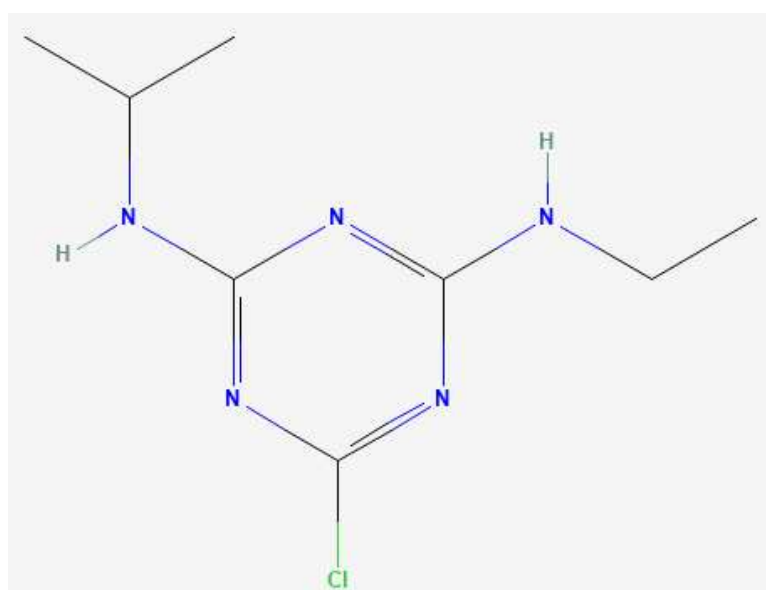
Nesse contexto, é muito importante caracterizar os organismos bacterianos presentes no solo e assim buscar alternativas para a biorremediação de solos contaminados ou elaborar estratégias para aprimorar a degradação biótica durante o cultivo agrícola. Isso contribui para reduzir a concentração do poluente passível de lixiviação, assim como de seus compostos intermediários nocivos.

4 REVISÃO LITERÁRIA

4.1 Atrazina

Composto conhecido quimicamente (2-cloro-4-etilamino- 6-isopropilamino-s-triazina), fórmula bruta ($C_8H_{14}ClN_5$) (figura 1), pertencentes à família das s-triazinas (CORREIA & LANGENBACH, 2006), é um herbicida aromático de amplo espectro, sua principal função é o controle de gramíneas e plantas daninhas de folhas largas, seu uso teve início na década de 1950 (DONNELLY, 1993; COOPER *et al.*, 2007), e atualmente é utilizado especialmente nos países produtores de grãos, como Argentina, Estados Unidos e Brasil (COLLA *et al.*, 2008). Este herbicida é solúvel em alguns solventes orgânicos como éter, acetona, benzeno, clorofórmio, etanol e acetato de etila (MARCHESAN, 2016).

Figura 1- Fórmula molecular da atrazina



Fonte: National Center for Biotechnology Information (2024)

Por ser um composto polar, devido à configuração de seu anel aromático, a solubilidade em água é independente do pH da solução; no entanto, apresenta maior solubilidade em soluções com pH abaixo de 2 (JAVARONI *et al.*, 1999; KOOKANA *et al.*, 2008; DA SILVA, 2020).

As propriedades da atrazina resultam da moderada mobilidade e elevada persistência, contribuindo para a acumulação a níveis contaminantes tanto na superfície como em profundidade nos solos, e potencialmente atingindo águas superficiais e subterrâneas (PROSEN, 2012).

Os subprodutos da atrazina mais comumente encontrados no meio ambiente são: Desetilatrazina (DEA), Desisopropilatrazina (DIA), didealquilatrazina (DDA), desetilhidroxiatrazina (DEHA) e hidroxiatrazina (HA). Entre esses o DEA e o DIA, são mais tóxicos e prevalentes em mananciais superficiais e subterrâneos, devido à sua elevada solubilidade em água (LOSS & NIESSNER, 1999; DA SILVA, 2020).

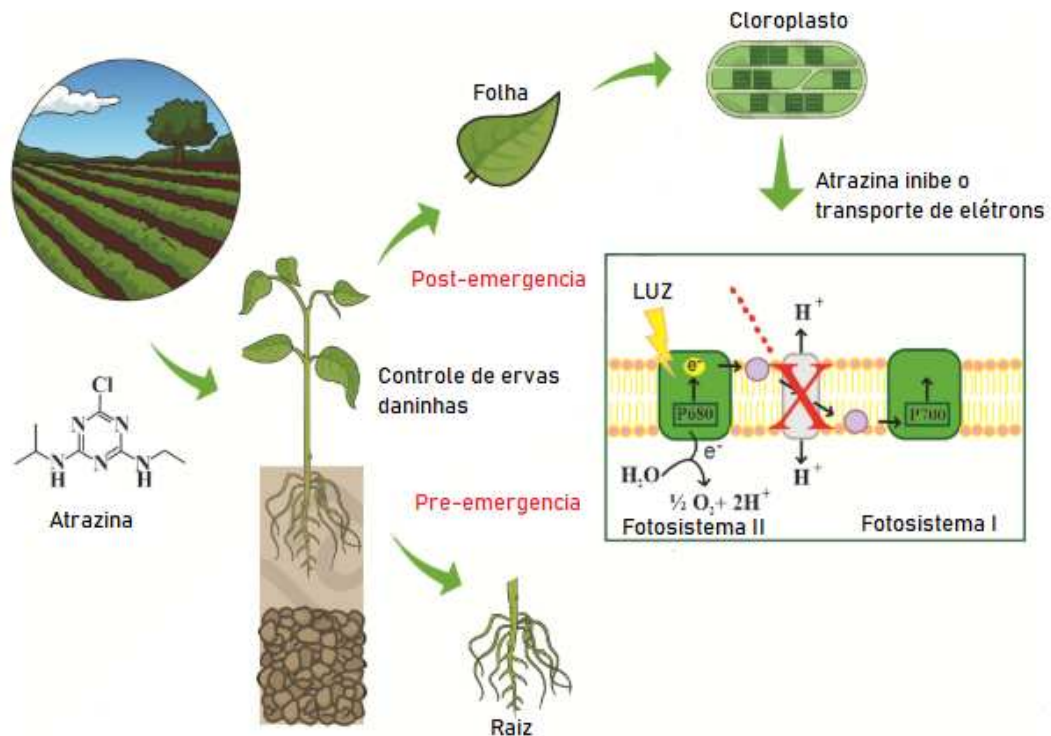
4.2 Mecanismo de ação da Atrazina

A Atrazina inibe a atividade do fotossistema II, estágio em que a energia luminosa é convertida em movimento de elétrons energizados. Ao substituir a ligação na plastoquinona com a quinona b, a atrazina se une à forma oxidada da plastoquinona e se conecta ao local específico de ligação no aceptor da quinona b na proteína D1. Como a molécula de atrazina está em um estado reduzido, ela não recebe elétrons, resultando em um bloqueio eficaz do fluxo de elétrons e, consequentemente, na interrupção da fotossíntese (FLECK *et al.*, 2001; LEBARON *et al.*, 2008; DA SILVA, 2020) (Figura 2).

Atualmente, a aplicação da atrazina ocorre em duas modalidades. No pré-emergência, que visa o controle das sementes das plantas daninhas, a aplicação ocorre durante a semeadura do cultivo, por meio de um sistema conhecido como "Três em um", que engloba adubação, plantio e aplicação da atrazina em uma única operação, e na modalidade de pós-emergência, que é realizada após o surgimento das plantas daninhas e antes que estas interfiram no desenvolvimento da cultura devido à competição (ADAPAR, 2023).

Essa técnica teve início durante a década de 1990, isso ocorreu devido à dificuldade em obter um período seco logo após a semeadura, levando os agricultores a aplicarem a atrazina sobre o cultivo em estágio inicial de desenvolvimento, ou seja, de maneira mais tardia (DE OLIVEIRA, 2015). A potencialização da atrazina ocorre mediante a adição de surfactante, quando aplicada de acordo com as condições técnicas adequadas, uma única aplicação é suficiente (MONQUERO *et al.*, 2009; DA SILVA, 2020; ADAPAR, 2023).

Figura 2- Mecanismo de ação da atrazina



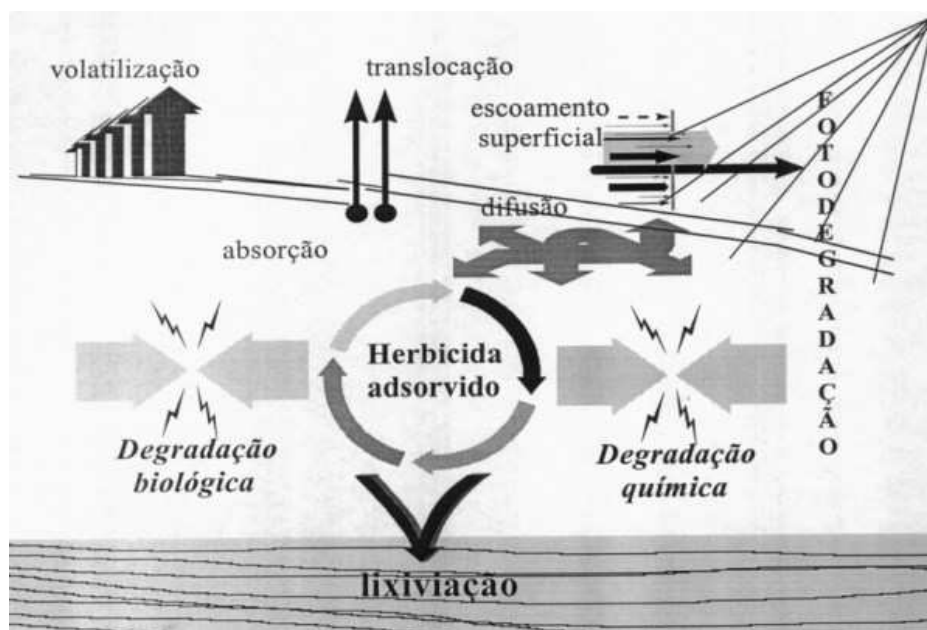
Fonte: Adaptado de Pereira de Albuquerque *et al.*, (2020)

4.3 Destinos da atrazina no solo

O destino da atrazina é determinado por três processos básicos, que são transformação, retenção e transporte, que ocorrem de maneira dinâmica e simultânea (Figura 3) (LAIRD & KOSKINEN, 2008; DÍEZ *et al.*, 2011).

O processo de transformação pode ocorrer por meio da degradação biológica e/ou química, que inclui fotodegradação e hidrólise. A degradação de um herbicida resulta na quebra da molécula em compostos menores, eventualmente convertendo-se em CO_2 e água. Os produtos secundários podem apresentar características físico-químicas distintas dos produtos principais, podendo inclusive demonstrar uma maior fitotoxicidade para as culturas (KARAM, 2007).

Figura 3 - Rota da Atrazina e sua persistência no ambiente



Fonte: Javaroni *et al.*, (1999)

O processo de transporte envolve diversos fenômenos, tais como a absorção pelos vegetais, translocação, volatilização, deriva, lixiviação e escoamento superficial (runoff), sendo a lixiviação e o escoamento superficial os mais relevantes (MANCUSO *et al.*, 2011).

De maneira geral, a absorção de herbicidas pelas plantas pode ocorrer por meio do sistema radicular, sendo rapidamente transportada pelo xilema (com movimento restrito no floema) e acumulada nos meristemas. A absorção aumenta conforme a concentração desses herbicidas no solo, assim como o seu fluxo respiratório, esses processos são afetados por fatores como umidade, temperatura, porosidade e densidade do solo (MEROTTO *et al.*, 2004; BLANCO *et al.*, 2013).

A lixiviação corresponde ao transporte de um composto através do perfil do solo. Na atrazina, a sorção é determinante para o potencial de lixiviação nos solos, ocorrendo geralmente por interações fracas. Este processo é reversível (ou parcialmente reversível), sendo que a dessorção comumente ocorre em taxas mais lentas do que a sorção (adsorção) (ARCHANGELO *et al.*, 2005).

O processo de retenção de um herbicida depende de sua absorção pela fração sólida do solo, as propriedades das s-triazinas e do solo, como a quantidade e qualidade da matéria orgânica, a constituição mineral e o pH, estão entre os fatores que influenciam (DE OLIVEIRA, 2015). De maneira geral, solos com maior quantidade

de matéria orgânica costumam resultar em maior absorção de alguns herbicidas, incluindo a atrazina (KASOZI *et al.*, 2012).

4.4 Degradação de atrazina por bactérias

A remoção e/ou degradação de diversos poluentes orgânicos xenobióticos no ambiente requerem a presença de organismos com o potencial de biotransformação ou bioabsorção e de condições especiais para que ocorra (DO CARMO *et al.*, 2013). A atrazina é recalcitrante e uma das alternativas para remoção dessas substâncias depende das características de cada matriz do solo, da microbiota presente e da disponibilidade de nutrientes (HUNTER & SHANER, 2010).

Em locais contaminados com atrazina, microrganismos nativos podem desenvolver a capacidade de degradar essa molécula e a atrazina pode ser utilizada como fonte de carbono, e/ou nitrogênio por esses microrganismos, seja por vias metabólicas aeróbicas, ou anaeróbicas, tanto *in situ* quanto em condições *in vitro*. As espécies bacterianas geralmente realizam a descloração, da molécula de atrazina, levando à formação de Desetilatrazina, Desisopropilatrazina, Hidroxiatrazina (ARIOLE & ABUBAKAR, 2015; SINGH *et al.*, 2017).

