



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA E GESTÃO AMBIENTAL

LILIAN DA SILVA COSTA

**BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS AGRÍCOLAS CONTAMINADOS COM
PESTICIDAS UTILIZANDO FUNGOS BASIDIOMICETOS**

FORTALEZA – CEARÁ

2013



LILIAN DA SILVA COSTA

**BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS AGRÍCOLAS CONTAMINADOS COM
PESTICIDAS UTILIZANDO FUNGOS BASIDIOMICETOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia e Gestão Ambiental do Instituto Federal do Ceará como requisito para obtenção do título de Mestre em Tecnologia e Gestão Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa
Co - orientador Prof. Dr. Rinaldo dos Santos Araújo
Co - orientadora Profa. Dra. Priscila Maria Dellamatrice

FORTALEZA – Ce

2013

Catálogo na fonte : Islânia Fernandes Araújo (CRB 3 – nº 917)

C837b Costa, Lilian da Silva.

Biorremediação de solos agrícolas contaminados com pesticidas utilizando fungos basidiomicetos / Lilian da Silva Costa. - Fortaleza: IFCE, 2013.

82 f.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Gestão Ambiental).

Orientação: Prof. Dr. Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa

1. GESTÃO AMBIENTAL. 2. BIORREMEDIAÇÃO. 3. FUNGOS BASIDIOMICETOS. 4. BIOSURFACTANTE. I. Título.

CDD 363.728

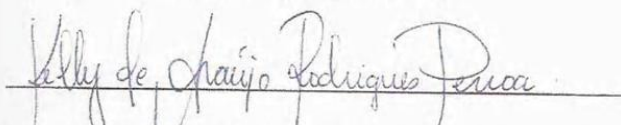
LÍLIAN DA SILVA COSTA

**BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS AGRÍCOLAS CONTAMINADOS COM
PESTICIDAS UTILIZANDO FUNGOS BASIDIOMICETOS**

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Tecnologia e
Gestão Ambiental do Instituto Federal do
Ceará como requisito para a obtenção do
título de Mestre em Tecnologia e Gestão
Ambiental.

Aprovada em 09/08/2013

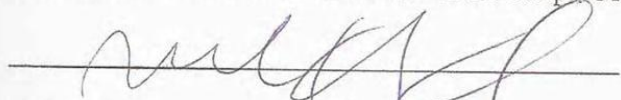
BANCA EXAMINADORA



Presidente Profa. Dra. Kelly de Araújo Rodrigues Pessoa – IFCE Campus Fortaleza



Membro Profa. Dra. Emilia Maria Alves Santos – IFCE Campus Maracanaú



Membro Prof. Dr. Rinaldo dos Santos Araújo – IFCE Campus Fortaleza

*Aos meus amados pais, Raimundo Muniz e Célia Alencar;
aos meus irmãos, Jefferson, Sávio e Livian;
e especialmente a Deus e a Nossa Senhora de Fátima.*

“Pois a terra que embebe a chuva, que cai muitas vezes sobre ela, e produz erva proveitosa para aqueles por quem é lavrada, recebe a bênção da parte de Deus.”

Hebreus 6:7

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fazer acreditar ser possível mesmo quando eu achei que não podia.

A Nossa Senhora de Fátima, por interceder por mim.

A minha mãe, Célia Alencar, pela dedicação e luta para que tivéssemos uma educação de qualidade e por sempre ser um exemplo de honestidade e garra.

Ao meu pai, Raimundo Muniz, pelos momentos de paciência, carinho e amor.

Aos meus irmãos, Jefferson e Sávio pelo apoio, e a minha irmã Livian Costa pela cumplicidade e amizade.

Aos meus sobrinhos, Ielram, por dizer que sou a pessoa mais inteligente que ele conhece, e Ieulânia, pela manifestação em querer fazer “porções”.

A prof. Dra. Priscila Dellamatrice, pela orientação e empenho neste trabalho.

A prof. Dra. Kelly Rodrigues, minha gratidão pela orientação e ajuda na conclusão deste trabalho e pelo exemplo de doação a docência e a pesquisa.