A degradação aeróbia da atrazina ocorre na presença de oxigênio molecular como receptor de elétrons, utilizando a atrazina como doador de elétrons em reações bioquímicas sequenciais. O processo resulta na geração de dióxido de carbono e água. Este processo é mais predominante porque os microrganismos nas camadas mais profundas do solo são menos abundantes do que nas camadas superficiais e são desfavorecidos pelos parâmetros cinéticos dos processos anaeróbios. Embora a atrazina tenha alto potencial de degradação em condições aeróbias, ela pode ser facilmente lixiviada para camadas mais profundas do solo, dependendo da atividade metabólica de microrganismos anaeróbios para sua biodegradação (MATIAS *et al.*, 2021; FUZIWARA, 2023).

Dentre os microrganismos aeróbios degradadores de atrazina destacam-se os gêneros *Pseudomonas* (FERNANDES *et al.*, 2014); *Enterobacter* spp. (SOLOMON *et al.* 2013); *Klebsiella* spp. (COOK *et al.*, 1981); *Bacillus* spp. (MARECIK *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2014); *Nocardia* spp.; *Azospirillum* spp.; *Alcaligenes* spp.; *Proteus* spp.; *Serratia* spp. e *Arthrobacter* spp. (TOMASSONI *et al.*, 2014).

Embora a presença de atrazina possa ser detectada em várias camadas do solo, observou-se uma significativa atividade de degradação da atrazina, com uma

degradação média de cerca de 65% nas camadas profundas (DOUGLASS *et al.*, 2017; MATIAS *et al.*, 2021). Alguns microrganismos anaeróbios degradadores de atrazina obrigatoriamente ou facultativamente destacam-se: *Bacillus* spp, *Micrococcus* spp, *Citrococcus* spp. (ARIOLE & ABUBAKAR, 2015; YANG *et al.*, 2018).

4.5 Atrazina, meio ambiente e saúde.

As agências reguladoras geralmente caracterizam a atrazina como um agente moderadamente tóxico, porém, o maior risco ambiental reside em seus resíduos e na sua capacidade de acumulação, tornando-se um poluente orgânico presente de forma ubíqua, encontrado no ar, solo, águas superficiais e subterrâneas (ZHANG *et al.*, 2015; SUN, *et al.*, 2019). É importante ressaltar que fatores bióticos, abióticos e características climáticas influenciam o comportamento da atrazina nos diferentes ambientes (DE OLIVEIRA, 2015).

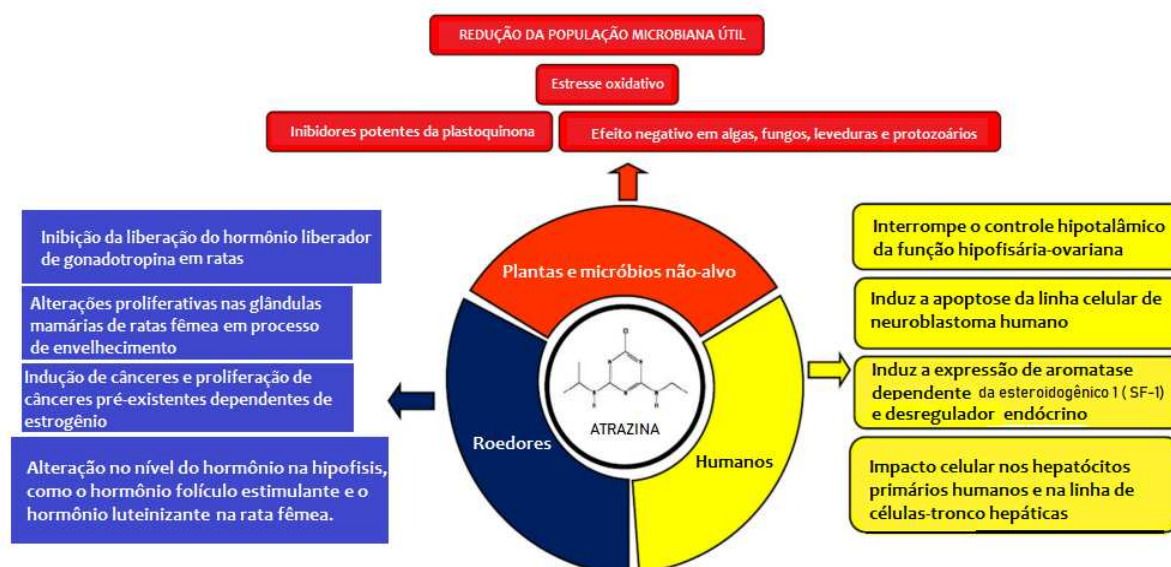
Esse herbicida pode ser incorporado e transmitido através das cadeias tróficas, resultando na contaminação e prejuízo a uma ampla gama de espécies vegetais e animais, o que pode desequilibrar o ecossistema e gerar uma pluma de contaminação, devido à mobilidade desse composto.

Uma forma comum de representar a toxicidade de um agrotóxico é através do valor da dose média letal (DL₅₀), que é relevante para determinar a quantidade capaz de causar a morte de metade da população de um ser vivo alvo utilizado nos testes (FUZIWARA, 2023).

Contudo, a maior preocupação reside na persistência ambiental da atrazina, que gera inquietação devido à sua capacidade de bioacumulação e toxicidade crônica (PROSEN, 2012). Em seres humanos, a atrazina tem sido identificada como desregulador endócrino, suscitando preocupações sobre os impactos na reprodução e sua possível carcinogenicidade (HÉNAULT-ETHIER, 2016).

Estudos indicam sua associação com o desenvolvimento de cânceres em diversos órgãos, como o sistema linfático, pulmões, bexiga, mielomas múltiplos e câncer de mama (TODARO *et al.*, 2011; FUZIWARA, 2023). Além disso, a estabilidade da atrazina em leite e água levanta preocupações sobre sua ingestão e os potenciais problemas que pode causar aos seres humanos, incluindo efeitos indesejáveis como a perturbação do ciclo menstrual nas mulheres devido à atividade antiestrogênica, e a deterioração da qualidade do sêmen em homens expostos ao ingrediente ativo (FUZIWARA, 2023). (Figura 4).

Figura 4 - Toxicidade e efeitos prejudiciais da atrazina em seres humanos, plantas, animais e microrganismos



Fonte: Adaptado de de Singh *et al.*, (2017)

Estudos realizados com organismos microbianos capazes de degradar a atrazina concluíram que a persistência do ingrediente ativo não deve ser subestimada, uma vez que, mesmo após 160 dias, a mineralização completa do herbicida não foi alcançada (FUZIWARA, 2023). Em alguns países da Europa, a atrazina foi proibida, porém, resquícios ainda podem ser observados no solo mesmo após mais de 20 anos desde a sua última aplicação, representando potenciais ameaças ao meio ambiente e às gerações futuras (VONBERG *et al.*, 2014).

4.6 Biorremediação de solos contaminados com atrazina

A biorremediação é um conjunto de tecnologias que emprega organismos vivos ou seus componentes, como microrganismos, plantas ou enzimas, para degradar ou transformar contaminantes perigosos em materiais como dióxido de carbono, água, sais inorgânicos, biomassa microbiana e outros subprodutos que podem ser menos tóxicos do que os materiais originais. Uma vantagem significativa da biorremediação é sua característica de ser uma tecnologia limpa, de custo relativamente baixo, que se baseia na capacidade fisiológica de certos organismos para degradar compostos (EPA, 2007; DEON *et al.*, 2012; ROSA *et al.*, 2012; TOLLER, 2019).

As técnicas de biorremediação podem ser classificadas com base no local onde ocorre a biodegradação, quando a técnica é aplicada diretamente no local contaminado, é denominada *in situ*; enquanto que, quando o material contaminado é removido para ser tratado fora do local de contaminação, é chamada de *ex situ* (BERTICELLI *et al.*, 2016; TOLLER, 2019).

Outra maneira de classificar os processos de biorremediação é com base no tipo de modificação realizada no ambiente contaminado. Isso pode variar desde o monitoramento passivo da contaminação (atenuação natural) até a introdução de nutrientes ou microrganismos (bioestimulação e bioaugmentação, respectivamente). Além de oferecer altas taxas de remoção, a biorremediação é considerada uma alternativa mais sustentável, em comparação com métodos convencionais de tratamento devido à sua natureza biológica (BERTICELLI *et al.*, 2016; TOLLER, 2019).

Outras vantagens incluem a simplicidade nos modelos de projeto e construção, facilidade de operação e uma relação custo-benefício favorável devido ao baixo consumo de energia necessário. As tecnologias que se baseiam em sistemas biológicos para degradar contaminantes orgânicos recalcitrantes, como os tratamentos biológicos, fundamentam-se na habilidade de bactérias, fungos, enzimas e biofilmes para biotransformar a atrazina, facilitando sua mineralização. Esses estudos têm demonstrado eficácia comparável e, em muitos casos, até superior aos métodos físico-químicos (HE *et al.*, 2019; NICODEMO, 2021).

Como exemplos, pode-se mencionar os estudos de Wu *et al.*, (2018), que alcançaram eficiências de remoção de atrazina de 95,53% com microrganismos, e de Sagarkar *et al.*, (2013, 2016), com *Arthrobacter* sp. AK-YN10 demonstrando a capacidade de degradar 1000 mg/L de atrazina em 24 horas em condições de laboratório. Por outro lado, pesquisas conduzidas por Cheyns *et al.*, (2012) sugerem que a presença de uma população nativa com capacidade de degradar a atrazina no solo é o fator mais significativo na remoção do contaminante (GRANDCLÉMENT *et al.*, 2017).

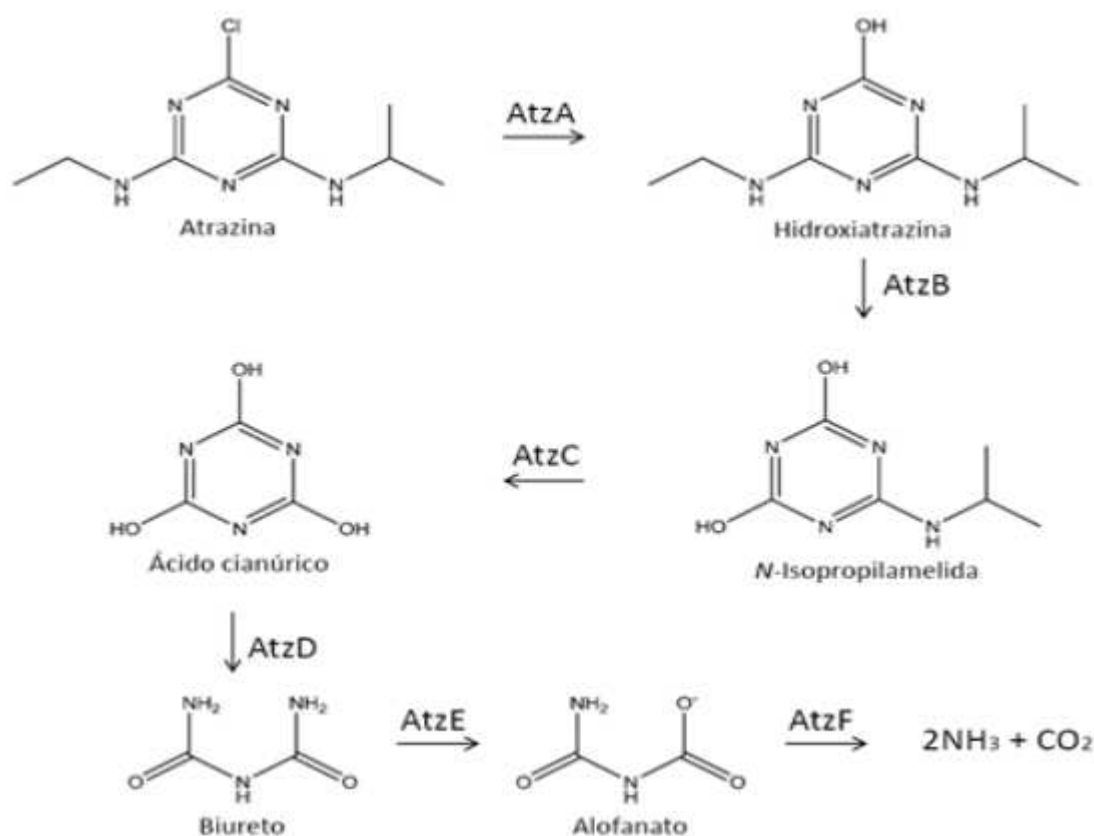
4.7 Enzimas envolvidas no processo de biodegradação da atrazina

A biodegradação da atrazina também pode ser conduzida por meio da ação enzimática, que se baseia na atuação de um catalisador biológico sobre o herbicida. As enzimas redox, ou oxirredutases, são responsáveis por catalisar as reações de oxirredução, e incluem hidrogenases, oxidases, peroxidases e hidroxilases, os

produtos dos genes *atzA*, *atzB* e *atzC* desempenham um papel crucial na remoção dos grupos clorados e dos resíduos de isopropilamina e etilamina, resultando na produção de ácido cianúrico. Posteriormente, esse ácido é convertido em NH_3 e CO_2 pela ação das enzimas codificadas pelos genes *atzD*, *atzE* e *atzF* (FERNANDES, 2014).

A proteína associada ao gene *trzD* é um metabólito análogo considerado mais eficiente na metabolização da atrazina, realizando uma rápida conversão em ácido cianúrico, um composto catabólico na primeira etapa da via de degradação. Outro gene envolvido na degradação da atrazina é o gene *trzN*, que faz parte da família das amidohidrolases e participa da degradação da atrazina (CAMPANARI, 2017) (figura 5).

Figura 5 - Via enzimática de degradação da atrazina



Fonte: Adaptado de Sene et al., (2010)

4.8 Fitotoxicidade

Os testes de toxicidade visam explorar os efeitos das substâncias químicas nos organismos e no ecossistema, bem como determinar seu potencial tóxico,

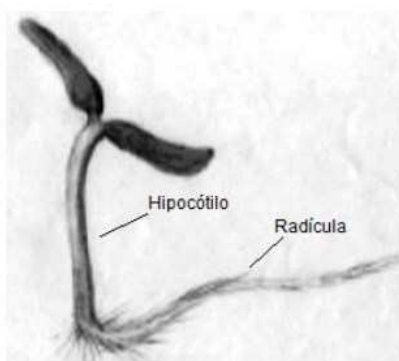
buscando entender se essas substâncias podem afetar os aspectos fisiológicos e moleculares dos organismos expostos (PEDUTO *et al.*, 2019).

Os ensaios utilizando sementes têm se destacado como excelentes indicadores biológicos de poluição, permitindo uma avaliação da toxicidade e do potencial mutagênico do ambiente natural (SANDALIO *et al.*, 2001). Além disso, eles demonstram uma sensibilidade maior às mudanças ambientais em comparação com outros indicadores biológicos (BAGATINI *et al.*, 2009).

Comparativamente a outros organismos utilizados em testes, o uso de plantas como bioindicadores apresenta diversas vantagens, sendo economicamente mais acessível e com custos inferiores em comparação com organismos animais. Outra vantagem relevante é que as plantas são organismos eucarióticos, compartilhando características celulares similares às de organismos animais e humanos, assim, se uma substância química danificar o DNA de uma planta, é provável que também possa causar danos ao DNA de outros organismos superiores reforçando ainda mais sua utilidade como ferramenta de análise (PALMIERI *et al.*, 2016).

O teste de fitotoxicidade, baseado no índice de germinação de sementes, envolve a avaliação combinada da germinação das sementes e do crescimento das raízes, ambas sensíveis aos componentes tóxicos presentes no meio de cultivo, os processos fisiológicos das plantas podem ser prejudicados pela presença de toxinas, assim, o princípio desses testes é analisar o desenvolvimento do crescimento da radícula e do hipocótilo (figura 6), o que indica a capacidade da planta de se desenvolver naquele ambiente (ROCHA, 2017).

Figura 6 - Morfologia da semente



Fonte: Adaptado de Leles (2017)

4.8.1 *Cucumis sativus* L.

A espécie *Cucumis sativus* L., popularmente conhecida como pepino, representa mais uma alternativa valiosa na identificação dos efeitos tóxicos. Assim como outras sementes, o bioensaio com *C. sativus* oferece diversas vantagens como, sensibilidades a compostos químicos, de fácil manipulação, apresentando boas condições cromossômicas e baixo custo (LELES, 2017).

A plântula da semente do pepino desempenha um papel crucial na observação do desenvolvimento em resposta a diferentes substâncias nocivas, bem como na avaliação de sua capacidade de causar danos à planta em fases posteriores do crescimento (CALDASSO, 2018).

C. sativus é frequentemente utilizado como modelo vegetal em testes de toxicidade com agrotóxicos. Estudos realizados para avaliar a fitotoxicidade de pesticidas piretróides, como cipermetrina, deltametrina e cialotrina, e seu metabólito ácido fenoxibenzóico, revelaram impacto negativo apenas na porcentagem de germinação quando as sementes foram expostas ao metabólito. Enquanto a cipermetrina afetou o comprimento da raiz e das partes aéreas da planta, a deltametrina influenciou apenas o comprimento da raiz. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas no desenvolvimento da semente quando expostas à cialotrina e ao metabólito (BRAGANÇA *et al.*, 2018).

A avaliação da atividade fitotóxica dos herbicidas benzoxazóis, utilizando *C. sativus*, *Allium cepa*, *Solanum lycopersicum* e *Sorghum bicolor*, também foi conduzida. Todos os compostos herbicidas sintetizados resultaram na inibição da germinação das sementes nas quatro espécies vegetais testadas (SANGI *et al.*, 2019), evidenciando que *C. sativus* é uma planta sensível aos poluentes e pode ser empregada como uma espécie modelo eficaz em análises de fitotoxicidade (ANDRETTA, 2022).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

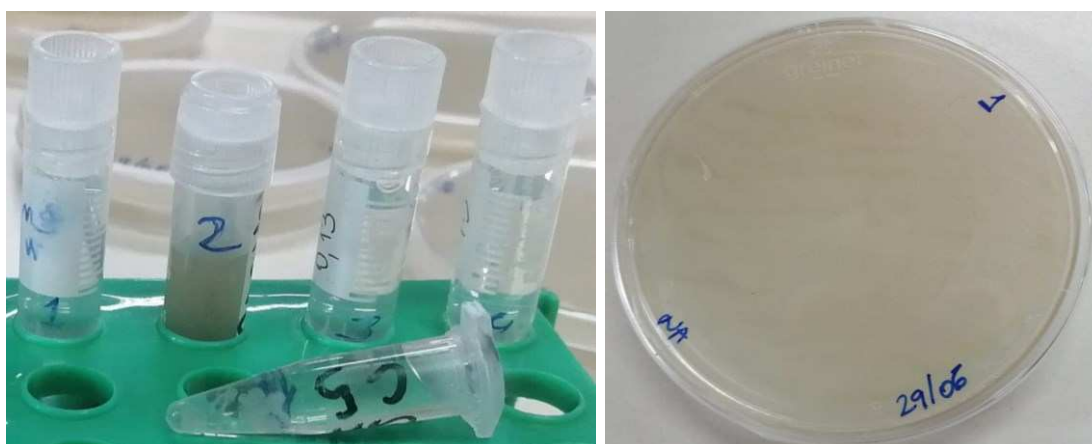
5.1 Amostras bacterianas

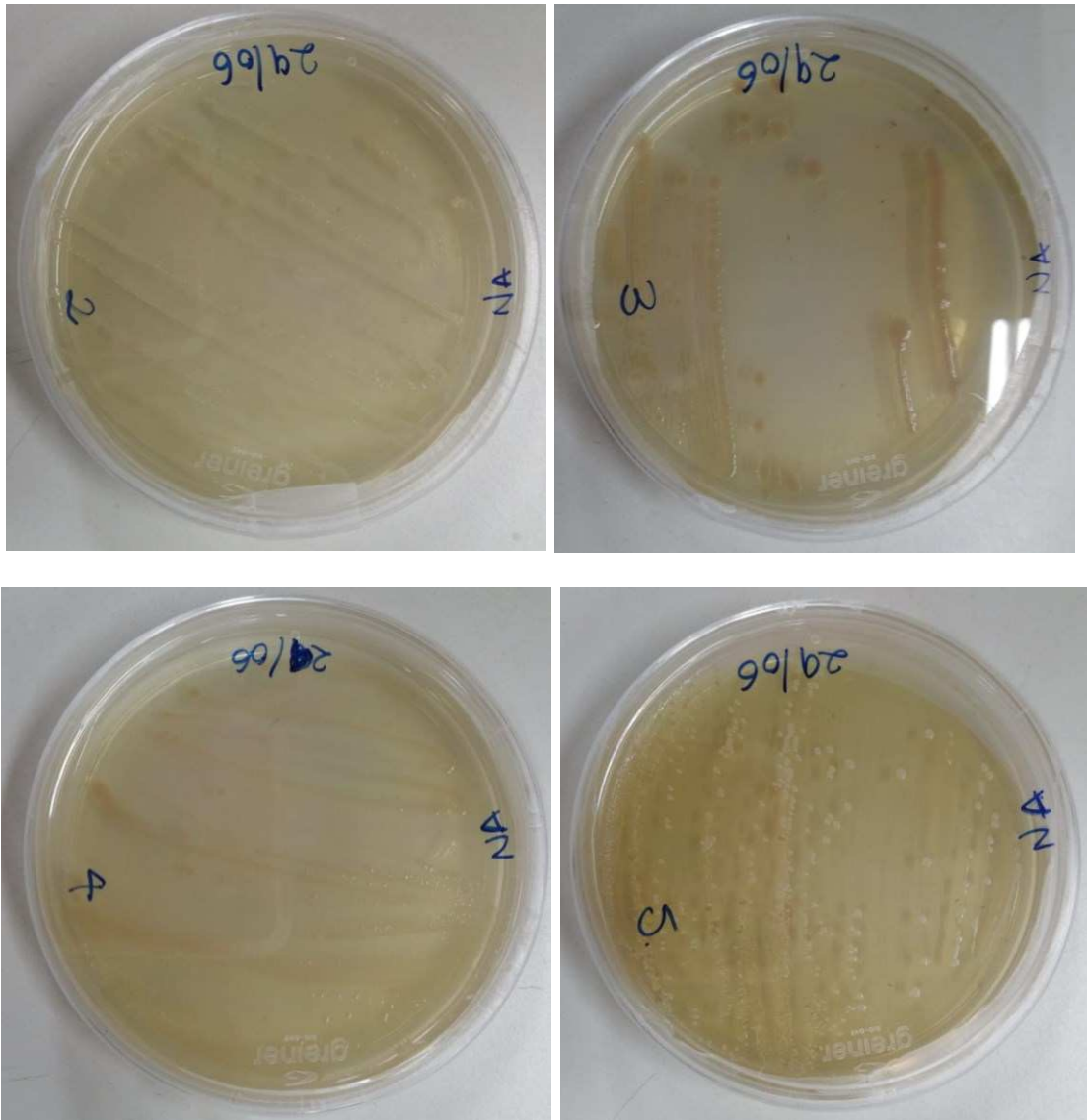
Inicialmente foram reativadas cinco linhagens bacterianas depositadas na Coleção de Cultura de Microrganismos de Importância Biotecnológica e Ambiental (CCMIBA) alocada no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA): Isolados CCMIBA bac 1.2; 2; 3; 4 e 5. As bactérias foram isoladas de amostras de solo agrícola com histórico de mais de 10 anos de utilização de agrotóxico, conforme Da Silva (2020). As linhagens estão em fase de caracterização taxonômica utilizando análise moleculares.

5.2 Reativação e repique

As linhagens foram reativadas em meio de Agar nutriente (NA) (0,5% peptona; 0,3% de extrato de carne; 1,5% ágar; 0,5% NaCl) incubado a 30°C por 48 horas (figura 7). Ao verificar o crescimento bacteriano se realizou o repique, retirando uma colônia da bactéria reativada anteriormente, e espalhando da forma de estrias em outra nova placa, após nova incubação a 30 °C por 48 horas. Na sequência foi realizada a coloração pelo método de Gram em cada linhagem para verificar a viabilidade e a pureza dos cultivos.

Figura 7- Amostra bacteriana





Fonte: Autoria própria (2023)

Para as linhagens selecionadas foi realizado o pré-inóculo no meio de cultura caldo LB (Luria Bertani): para 1 litro de água destilada foi adicionado 10 g de triptona; 5 g de extrato de levedura e 5 g de Cloreto sódico (Sagarkar *et al.*, 2016). O ensaio foi realizado em Erlenmeyers com 20 mL do meio LB inoculados com duas colônias da bactéria que foi replicada anteriormente. Os ensaios foram realizados em triplicada e como controle negativo (branco) foi utilizado o meio de cultura LB sem inoculação. Os Erlenmeyers foram incubados em shaker a 30°C e 150 rpm por 48 horas (figura 8).

Figura 8 - Pré-inóculo com as linhagens bacterianas



Fonte: Autoria própria (2023)

5.3 Teste de degradação

Para o ensaio de degradação da atrazina foi utilizado o meio de cultura BS (meio Basal) (Cai *et al.*, 2003): para 1L de água destilada, contendo 0,9 g de Fosfato monopotásico (KH_2PO_4); 6,5 g de Fosfato sódico dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) e 0,2 g de Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Os ensaios foram delineados a partir de um planejamento experimental fracionário 2^{5-1} , usando como variáveis independentes: concentração do inóculo, concentração da atrazina, NH_4Cl , Sacarose e pH, tabela 1.

Tabela 1 - Variáveis e valores utilizados no ensaio planejamento experimental fracionário 2^{5-1} (Carvalho da Silva *et al.*, 2022)

Variáveis	Nível -1	Nível 0	Nível +1
Inóculo D. O	0,1	0,3	0,5
Atrazina mg/L	0,1	1,05	2
Sacarose g/L	0	1	2
NH_4Cl g/L	0	0,5	1
pH	5	7	9

Fonte: Autoria própria (2024)

5.4 Preparo dos inóculos

Antes da inoculação no meio BS, foi realizado o planejamento experimental fracionário 2^{5-1} e com tabelas no programa Excel, e o crescimento microbiano dos pré-

inóculos (item 5.2) foi avaliado em espectrofotômetro. Assim, os pre-inóculos em meio LB foram transferidos para tubos tipo falcon em condições estéreis e centrifugados a 6.000 rpm a 4°C por 10 minutos, a seguir o sobrenadante foi descartado e adicionado 20 mL do médio BS, homogeneizado e centrifugado por 10 minutos. Novamente foi descartado o sobrenadante e em seguida adicionados 20 mL do meio BS para diluir as células.

Em seguida, para inoculação no ensaio a concentração do inóculo foi avaliada no espectrofotômetro a 600 nm e a quantidade de cultivo necessário conforme Tabela 2 em 100 mL de meio BS foi obtida mediante da equação (Pereira, 2020):

Equação 1.

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

C_i: valor da densidade óptica das amostras após cálculo do fator de diluição

V_i: (valor a encontrar)

C_f: 0,1, 0,3 ou 0,5 OD₆₀₀

V_f: 100 mL volume final do meio BS

5.5 Tratamento com atrazina

Os inóculos, com uma concentração de 0,1, 0,3 e 0,5 D.O de absorvância a 600 nm em caldo BS, foram inoculados em frascos Erlenmeyer contendo meio BS, conforme a tabela 2 (figura 9), totalizando 20 ensaios. Como controle, a bactéria foi cultivada em caldo BS sem atrazina e, para o controle negativo, foi utilizado caldo BS sem inoculação microbiana. Os ensaios foram incubados em um shaker a 30°C e 150 rpm por 72 horas.