As minhas companheiras de projeto, Milena Viana e Alana Marques, pela realização das coletas, de análises e por ajudarem para a realização deste trabalho.

Ao prof. Dr. Rinaldo Araújo pela disponibilidade ao longo de toda essa jornada.

A prof. Dra. Glória Marinho pelas considerações feitas na qualificação, que serviram para enriquecer este trabalho.

A prof. Dra. Emilia pela participação na banca da defesa.

Ao Marcus Andrade, pela amizade, ensinamento, companheirismo, cumplicidade, risadas, confidências e muitas outras coisas que não caberiam aqui.

A todas as amizades feitas no LATAM, que levarei pra toda a vida e que não me sinto no direito de citar para que ninguém seja esquecido.

A FUNCAP, pela bolsa concedida durante a execução do trabalho.

Ao Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM), onde pude desenvolver minha pesquisa e construir amizades.

RESUMO

O avanço das técnicas agrícolas aliado ao uso de pesticidas, a fim de melhorar a qualidade dos produtos e combater pragas, ocasionam poluição do meio ambiente. Em vista disso, a biorremediação surge como uma opção para minimizar algum tipo de impacto gerado pela agricultura ao solo. Neste trabalho estudou-se a biorremediação de solo utilizando os fungos basidiomicetos *Pleurotus ostreatus* e *Phanerochaete crysosporium*. O solo em estudo está localizado na serra da Ibiapaba-Ce região noroeste do estado do Ceará, a qual se destaca pela produção de hortaliças, com possível contaminação por pesticidas. Foram avaliadas as características físicas e químicas do solo. Também foram realizados testes de toxicidade em diferentes concentrações dos pesticidas encontrados no solo analisado, através do diâmetro fúngico. A degradação de pesticida no solo foi avaliada com e sem adição de biosurfactante, com a finalidade de melhorar sua biodisponibilidade à degradação microbiana. Em outro ensaio, utilizou-se o pesticida encontrado em maior concentração nas amostras coletadas com a finalidade de testar a degradação e a lixiviação deste em coluna de solo, usando biosurfactante. Também foi verificada a produção de enzimas ligninolíticas pelos fungos basidiomicetos e a sua influência na degradação dos pesticidas estudados no trabalho. Os resultados obtidos durante o trabalho mostraram que devido à fertilidade do solo, o mesmo era propício às técnicas de biodegradação e que os pesticidas não causaram efeito tóxico sob o crescimento micelial do fungo *P. crysosporium*, porém *P. ostreatus* sofreu inibição para um dos pesticidas encontrados. O uso de surfactante mostrou-se mais eficiente na degradação de pesticida do solo fazendo com que índices de degradação de 100% fossem alcançados pelos dois fungos em estudo. Quanto à lixiviação do pesticida na coluna do solo, a mesma foi de aproximadamente 41,14%, o que pode significar poluição de outras camadas do solo. Portanto, conclui-se que os fungos basidiomicetos foram capazes de realizar a biodegradação dos pesticidas estudados e o uso de biosurfactante potencializou a degradação desses compostos poluidores do solo.

Palavras chave: Biorremediação, fungos basidiomicetos, pesticidas, solo e biosurfactante.

ABSTRACT

The progress of agricultural techniques together with the use of pesticides to improve product quality and combating pests, cause pollution of the ambiente. Em a result, bioremediation appears as an option to minimize some sort of impact caused by agriculture soil . In this work we studied the bioremediation of soil using the basidiomycete fungi *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete crysosporium*. The soil under study is located in the hills of Ibiapaba - Ce northwestern state of Ceará, which stands for vegetable production, with possible contamination by pesticides. We evaluated the physical and chemical characteristics of the soil. Also toxicity tests were conducted at different concentrations of pesticides found in the soil analyzed by the diameter of fungal growth. Degradation of pesticides in soil was assessed with and without addition of biosurfactant, with the aim of improving its bioavailability to microbial degradation. In another assay, we used the pesticide found in higher concentrations in samples collected for the purpose of testing the degradation and leaching of the soil column using biosurfactant. We also observed the production of ligninolytic enzymes by basidiomycete fungi and their influence on the degradation of pesticides at work studied. The results obtained during labor showed that due to the fertility of the soil, it was conducive to biodegradation and techniques that pesticides caused no toxic effect on the mycelial growth *P.crysosporium* but *P.ostreatus* suffered inhibition for the pesticides found. The use of surfactant was more efficient in the degradation of soil pesticide causing degradation rates of 100% were achieved by both fungi studied. As regards the leaching of the pesticide in the soil column, it was about 41.14 %, which may mean other layers pollution of the soil. Therefore, it is concluded that the basidiomycete fungi are capable of performing the biodegradation study and the use of pesticides biosurfactant enhanced the degradation of these compounds polluting the soil.