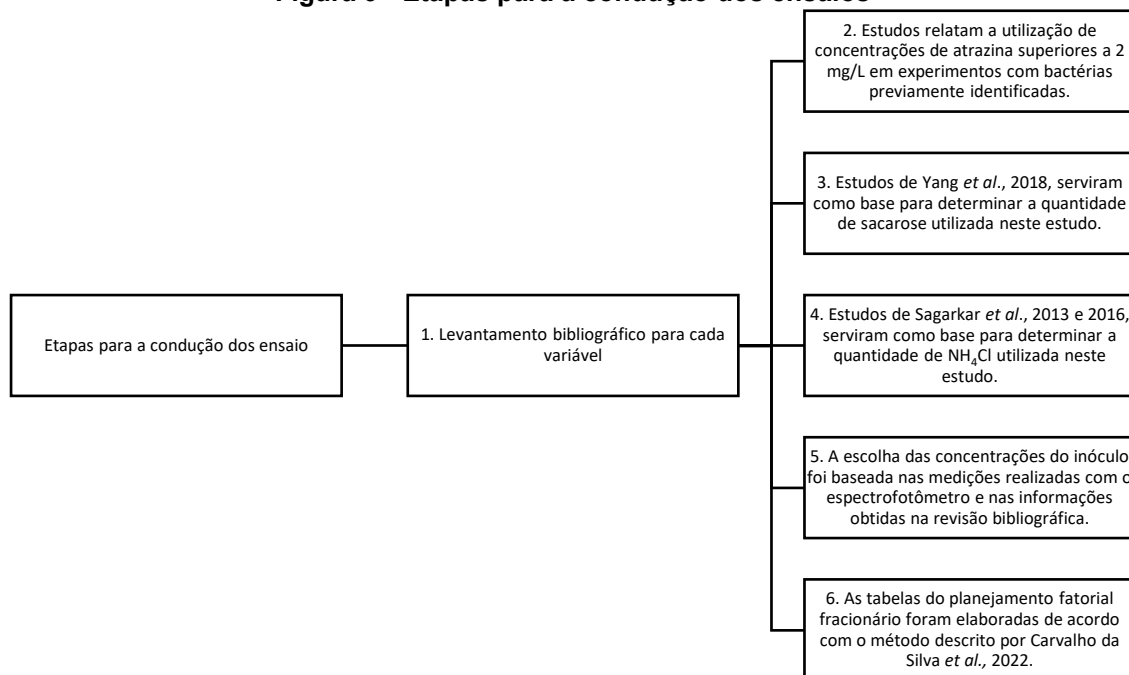
Tabela 2 - Concentrações das variáveis utilizados no ensaio planejamento experimental fracionado 2⁵⁻¹

Ensaio	Inoculo (D.O)	Atrazina mg/L	Sacarose mg/L	NH ₄ Cl mg/L	pH
1	0,1	2	0	0	5
2	0,5	0,1	0	0	5
3	0,5	2	0	0	5
4	0,5	2	0	0	9
5	0,1	0,1	2	0	5
6	0,5	0,1	2	0	9
7	0,1	2	2	0	9
8	0,5	2	2	0	5
9	0,1	0,1	0	1	5
10	0,5	0,1	0	1	9
11	0,1	2	0	1	9
12	0,5	2	0	1	5
13	0,1	0,1	2	1	9
14	0,5	0,1	2	1	5
15	0,1	2	2	1	5

16	0,5	2	2	1	9
17	0,3	1,05	1	0,5	7
18	0,3	1,05	1	0,5	7
19	0,3	1,05	1	0,5	7
20	0,3	1,05	1	0,5	7

Fonte: Autoria própria (2024)

Figura 9 - Etapas para a condução dos ensaios

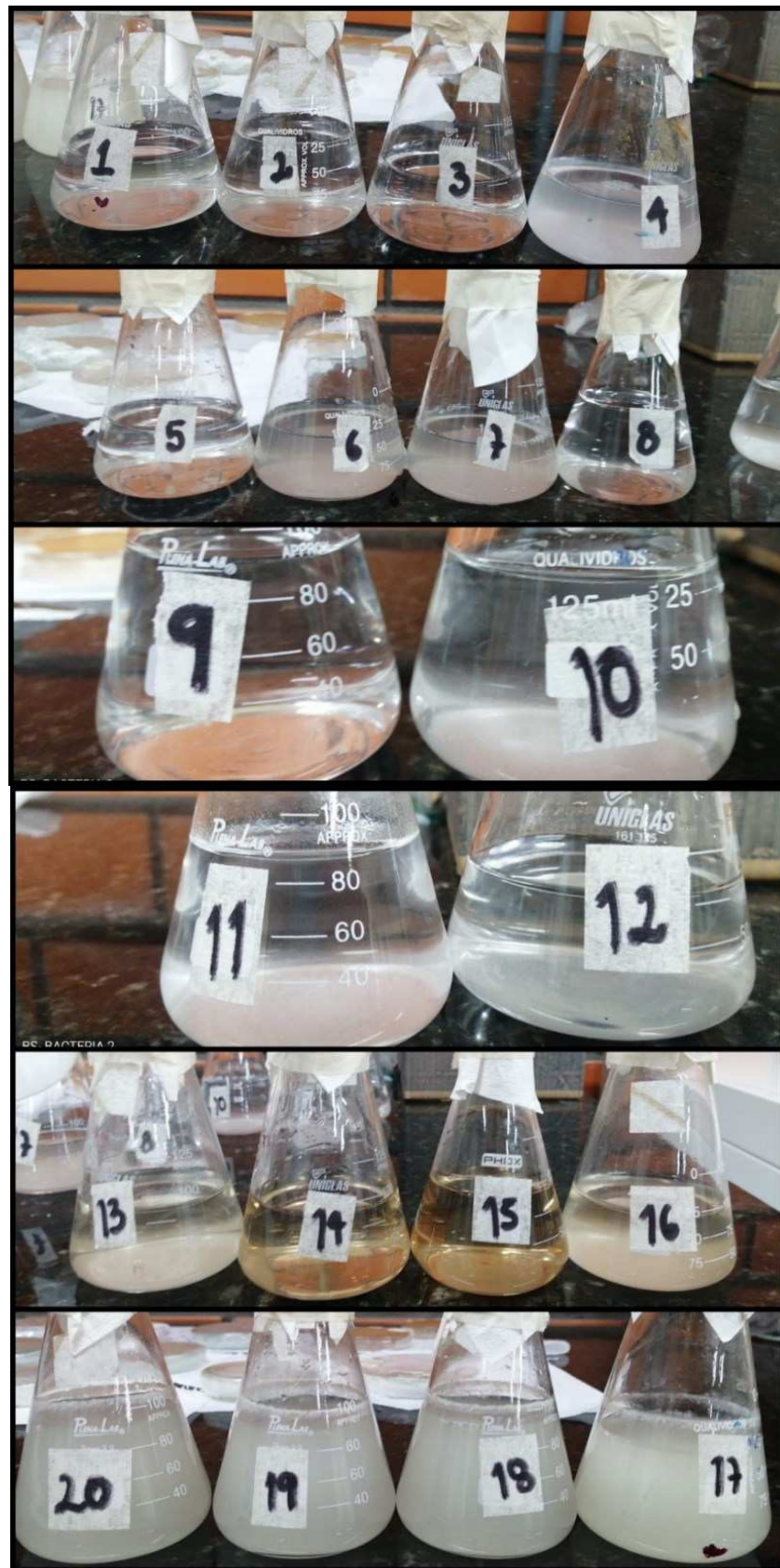


Fonte: Autoria própria (2024)

5.6 Crescimento bacteriano na presença de atrazina

Após a incubação, o crescimento de cada ensaio foi avaliado por meio de espectrofotometria a 600 nm (figura 10). Os ensaios que apresentaram resultados significativos para o estudo foram centrifugados a 4°C e 6000 rpm por 10 minutos. O líquido sobrenadante foi transferido para um novo tubo Falcon estéril, preenchido até a metade, congelado e, em seguida, submetido à liofilização com pressão de 430.0x¹⁰⁰⁰ uHg, 30°C a 120 h. Para posterior análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Figura 10 - Crescimento bacteriano na presença de atrazina



Fonte: Autoria própria (2024)

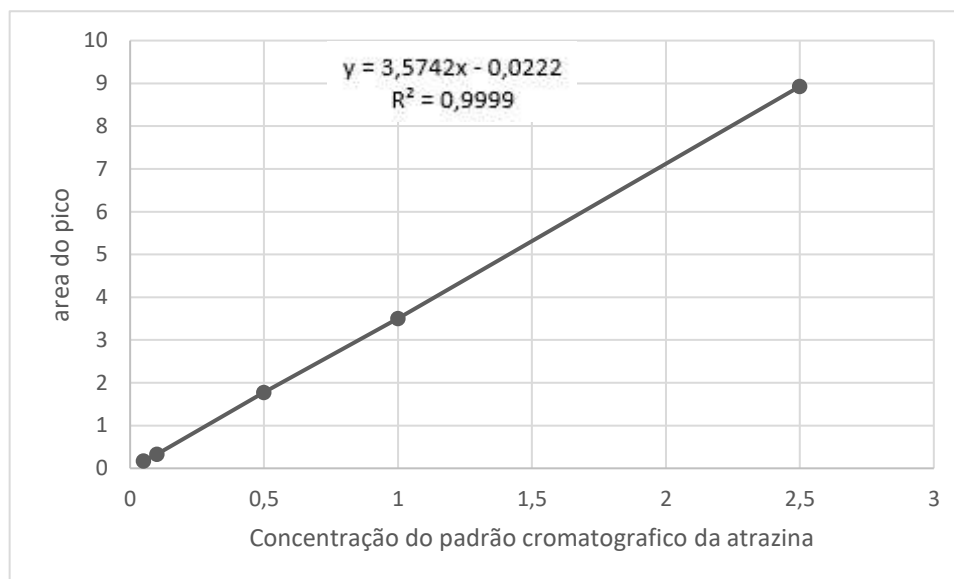
5.7 Avaliação da degradação da atrazina

Após a etapa de liofilização, os ensaios que apresentaram crescimento superior ao controle foram submetidos à análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) por prestação de serviço, foi utilizando um equipamento da marca Thermo Scientific, modelo Ultimate 3000, com detector UV-Vis e coluna C¹⁸ ajustado para 224 nm. Essa análise foi conduzida no laboratório de análises (LABANA) da UTFPR – Campus Francisco Beltrão. Para a composição da fase móvel vazão de 1mL.min, foram empregados os solventes, acetonitrila (CH₃CN) 40%, água 60% e isocrático.

A partir desta solução foram realizadas diluições obtendo-se cinco soluções nas concentrações: 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2,5 mg/L. Estas soluções foram sequencialmente injetadas no LC para elaboração da curva analítica padrão, o volume injetado no CLAE foi 20 µL da solução extraída por amostra. As corridas ocorreram durante 18 minutos, utilizando-se como fase móvel uma mistura de 40% de acetonitrila e o restante de água pura, com fluxo constante de 1,0 mL/min e comprimento de onda 224 nm (ARAUJO, 2022).

Na sequência, foi realizada uma curva de calibração para a atrazina, abrangendo diluições que variaram de 0,5 mg a 2,05 mg, a fim de determinar as áreas de pico e as concentrações correspondentes da atrazina em cada ensaio liofilizado. Os resultados das concentrações dos ensaios foram obtidos conforme equação geral da reta, onde foram tomados os resultados da concentração e área de pico de 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L e 2,5 mg/L da atrazina e gerado o gráfico da curva geral de calibração e o R², conforme figura 11.

Figura 11 - Equação geral da reta



Fonte: Autoria própria (2024)

Os resultados das concentrações de cada ensaio foram calculados com a equação geral da reta, adicionando os resultados das áreas dos picos de cada replicação na fórmula a seguir.

Equação 2.

$$y (\text{Área do pico da amostra}) = 3,5742x - 0,0222$$

Média das concentrações e áreas do padrão cromatográfico da atrazina.

5.8 Análise de fitotoxicidade com *Cucumis sativus* L.

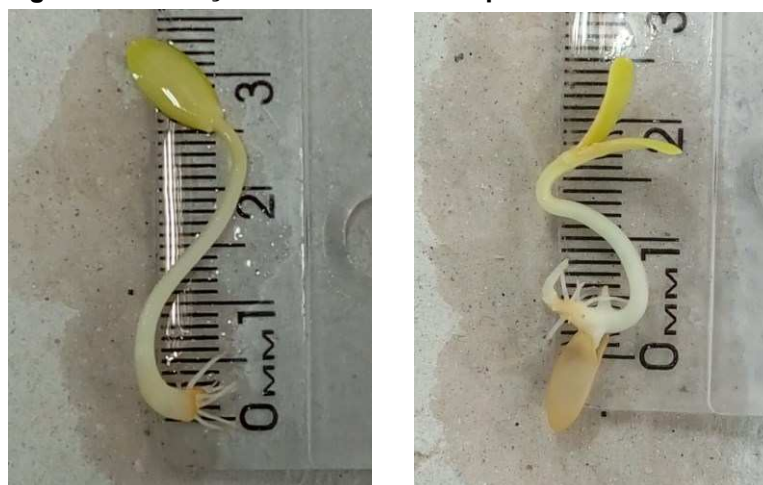
Os ensaios selecionados para a análise cromatográfica foram selecionados para avaliação da fitotoxicidade. Na análise utilizadas um total de 540 sementes de pepino, conforme Wang *et al.*, (2001). Inicialmente, as sementes foram pré-tratadas com solução de hipoclorito de sódio 0,1% por 20 min, em seguida embebidas em água deionizada por 10 min e lavadas três vezes com água deionizada antes do uso. Em seguida, com base nos estudos de Farias (2022) os ensaios de toxicidade foram realizados utilizando as sementes de pepinos cultivadas em placas de Petri, onde em cada placa foi colocado papel filtro, 15 sementes e 5 mL de cada tratamento bacteriano. Para evitar fragmento bacterianos, o sobrenadante de cada ensaio foi centrifugado, antes de ser colocado nas placas de Petri com as sementes. Três réplicas foram definidas para cada ensaio, e três réplicas para o controle negativo do tratamento bacteriano (apenas meio de cultivo e atrazina). Logo após, as placas foram

envolvidas com filme plástico para evitar evaporação, e mantidas em temperatura ambiente, no escuro, durante nove dias. Para o controle negativo foi usado uma solução de 0,05 mol/L sulfato de zinco (ZnSO_4) e para o controle positivo, água destilada. Após, as radículas e hipocótilos foram medidos com régua (figura 11), e por último, a porcentagem de inibição foi obtida através da fórmula abaixo (ANDRETTA, 2022)

Equação 3.

$$\% \text{ de inibição: } \frac{(\text{média do controle positivo} - \text{média do bioensaio})}{\text{média do controle positivo}}$$

Figura 12 - Medição das radículas e hipocótilos das sementes



Fonte: Autoria própria (2024)

5.9 Análises estatísticas

O delineamento experimental foi realizado usando o software Statistica 5.0. Os cálculos referentes às fórmulas descritas foram realizados utilizando o software Microsoft Excel 2013 (Microsoft, EUA).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Seleção e Crescimento bacteriano na presença de atrazina

Das cinco linhagens reativadas, somente as bactérias CCMIBA 2 e CCMIBA 4 mantiveram pureza e viabilidade para prosseguir no estudo. No entanto, durante o cultivo conforme o planejamento experimental fracionário 2^{5-1} , detectou-se possível contaminação no lote da CCMIBA 2, invalidando os resultados obtidos. Assim, os ensaios foram continuados apenas para o isolado designado como CCMIBA 4. Foram conduzidos 20 ensaios (tabela 2), dos quais quatro foram realizados sem a adição de qualquer fonte de carbono simples. Nestes ensaios, esperava-se que as linhagens utilizassem a atrazina como fonte de crescimento. Nos ensaios de 5 a 20, foram adicionadas fontes de carbono, como sacarose e fonte adicional de nitrogênio como NH_4Cl . Ainda em cada ensaio, a quantidade de atrazina e o inóculo foram ajustados, e o pH foi modificado conforme descrito na tabela 2. O crescimento inicial dos 20 ensaios foi avaliado por métodos espectrofotométricos a 600 nm, e os valores de absorbância estão detalhados na tabela 3.

Tabela 3 - Crescimento bacteriano (absorbância a 600 nm) dos 20 ensaios da CCMIBA 4 conforme planejamento experimental fracionário 2^{5-1}

Ensaio	Densidade ótica
1	0,041
2	0,251
3	0,041
4	0,443
5	0,046
6	0,675
7	0,146
8	0,171
9	0,047
10	0,178
11	0,014
12	0,311

13	0,664
14	0,646
15	0,512
16	0,564
17	0,629
18	0,758
19	0,775
20	0,456

Fonte: Autoria própria (2023)

Ao analisar os resultados da espectrofotometria, foi observado que alguns ensaios apresentaram um crescimento muito baixo na presença de atrazina e outra fonte de carbono. Devido a impossibilidade de análise cromatográfica de todos os ensaios, optou-se por submeter à cromatografia líquida de alta eficiência apenas os ensaios que apresentaram resultados significativos para o estudo. Para estes testes foi incluído o ensaio 4, que não continha fonte de carbono extra, além da atrazina, com um inóculo maior em pH de 5, e o ensaio 17, que continha fonte de carbono, atrazina em pH de 7 (Tabela 4), buscando avaliar se a alteração no cultivo poderia impactar a degradação.

Tabela 4 - Ensaio enviados para cromatografia de alta eficiência

Ensaio	Inoculo (D.O)	Atrazina mg/L	Sacarose mg/L	NH ₄ Cl mg/L	pH	Absorbância
4	0,5	2	0	0	9	0,443
17	0,3	1,05	1	0,5	7	0,629

Fonte: Autoria própria (2024)

Visando entender o comportamento da bactéria nas condições testadas os resultados foram avaliados em relação ao efeito de cada variável e sua significância (p-valor) conforme tabela 5. A adição da sacarose apresentou efeito significativo estatisticamente, ou seja, o crescimento foi diretamente afetado pela ausência de sacarose, sendo sua adição responsável por um aumento de 0,267 no D.O.

Tabela 5 - Estimativa do efeito de cada variável pelo software Statistica 5.0

	Efeito	p- valor
Variável	0,366550	0,000009
Inóculo	0,211375	0,103915

Atrazina	-0,038875	0,753784
Sacarose	0,266875	0,045443*
NH ₄ Cl	0,144625	0,253823
pH	0,092125	0,460997
*p-valor <0,05		

Fonte: Autoria própria (2024)

Estudos conduzidos por Wang & Xie (2012), relatam que fontes adicionais de carbono como sacarose, citrato de sódio ou galactose poderia promover significativamente o crescimento da *Arthrobacter* sp. A sacarose foi a fonte de carbono mais adequada para o seu crescimento. No entanto, a adição de atrazina ou amido induziu um crescimento insignificante após 24 horas de incubação, apontando que a estirpe não poderia utilizar atrazina ou amido como única fonte de carbono. Quando a atrazina foi a única fonte de carbono e nitrogênio para *Arthrobacter* sp., a degradação foi muito lenta, enquanto a adição de citrato ou acetato como suplemento de carbono resultaram em maior taxa de degradação (KOLIC *et al.*, 2007).

Enquanto que para o estudo realizado pelo Gao *et al.*, (2020), com Bactérias Mistas de *Klebsiella variicola* Cepa FH-1 e *Arthrobacter* sp. NJ-1 no qual as variáveis como sacarose e cloreto de amônio (NH₄Cl), foram utilizados para identificar os efeitos significativos na degradação da atrazina. Os resultados obtidos com a sacarose apresentaram coeficiente positivo na degradação da atrazina de 97,4%, sugerindo que era necessária uma concentração de sacarose para a degradação da atrazina pelas Bactérias Mistas de *Klebsiella variicola* Cepa FH-1 e *Arthrobacter* sp. NJ-1.

A suplementação de sacarose pode promover o crescimento da cepa ZXY-2 e, assim, aumentar a degradação da atrazina. Esta tendência foi consistente com estudos anteriores que: quando a atrazina era a única fonte de carbono para *Arthrobacter* sp. DAT1, a degradação foi lenta, enquanto a adição de sacarose como fonte suplementar de carbono resultou em maior taxa de degradação (WANG & XIE, 2012).

Nos ensaios somente com atrazina pode-se notar baixo crescimento quando o inóculo foi na menor concentração, indicando, possivelmente, a necessidade alta de célula para metabolizar a atrazina. Em adição, apesar não apresentar efeito estatisticamente significativo no planejamento, é visível o efeito do pH entre os ensaios 3 e 4, sendo o pH 9 com atividade. Segundo FAO (2000) na biodegradação, a atrazina pode ser hidrolisada com bastante rapidez em meios ácidos ou alcalinos, mas é muito resistente à hidrólise em meios neutros. No entanto, foi relatado que o pH ideal para

a degradação da atrazina por consórcios bacterianos foi 7 em comparação com pH de 6,5, 7,5, 8 e 8,5 (DEHGHANI *et al.*, 2013).

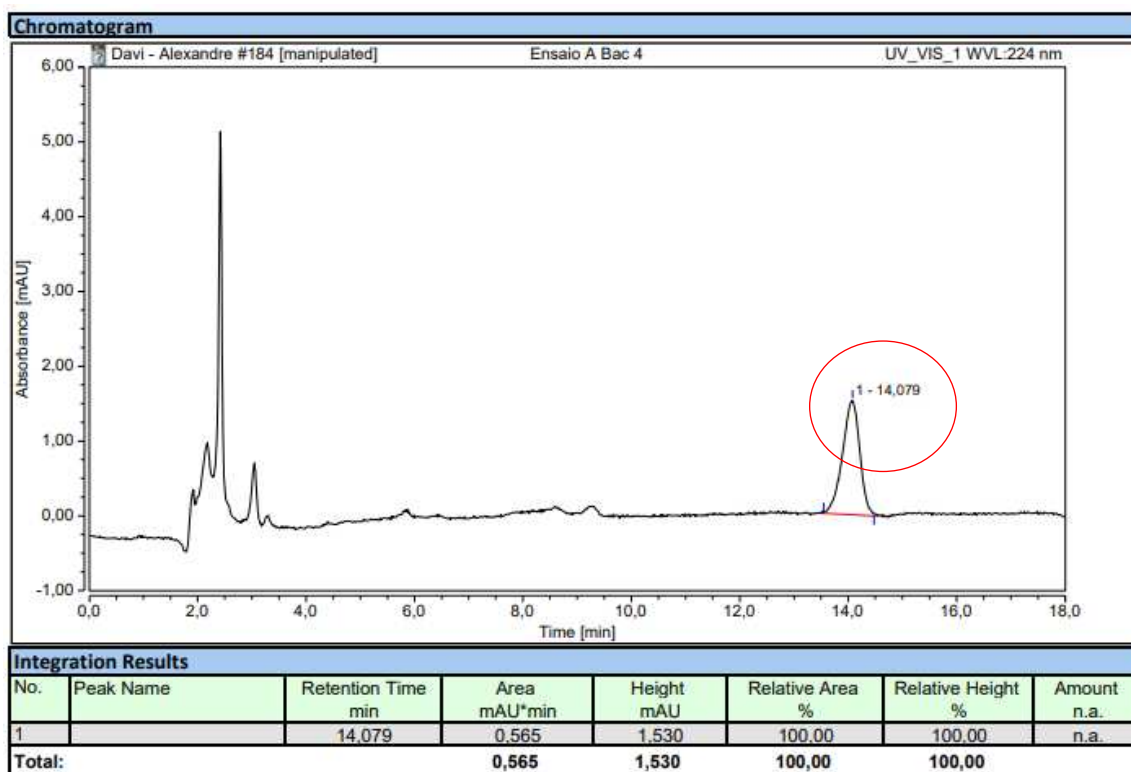
Além disso, Wang *et al.*, (2011), realizaram um estudo com a bactéria *Arthrobacter* sp. *tiveram* como resultado que as faixas ideais de temperatura e pH para a degradação da atrazina em sua pesquisa foram 20 - 40°C e 6,0 - 9,0, respectivamente. Demonstram que o isolado degrada eficientemente a atrazina com amplas faixas de temperatura e pH, indicando que o organismo tem forte capacidade de sobreviver e metabolizar a atrazina em ambientes contaminados, e capaz de ser usado para remediação de locais contaminados com atrazina.

O ensaio 17, que contém fonte adicional de carbono, destaca-se além da sacarose, a adição de NH₄Cl (como fonte de nitrogênio), pode ter contribuído para a degradação da atrazina por bactérias, porque ajuda na clivagem do anel, que é um processo fundamental na degradação da atrazina (RADOSEVICH *et al.*, 1995). Em adição, conforme Gao *et al.*, (2020) o NH₄Cl fornece fontes de nitrogênio para bactérias mistas, aumentando sua capacidade de degradar a atrazina.

6.2 Avaliação da degradação da atrazina

Os resultados da cromatografia líquida de alta eficiência para o ensaio 4 revelaram uma redução significativa da concentração de atrazina em todas as réplicas, como mostrado na figura 13. Observou-se que a degradação média da atrazina pelo ensaio 4 atingiu o 98,5% (Tabela 6).

Figura 13 - Resultado da CLAE do ensaio 4



*Círculo vermelho: pico de atrazina na amostra

Fonte: Autoria própria (2024)

Tabela 6 - Porcentagem de degradação da atrazina

Réplicas do ensaio 4	Concentração da atrazina	% Degradação
A	0,0085 mg/L	99,5 %
B	0,0052 mg/L	97%
C	0,0017 mg/L	99%
Media	0,00513 mg/L	98,5 %
Réplicas do ensaio 17	Concentração da atrazina	% Degradação
A	0	100%
B	0	100%
C	0	100%
Media	0	100%

Fonte: Autoria própria (2024)

No presente estudo, verificou-se que no ensaio 4 ocorreu a degradação de 98,5% da atrazina no qual continha apenas a atrazina como fonte de carbono e nitrogênio. No Trabalho realizado por Zhu, *et al.*, (2019), utilizando *Bacillus atrophaeus*, os resultados indicaram que o YQJ-6 foi tolerante a atrazina quando a concentração de atrazina aumentou de 200 para 500 mg/L, o crescimento de YQJ-6 conforme monitorado em OD600 não mudou significativamente ($P > 0,05$).

Portanto, foi preliminarmente considerado que a cepa YQJ-6 poderia tolerar pelo menos 1000 mg/L de atrazina nas condições experimentais. Em geral, altas concentrações de atrazina causaram redução significativa no número de fungos, mas

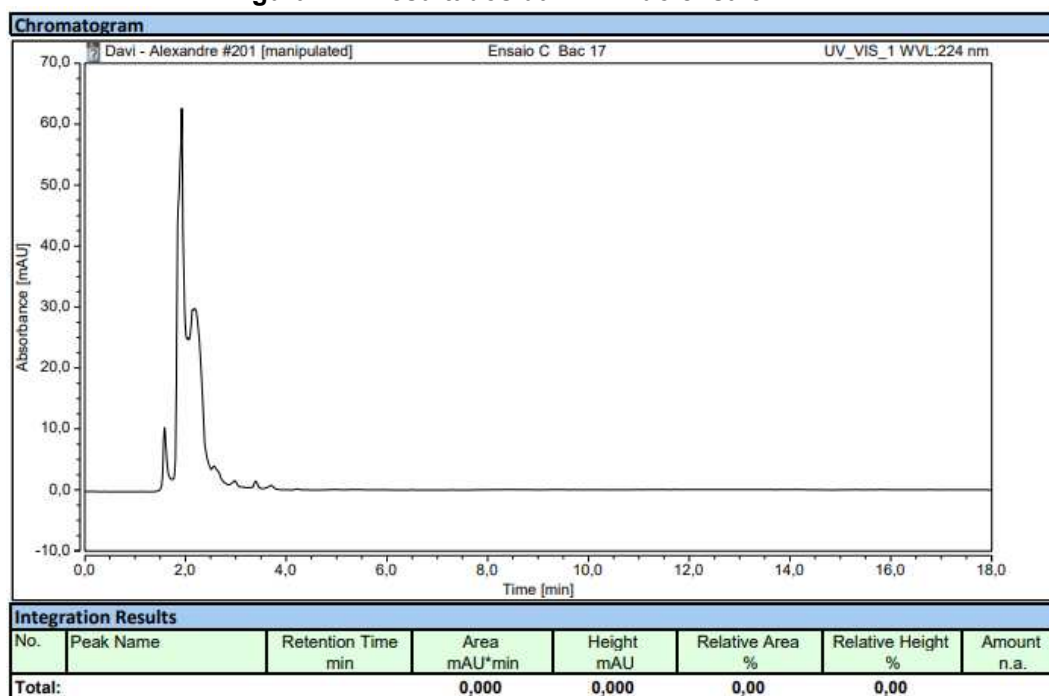
algumas cepas bacterianas não foram sensíveis à atrazina (FABRICE *et al.*, 2003). Assim, as cepas bacterianas foram consideradas mais adequadas para o tratamento de altas concentrações de amostras contaminadas por atrazina (MARECIK *et al.*, 2008).

Outros estudos supracitados como de Wang e Xie (2012) com *Arthrobacter* sp. DAT1, com degradação de 1000 mg/L de atrazina indicando uma remoção de quase 60% após 48 h de incubação.

Portanto, De acordo com os resultados do estudo, pode ser deduzido que a bactéria CCMIBA 4, apresentou potencial para degradação a atrazina (visto que a atrazina foi usada como única fonte de carbono neste ensaio), e esta bactéria pode ser usada com faixa mais ampla de concentrações de atrazina.

Para o ensaio número 17, em relação à degradação da atrazina, foi possível observar a completa degradação deste composto em todas as amostras, como demonstrado na figura 14. Verificou-se que a taxa de degradação para o ensaio 17 foi de 100% em todas as réplicas realizadas, não observando picos de atrazina nas réplicas levadas para cromatografia.

Figura 14 - Resultados da CLAE do ensaio 17



Fonte: Autoria própria (2024)

Nas diferença das pesquisas realizadas por Dehghani *et al.*, (2013) e Yang, *et al.*, (2018), utilizando sacarose como fonte de carbono, em consórcio bacteriano e

cepas de *Citricoccus* spp. respetivamente, todos os tratamentos com uma fonte de carbono suplementar tiveram taxas consideravelmente mais elevadas de degradação da atrazina do que os tratamentos correspondentes sem adição de carbono, indicando que a adição de uma fonte de carbono pode acelerar a degradação da atrazina, corroborando com os resultados do ensaio 17.

A presença de substratos adicionais pode iniciar o cometabolismo da atrazina. Estudos anteriores, citados pelos autores, indicaram que muitas bactérias não podem utilizar o carbono do anel da atrazina como fonte de energia; no entanto, o carbono do grupo alquilado forneceu suprimento para o crescimento bacteriano. Ainda, segundo os autores, a baixa quantidade de atrazina não é suficiente para sustentar o crescimento bacteriano, portanto, é necessária uma fonte suplementar de carbono (DEHGHANI *et al.*, 2013; YANG, *et al.*, 2018).

Além disso, os dados relacionados ao efeito do pH em estudos feitos pelos autores supracitados mostraram que, conforme o pH aumentou de 5,0 para 7,0, a taxa de biodegradação da atrazina também aumentou. No entanto, o aumento do pH de 7,0 para 8,5, interferiu na redução da taxa de biodegradação da atrazina. O pH 7 mostrou ser o ideal para a biodegradação da atrazina, com uma taxa de biodegradação de 87,72% nesse caso.

O estudo mencionado reforça os resultados obtidos no ensaio 17, que mostrou uma taxa de degradação da atrazina de 100%, com a adição de fonte de carbono adicional, como sacarose, em pH de 7. Portanto, de acordo com essas variáveis recomenda-se que, a bactéria estudada, faça parte de um consórcio bacteriano para avaliar a viabilidade da degradação da atrazina.

6.3 Fitotoxicidade

Para o ensaio 4, foi observado o desenvolvimento das sementes em duas das três réplicas, ou seja, em uma placa nenhum crescimento das sementes. Enquanto no ensaio 17 não houve crescimento observável nas sementes em todas as três réplicas realizadas. Os resultados do crescimento das sementes nos tratamentos estão expressos na tabela 6, onde o "tratamento" refere-se ao meio bacteriano com sementes, o "controle negativo do tratamento" representa o meio com atrazina sem cultivo bacteriano, e o "controle positivo" consiste em sementes com água ionizada. (Figura 15) (Tabela 7).

Figura 15 - Crescimento das sementes (A) ensaio 4 replica a; (b) ensaio 4 replica b; (c) ensaio 17 replica (a)





Fonte: Autoria própria (2024)

Tabela 7 - Média do crescimento das sementes (cm) e porcentagem de toxicidade das sementes dos ensaios

	Réplicas	Tratamento	C- Tratamento	C+ (água)	% toxicidade
Ensaio 4	A	0,333333333	0,00	8,00	0,958333333
	B	0,00	0,00	8,00	100
	C	1,666666667	0,00	6,50	0,743589744
	Média	0,666666667	0,00	7,50	0,958333333
Ensaio 17	A	0,00	0,00	8,00	100
	B	0,00	0,00	8,00	100
	C	0,00	0,00	6,50	100
	Média	0,00	0,00	7,50	100

Fonte: Autoria própria (2024)

Além das análises de germinação das sementes (Tabela 6), a eficiência da biodegradação é melhor avaliada através dos cálculos de toxicidade dos ensaios. Os cálculos para o percentual de toxicidade dos ensaios com a bactéria cultivada na presença de atrazina e outros compostos (Tabela 7) do ensaio 4 comprovaram uma diminuição de 6% na toxicidade, enquanto o ensaio 17 apresentou 100% de toxicidade.

Os resultados da fitotoxicidade com as sementes não demonstraram uma degradação significativa, o que pode ser atribuído a diversos fatores. Uma das

possibilidades é que a bactéria estudada não apresentou capacidade de mineralizar completamente o pesticida, resultando na formação de outras substâncias também tóxicas que podem ter contribuído para inibir o crescimento das sementes. A biodegradação incompleta da atrazina pode levar à formação de desetilatrizona (DEA) e desisopropilatrizona (DIA) por meio do processo de dealquilação microbiológica. Esses metabólitos são considerados tão tóxicos quanto a atrazina e têm solubilidade em água maior do que o herbicida original, o que pode resultar em um impacto ambiental mais significativo (WINKELMANN & KLAINE, 1991; LOSS & NIESSNER, 1999; SCRIBNER *et al.*, 2000).

Assim, torna-se imprescindível realizar mais experimentos com diferentes variáveis a fim de confirmar e melhorar as condições para a degradação de atrazina pela bactéria. À semelhança dos estudos mencionados anteriormente, pode envolver o aumento da concentração de atrazina para 50 ou 100 mg/L (Wang e Xie, 2012; Yang *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2019), a exploração de diferentes faixas de temperatura e pH, para investigar uma possível correlação entre essas variáveis e a degradação da atrazina pela bactéria, conforme demonstrado em estudos anteriores (Wang *et al.*, 2011; Dehghani *et al.*, 2013). Além disso, é crucial considerar o tempo de inoculação e degradação, uma vez que a maioria das pesquisas realizadas adotou períodos superiores a 24 horas (Zhang *et al.*, 2019 [7 dias]; Ngigi *et al.*, 2013 [59 dias]; Pan *et al.*, 2023 [9 dias]). Por fim, uma outra variável extremamente importante a ser investigada, que está presente em todos os estudos mencionados anteriormente, é a detalhada caracterização e precisa identificação dos genes responsáveis pela eficiente degradação da atrazina. A aplicação desses fatores mencionados, pode ser fundamental para entender em profundidade o complexo mecanismo de degradação empregado por esses genes específicos.

7 CONCLUSÃO

O ensaio 17 com a bactéria 4, quando cultivada na presença de atrazina, demonstrou os melhores resultados, alcançando uma taxa de degradação de atrazina de 100%. Para o ensaio 4 com a mesma bactéria registrou uma taxa ligeiramente menor, de 98,5%, ambos após 72h. Isso sugere que essa bactéria possivelmente foi capaz de degradar a atrazina na ausência ou na presença de uma fonte adicional de carbono, entretanto, os metabólitos resultantes dessa degradação mostraram-se tóxicos para as sementes de *C. sativus*, levando à ausência de germinação. Estudos subsequentes devem ser conduzidos para otimizar a degradação, diminuindo a toxicidade e possivelmente a geração de metabólitos tóxicos, bem como investigar consórcios com três ou mais bactérias atuando em conjunto, o que pode representar uma opção promissora para a completa degradação da atrazina. Também é interessante prolongar o tempo de degradação, aumentar a concentração de atrazina em cada amostra e explorar outras variáveis, como a temperatura, e até quantificar metabólitos resultantes da degradação da atrazina. Esta bactéria estudada apresentou potencial significativo para a aplicação na biorremediação da atrazina.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRETTA, A. **análise da fitotoxicidade da atrazina após biodegradação fúngica**, 2022. 59 fls, Tese. Bacharel em Biotecnologia, Universidade Federal da Integração Latino-Americana- Foz do Iguaçu, 2022.

ARAUJO, A. R. **Efeitos da aplicação de atrazina em três solos representativos do sudoeste do Paraná**. 2022. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2022.

ARIAS-ESTÉVEZ, M.; LÓPEZ-PERIAGO, E.; MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; SIMAL GÁNDARA, J.; MEJUTO, J. C.; GARCÍA-RÍO, L. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 123, n. 4, p. 247-260, 2008.

ARIOLE, C. & ABUBAKAR, A. Biodegradation of Atrazine by Bacteria Isolated from Lotic Water. **Journal of Applied Life Sciences International**, v. 2, p. 119 -125, 2015.

ADAPAR - Agência de Defesa Agropecuária do Paraná. **Agrotóxicos - Herbicidas**. 2023. Disponível em: <<<https://www.adapar.pr.gov.br/Pagina/Agrotoxicos-Herbicidas>>>. Acesso em: 14 jul 2023.

ARCHANGELO, E. R.; PRATES, H. T.; FERREIRA, F. A.; KARAM, D.; FERREIRA, L. R.; CARDOSO, A. A. Sorção, dessorção e potencial de lixiviação de atrazina em solos brasileiros. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 4, p.14-27, 2005.

BAGATINI, M. D.; VASCONCELOS, T. G.; LAUGHINGHOUSE HD 4TH, MARTINS, A. F.; TEDESCO, S. B. Biomonitoring hospital effluents by the *Allium cepa* L. **test. Bulletin of environmental contamination and toxicology**. v. 82, n. 5, p. 590, 2009.

BLANCO, F. M. G.; ALMEIDA, S. D. B.; MATALLO, M. B. Herbicide-soil interactions applied to maize crop under Brazilian conditions (Cap. 3). *In*: PRICE, A. J.; KELTON, J. A. (Eds.). **Herbicides - Current research and case studies in use**. Rijeka: Intech, p. 47- 73, 2013.

BERTICELLI, R.; DECESARO, A.; MAGRO, F.; COLLA, L. M. Compostagem como alternativa de biorremediação de áreas contaminadas. **Revista CIATEC – UPF**, v. 8, n. 1, p. 12–28, 2016.

BRAGANÇA, I.; LEMOS, P. C.; BARROS, P.; DELERUE-MATOS, C.; DOMINGUES, V. F. Phytotoxicity of pyrethroid pesticides and its metabolite towards *Cucumis sativus*. **Science of The Total Environment**, v. 619-620, p. 685-691, 2018.

CALDASSO, F. A. **Avaliação da fitotoxicidade de lodo de estação de tratamento de efluentes de indústria de pescado utilizando olerícolas como bioindicadores**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

CAMPANARI, M. F. Z. **Metagenômica da degradação da atrazina em solo sob diferentes manejos agrícolas e floresta semidecidual**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2017.

CHEYNS, K.; MARTIN-LAURENT, F.; BRU, D.; AAMAND, J.; VANHAECKE, L.; DIELS, J.; MERCKX, R.; SMOLDERS, E.; SPRINGAEL, D. Long-term dynamics of the atrazine mineralization potential in surface and subsurface soil in an agricultural field as a response to atrazine applications. **Chemosphere**, v. 86, n. 10, p. 1028-1034, 2012.

COOK, A. M.; HUETTER, R. S-Triazines as nitrogen sources for bacteria, **J. Agric. Food Chem**, v. 29, n. 6, p. 1135–1143, 1981.

COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; DE LIMA, M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 809 - 813, 2008.

COOPER, R. L.; LAWS, S. C.; DAS, P. C.; NAROTSKY, M. G.; GOLDMAN, JEROME, M.; TYREY, L.; STOKER, T. E. Atrazine and Reproductive Function: Mode and Mechanism of Action Studies. **Birth Defects Research**, v. 80, n. 2, pp. 98-112. 2007.

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

DA SILVA, G. F. **Diversidade de fungos em solo contaminado com atrazina: dinâmica da comunidade fúngica em microcosmos**. 2020. 96 fls. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-Graduação Biodiversidade Neotropical, Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Foz do Iguaçu, 2020.

DEON, M. C.; DE ROSSI, A.; MAGRO, C. D.; REINEHR, C. O.; COLLA, L. M. Biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos através de bioaumentação e atenuação natural. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 33, p. 73 - 82, 2012.

DEHGHANI, M.; NASSERI, S.; HASHEMI, H. Study of Bioremediation of Atrazine under variable Carbon and Nitrogen Source by Mixed Bacterial Consortium Isolated from Corn Field Soil in Fars Province of Iran. **Journal of Environmental and Public Health**, v. 4, p. 7- 47. 2013.

DE OLIVEIRA, G. W. **Aspectos do comportamento da atrazina no solo e potenciais efeitos ambientais**. 2015. 72 fls. Trabalho de conclusão de curso (Agronomia) - Universidade Federal da Fronteira Sul, 2015.

DÍEZ, C.; BARRADO, E.; CASTRILLEJO, Y. Soil-dissipation kinetics of neutral (pendimethalin), basic (terbuthryn) and acidic (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicides used on a rain-fed barley crop in Spain (Cap. 8). In: PIOTROWSKI, K. D.

(Ed.). *Herbicides: Properties, Crop Protection and Environmental Hazards*. New York: Nova Science Publishers, p. 245-262. 2011.

DO CARMO, D. A; DO CARMO, A. P. B; PIRES, J. M. B; OLIVEIRA, J. L. M. Comportamento ambiental e toxicidade dos herbicidas atrazina e simazina. **Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 8, n.1, 2013.

DONNELLY, P. K.; ENTRADA, J. A.; Crawford, D. L. Degradation of Atrazine and 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid by Mycorrhizal Fungi at Three Nitrogen Concentrations In Vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 8, pp. 2642-2647, 1993.

DOUGLASS, J.; RADOSEVICH, M; TUOVINEN, O. Microbial attenuation of atrazine in agricultural soils: Biometer assays, bacterial taxonomic diversity, and catabolic genes. **Chemosphere**, v. 176, pp. 352-360. 2017.

EPA (Environmental Protection Agency). Triazine herbicides as atrazine in water by quantitative immunoassay. Washington, DC. 2007.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Avaliação da contaminação do solo. Manual de referência. Roma, Itália, 2000. Disponível em: <<<http://www.fao.org/docrep/005/x2570s/X2570S09>>>. Acesso em: 14 ago. 23.

FABRICE, M. L.; SÉVERINE, P.; STÉPHANIE, H.; ISABELLE, W.; LAURENT, P.; GÉRARD, C.; *et al.* Monitoring of atrazine treatment on soil bacterial, fungal and atrazinedegrading communities by quantitative competitive PCR. **Pest Management Science**, v. 59, n. 3, p. 259–268, 2003.

FERNANDES, A. F. T.; DA SILVA, M. B. P.; MARTINS, V. V.; MIRANDA, C. E. S.; STEHLING, E. G. Isolation and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* from a virgin Brazilian Amazon region with potential to degrade atrazine. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 13974-13978, 2014.

FERNANDES, A. F. T.; BRAZ, V. S.; BAUERMEISTER, A.; PASCHOAL, J. A. R.; LOPES, N. P.; STEHLING, E. G. Degradation of atrazine by *Pseudomonas* sp. and *Achromobacter* sp. isolated from Brazilian agricultural soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 130, pp. 17-22, 2018.

FLECK, N. G.; RIZZARDI, M. A.; NEVES, R.; AGOSTINETTO, D. Ação dos herbicidas atrazina e glufosinate de amônio no aproveitamento de nitrogênio pelas plantas de milho. **Planta Daninha**, v. 19, n. 2, pp. 235-245, 2001.

FUZIWARA, M. T. **Atrazina - aprovações de agrotóxicos no Brasil, seus efeitos ao meio ambiente e para os seres humanos**. 2023. 58 fls. Trabalho de conclusão do curso (Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - Sp. 2023.

GAO, N., ZHANG, J., PAN, Z., ZHAO, X., MA, X., & ZHANG, H. Biodegradation of Atrazine by Mixed Bacteria of *Klebsiella variicola* Strain FH-1 and *Arthrobacter* sp. NJ-

1. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 105, p. 481 - 489. 2020.

GRANDCLÉMENT, C.; SEYSSIECQ, I.; PIRAM, A.; WONG-WAH-CHUNG, P.; VANOT, G.; TILIACOS, N.; ROCHE, N.; DOUMENQ, P. From the conventional biological wastewater treatment to hybrid processes, the evaluation of organic micropollutant removal: a review. **Water Research**, v.111, p.297-317, 2017.

HE, H.; LIU, Y.; YOU, S.; LIU, J.; XIAO, H.; TU, Z. A review on recente treatment technology for herbicide atrazine in contaminated environment. **International Journal of Environmental and Public Health**, v.16, n.5129, p.1-17, 2019.

HÉNAULT-ETHIER, L. Backgrounder: atrazine: banned in Europe, common in Canada. Québec: s.n. 2016.

HUNTER, W. J., SHANER, D. L. Biological Remediation of Groundwater Containing Both Nitrate and Atrazine. **Current Microbiology**, v. 60, n. 01, p. 42 - 46, 2010.

JAMIL, T. S.; GAD-ALLAH, T. A.; IBRAHIM, H. S.; SALEH, T. S. Adsorption and isothermal models of atrazine by zeolite prepared from Egyptian kaolin. **Solid State Sciences**, v. 13, n. 1, p. 198-203, 2011.

JAVARONI, R. C. A.; LANDGRAF, M. D.; RESENDE, M. O. Comportamento dos herbicidas atrazina e alaclor aplicados em solo preparado para o cultivo de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 22, n. 1, pp. 58-64. 1999.

KARAM, D. Efeito residual dos herbicidas aplicados na cultura da soja no milho safrinha em sucessão. *In*: VIII Seminário Nacional de Milho Safrinha, 2007. **Anais [...]** Campinas: Instituto Agrônômico, p. 175-180.

KASOZI, G. N.; NKEDI-KIZZA, P.; LI, Y.; ZIMMERMAN, A. R. Sorption of atrazine and ametryn by carbonatic and non-carbonatic soils of varied origin. **Environmental Pollution**, v. 169, p. 12-19, 2012.

KOOKANA, R. S.; JANIK, L. J.; FOROUZANGO HAR, M.; FORRESTER, S. T. Prediction of Atrazine Sorption Coefficients in Soils Using Mid-Infrared Spectroscopy and Partial Least-Squares Analysis. **Journal of Agric Food Chem**, v. 56, n. 9, pp. 3208-3213, 2008.

KOLIC, N. U.; HRSAK, D.; KOLAR, A.B.; PETRIC, I.; STIPICEVIC, S.; SOULAS, G.; MARTIN-LAURENT, F.; Combined metabolic activity within an atrazine-mineralizing community enriched from agrochemical factory soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 60, p. 299 – 307, 2007.

LAIRD, D. A.; KOSKINEN, W. C. **Triazine soil interactions**. *In*: The Triazine Herbicides 50 years Revolutionizing Agriculture. 1 ed. San Diego: Elsevier, pp. 275 - 299. 2008.

LEBARON, H. M.; MCFARLAND, J. E.; BURNSIDE, O. C. The mode of action of triazine herbicides in plants. *In: The Triazine Herbicides 50 years Revolutionizing Agriculture*. 1 ed. San Diego (CA): Elsevier, 2008. pp. 101-110.

LELES, D. **Avaliação ecotoxicológica de efluente têxtil com corante utilizando sementes de *Lactuca sativa* e *Allium cepa***. 2017. 45 fls. Trabalho de conclusão de curso. (Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2017.

LOSS, R.; NIESSER, R. Analysis of atrazine, terbutylazine and their N-dealkylated choro and hydroxy metabolites by solid-phase, extraction and gas chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis-ultraviolet detection. **J. Chromatogr A** **835** p.217-222, 1999.

MANDELBAUM, R. T.; WACKETT, L. P.; ALLAN, D. L. Mineralization of the s-Triazine Ring of Atrazine by Stable Bacterial Mixed Cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 1695 -1701. 1993.

MANCUSO, M. A.C.; NEGRISOLI, E.; PERIM, L. Efeito residual de herbicidas no solo ("Carryover"). **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.10, p. 151-164, 2011.

MARCHESAN, E. D. **Destino no ambiente e comportamento agrônomo de atrazina em resposta a doses e níveis de palha de espécies de cobertura de solo**. 2011. 110 fls. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2016.

MARECIK, R.; KRÓLICZAK, P.; CZACZYK, K.; BIAŁAS, W.; OLEJNIK, A.; CYPLIK, P. Atrazine degradation by aerobic microorganisms isolated from the rhizosphere of sweet flag (*Acorus calamus* L.). **Biodegradation**, v.19, n.2, p.293 - 301, 2008.

MATIAS, T. P.; BRAGA, J. K.; DAMASCENO, L. H. S.; BRUCHA, G. Aspectos envolvidos na biodegradação da atrazina sob diferentes condições de oxirredução. Research, **Society and Development**, v. 10, n. 8, 2021.

MEROTTO J. R. A.; FISCHER, A. J. **Absorção e translocação de herbicidas nas plantas**. *In: VARGAS, L.; ROMAN, E. S. (Eds.). Manual de manejo e controle de plantas daninhas*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, p. 89-104. 2004.

MONQUERO, P. A.; AMARAL, L. R.; DA SILVA, A. C.; BINHA, D. P.; DA SILVA, P. V. Eficácia de herbicidas em diferentes quantidades de palha de cana-de-açúcar no controle de *ipomoea grandifolia*. **Bragantia**, v. 68, n. 2, pp. 367-372. 2009.

NICODEMO, S. C. T. E S. **Potencial de biodegradação de atrazina por *Bacillus megaterium* cct 7935 e *Penicillium chrysogenum* nrri 807 para biorremediação de solos contaminados**. 2021. 161 fls. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - RENORBIO. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2021.

NGIGI, A. N.; GETENGA, Z. M.; DÖRFLER, U.; BOGA, H. I.; KURIA, B., NDALUT, P.; SCHROLL, R. Effects of carbon amendment on in situ atrazine degradation and total

microbial biomass. **Journal of Environmental Science and Health**, Part B, v. 48, n. 1, p. 40–48. 2013.

PAN, Z.; WU, Y.; ZHAI, Q.; TANG, Y.; LIU, X.; XU, X.; LIANG, S.; ZHANG, H. Immobilization of bacterial mixture of *Klebsiella variicola* FH-1 and *Arthrobacter* sp. NJ-1 enhances the bioremediation of atrazine-polluted soil environments. **Front Microbiol**, v. 14, 2023.

PALMIERI, M. J. ANDRADE-VIEIRA, L.; TRENTA, M.; FARIA ELEUTÉRIO, M.; LUBER, J.; DAVIDE, L.; MARCUSSI, S. Cytogenotoxic effects of Spent Pot Liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*. **Water, Air, Soil Pollut. Amsterdam**, v. 227, n. 5, p. 1-10, 2016.

PEDUTO, T.; JESUS, T. A.; KOHATSU, M. Y. Sensibilidade de diferentes sementes em ensaio de fitotoxicidade. **Revista Brasileira de Ciência, Tecnologia e Inovação**, v. 4, n. 2, 2019.

PEREIRA, P. T. C. Manual de soluções: manual para o preparo de reagentes e soluções, laboratórios de biologia, saúde, enfermagem e medicina. / Paula Tonato Carlos Pereira; Talize Foppa; Andressa Ana Ansiliero. Caçador: SC. EdUniarp, 2020. 159 p.

PEREIRA DE ALBUQUERQUE, F.; DE OLIVEIRA, J. L.; MOSCHINI-CARLOS, V.; FRACETO, L. F. An overview of the potential impacts of atrazine in aquatic environments: Perspectives for tailored solutions based on nanotechnology, **Science of The Total Environment**, v. 700, 2020.

PROSEN, H. Fate and determination of triazine herbicides in soil (Cap. 3), 2012. In: HASANEEN, M. N. A. E. (Ed.). *Herbicides – Properties, Synthesis and Control of Weeds*. Rijeka: Intech, pp. 43-58.

RADOSEVICH, M.; TRAÍNA, S.; HAO, Y.; TUOVINEN, O. Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p. 297 - 302. 1995.

ROCHA, B.S. **Fitotoxicidade do corante laranja reativo 64 como efluente têxtil tratado por oxidação avançada (US/H₂O₂)**. 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, 2017.

ROSA, A. H.; FRACETO, L. F.; MOSCHINI-CARLOS, V. **Meio ambiente e sustentabilidade**. Porto Alegre, RS: Bookman, 2012. 412 pp.

SAGARKAR, S.; MUKHERJEE, S.; NOUSIAINEN, A.; BJÖRKLÖF, K.; PUROHIT, H. J.; JØRGENSEN, K. S.; KAPLEY, A. Monitoring bioremediation of atrazine in soil microcosms using molecular tools. **Environ Pollut**, v. 172, p.108-15. 2013.

SAGARKAR, S.; BHARDWAJ, P.; STORCK, V.; DEVERS-LAMRANI, M.; MARTIN-LAURENT, F.; KAPLEY, A. s-triazine degrading bacterial isolate *Arthrobacter* sp. AK-

YN10, a candidate for bioaugmentation of atrazine contaminated soil. **Appl Microbiol Biotechnol**. V. 100, n. 2, p. 903-13. 2016.

SANDALIO, L. M.; DALURZO, H. C.; GÓMEZ, M.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; DEL RÍO, L. A. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 364, p. 2115 - 2126, 2001.

SANGI, D. P.; MEIRA, Y. G.; MOREIRA, N. M.; LOPES, T. A.; LEITE, M. P.; PEREIRA-FLORES, M. E.; ALVARENGA, E. S. Benzoxazoles as novéis herbicidal agents. **Pest Management Science**, v. 75, n. 1, p. 262-269, 2019.

SCRIBNER, E. A.; BATTAGLIN, W. A.; GOOLSBY, D. A.; THURMAN, E. M. Changes in herbicide concentrations in Midwestern streams in relation to changes in use, 1989–1998. **Science Total Environment**, v. 5, n. 248, p. 255-63, 2000.

SENE, L.; CONVERTI, A.; APARECIDA, G.; SECCHI, RIBEIRO.; SIMÃO, R. DE C. G. New Aspects on Atrazine Biodegradation. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 53, n. 4, p. 487 - 496, 2010.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. In: ROMERO, P. R.; CANTÚ, A. M. (Eds). **Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: la experiencia en México**. 1. ed. México: Instituto Nacional de Ecología, 2008.

SOLOMON, D. R. J.; KUMAR, A.; SANTHI, V. S. Atrazine biodegradation efficiency, metabolite detection, and trzD gene expression by enrichment bacterial cultures from agricultural soil. **Biomedicine and Biotechnology**, v. 14, n. 12, p. 1162 - 1172, 2013.

SINGH, P.; SURI, C. R.; SWARANJIT S. C. Isolation of a member of *Acinetobacter* species involved in atrazine degradation, **Biochem Biophys Res Commun**, v. 317, n.3, p. 697-702, 2004.

SINGH, S.; KUMAR, V.; CHAUHAN, A.; DATTA, S.; WANI, A. B.; SINGH, N.; SINGH, J. Toxicidade, degradação e análise do herbicida atrazina. **Environmental Chemistry Letters**, v. 16, n. 1, p. 211 - 237. 2017.

SUN, Z. B.; ZHANG, J.; SUN, M. H.; LI, S. D. Identification of genes related to chlamydospore formation in *Clonostachys rosea* 67-1. **Microbiologyopen**, v. 8, n. 1, 2019.

TODARO, J.; BIGONHA, J.; BORDUCCHI, D. M. M.; MATOS, L. L.; TRUFELLI, D. C.; SALES, S. M. A.; SHIROMA, M. R. D. V.; GIGLIO, A. Multiple myeloma: five-year experience at a University Hospital. **Einstein**, v. 9, n.2, 2011.

TOMASSONI, F.; SANTOS, R. F.; SANTOS, F. S.; MARINEZ, C.; DA SILVEIRA, L. Técnica de biorremediação do solo. **Acta Iguazu**, v.3, n.3, p. 46-56, 2014.

TOLLER, N. M. **Biodegradação de atrazina estimulada por *Saccharomyces cerevisiae* e palha de milho**. 2019, 78 fls. Dissertação (Mestre em Engenharia Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em

Engenharia Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná- UTFPR, Francisco Beltrão, 2019.

USEPA - **Environmental Protection Agency of Groundwater and Drinking Water Standards and Risk Management Division**. Distribution System Indicators of Drinking Water Quality. Pennsylvania Ave., NW Washington DC. 2006.

VAIL, A. W.; WANG, P.; UEFUJI, H.; SAMAC, D. A.; VANCE, C. P.; WACKETT, L. P.; SADOWSKY, M. J. Biodegradation of atrazine by three transgenic grasses and alfalfa expressing a modified bacterial atrazine chlorohydrolase gene. **Transgenic Research**, v. 24, n. 3, p. 475 - 488. 2014.

VONBERG, D.; HOFMANN, D.; VANDERBORGHT, J.; LELICKENS, A.; KÖPPCHEN, S.; PÜTZ, T.; BURAUDEL, P.; VEREECKEN, H. Atrazine soil core residue analysis from an agricultural field 21 years after its ban. **Journal of Environmental Quality**, v. 43, 2014.

WANG, X.; SUN, C.; GAO, S.; WANG, L.; SHUOKUI, H. Validation of germination rate and root elongation as indicator to assess phytotoxicity with *Cucumis sativus*. **Chemosphere**, v. 44, p. 1711-1721, 2001.

WANG, J. H.; ZHU, L. S.; LIU, A. J.; MA, T. T.; WANG, Q.; XIE, H.; WANG, J.; JIANG, T.; ZHAO, R.S. Isolation and characterization of an *Arthrobacter* sp. strain HB-5 that transforms atrazine. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 33, p. 259-266. 2011.

WANG, Q.; XIE, S. Isolation and characterization of a high-efficiency soil atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. Strain. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 71, p. 61-66, 2012.

WANG, J.; ZHU, L.; WANG, Q.; WANG, J.; XIE, H. Isolation and characterization of atrazine mineralizing *Bacillus subtilis* Strain HB-6. **Plos one**, v.9, n.9, p.1 - 9, 2014.

WINKELMANN, D.A; KLAINE, S.J. Degradation and bound residue formation of atrazine in a Western Tennessee soil. **Environ Toxicol. Chem** v.10 p. 335-345, 1991.

WU, X.; HE, H.; YANG, W. L.; YU, J.; YANG, C. Efficient removal of atrazine from aqueous solutions using magnetic *Saccharomyces cerevisiae* bionanomaterial. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 4, p. 7597-7610, 2018.

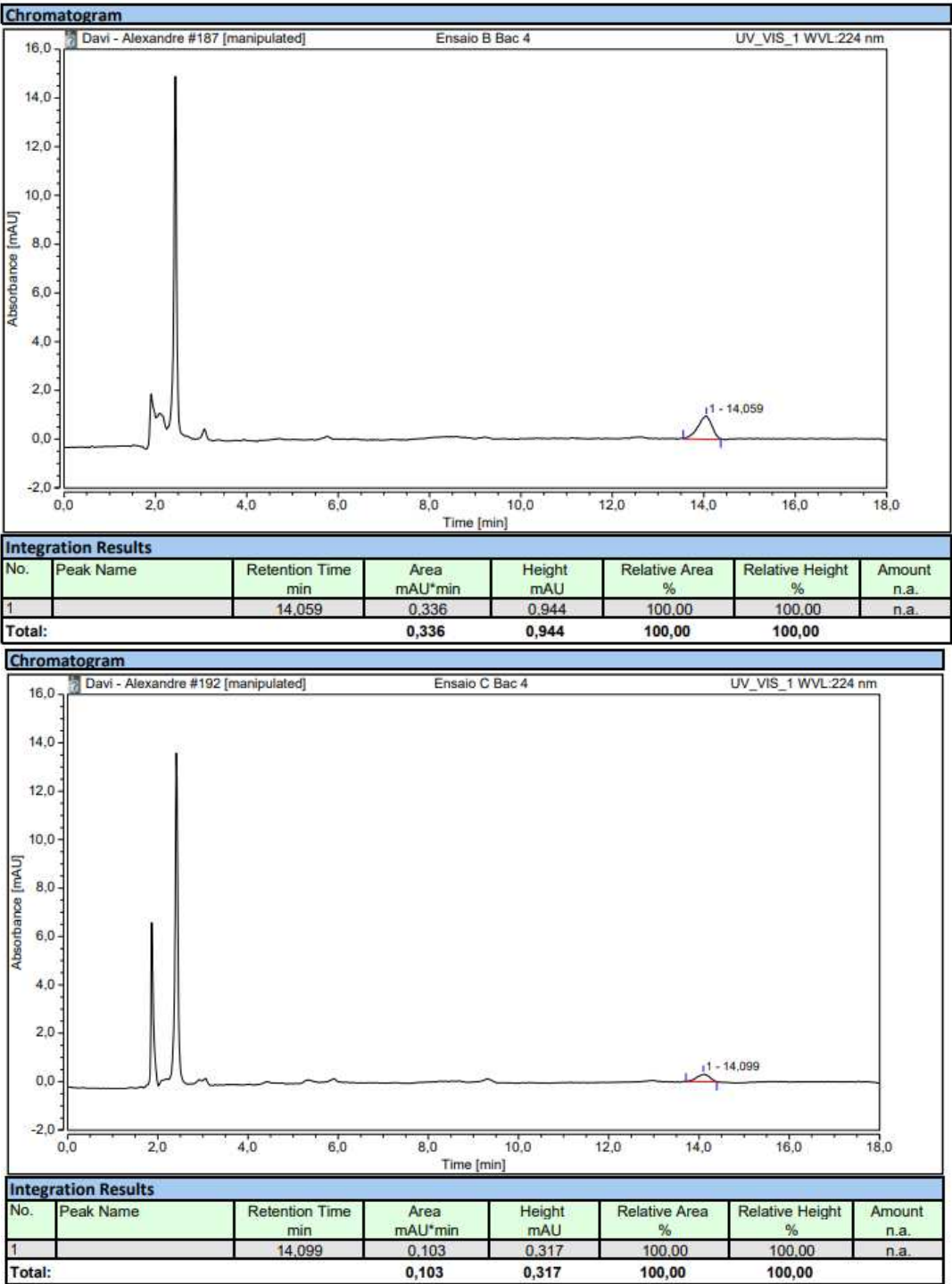
YANG, X., WEI, H.; ZHU, C.; GENG, B. Biodegradation of atrazine by the novel *Citricoccus* sp. strain TT3. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p.144 - 50, 2018.

ZHANG, B.; HAO, LITING.; TIAN, C.; YUAN, S.; FENG, C.; NI, J; BORTHWICK, A. G. L. Microbial reduction and precipitation of vanadium (V) in groundwater by immobilized mixed anaerobic culture. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 410-17, 2015.

ZHANG, J.; SHUANG, L.; XINHONG, W.; ZHONGBIN, L.; PENG, S.; HAO, Z.; FENGJIE, S. Biodegradation of Atrazine by the Novel *Klebsiella variicola* Strain FH-1. **BioMed Research International**, 2019.

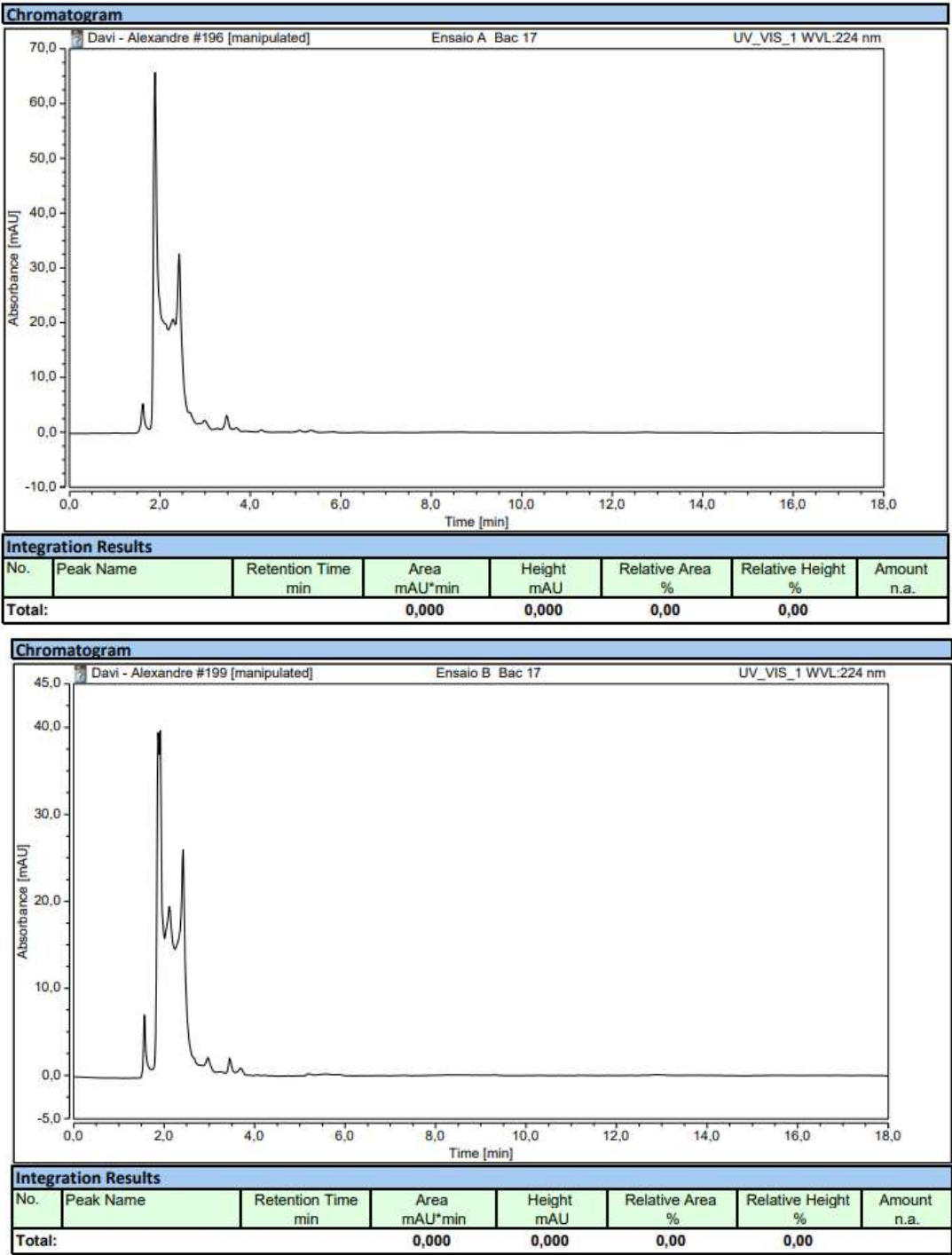
APENDICE A. Resultados da CLAE

Figura 16 - Resultados da CLAE do ensaio 4



Fonte: Autoria própria (2024)

Figura 17- Resultados da CLAE do ensaio 17



Fonte: Autoria própria (2024)