Keyworlds: Bioremediation, basidiomycete fungi, pesticides, soil and biosurfactant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular dos contaminantes Clorotalonil (a), Paraquat (b) e Deltametrina (c).....	244
Figura 2 – Destino dos pesticidas aplicados na agricultura.	26
Figura 3 – Fotografia do fungo <i>Pleurotus ostreatus</i>	29
Figura 4 - Estrutura típica de um surfactante.....	32
Figura 5 – Canteiro no Município de Tianguá, Serra da Ibiapaba, Ceará.....	41
Figura 6 – Degradação do herbicida paraquat pelos fungos <i>P. ostreatus</i> e <i>P.chrysosporium</i> com e sem surfactante	53
Figura 7 – Produção da enzima Manganês Peroxidase no solo pelos fungos com e sem surfactante.....	55
Figura 8 - Concentração da degradação do Paraquat na coluna de solo em comparação com a coluna controle.....	57
Figura 9 – Degradação de paraquat no solo com surfactante para concentração de 10, 20 e 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do pesticida.	59
Figura 10 – Contagem de fungo no solo com paraquat e surfactante.	600

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Parâmetros físicos e químicos da deltametrina.	21
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas do Clorotalonil.	22
Tabela 3 - <i>Propriedades físico-químicas do Paraquat.</i>	23
Tabela 4 - Classes de micro-organismos produtores de biosurfactante.	34
Tabela 5 – Composição granulométrica do solo da área de estudo em Tianguá.	47
Tabela 6 – Análise da fertilidade dos solos coletados da área de estudo em Tianguá.	47
Tabela 7 – Diâmetro fúngico (cm) de <i>P.ostreatus</i> em concentrações diferentes de Deltametrina.	50
Tabela 8 – Diâmetro fúngico (cm) de <i>P.ostreatus</i> sem três concentrações do pesticida Paraquat.....	50
Tabela 9 – Diâmetro fúngico (cm) de <i>P.ostreatus</i> nas concentrações do pesticida Clorotalonil no teste de toxicidade em placas	50
Tabela 10 – Diâmetro fúngico (cm) de <i>P.chrysosporium</i> em três concentrações do pesticida Deltametrina no teste de toxicidade em placas.....	51
Tabela 11 – Diâmetro fúngico (cm) de <i>P.chrysosporium</i> em três concentrações do pesticida Paraquat.....	51
Tabela 12 - Diâmetro fúngico (cm) de <i>P.chrysosporium</i> em três concentrações do pesticida clorotalonil.....	51

SUMÁRIO

RESUMO.....	Error! Bookmark not defined.
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Geral	17
2.2 Específicos	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 Agrotóxicos	18
3.1.1 O inseticida deltametrina	21
3.1.2 O fungicida Clorotalonil	22
3.1.3 O herbicida Paraquat	23
3.2 Aspectos físicos, químicos e biológico do Solo	24
3.3 O Uso de Micro-Organismos como Atenuante Ambiental.....	27
3.3.1 <i>Pleurotus ostreatus</i>	29
3.3.2 <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	30
3.4 Biossurfactantes e a Questão Ambiental.....	31
3.5 A Tecnologia de Biorremediação.....	35
3.5.1 Biorremediação <i>in situ</i>	36
3.5.1.1 Biorremediação intrínseca ou natural	37
3.5.1.2 Bioestimulação	37
3.5.1.3 Bioaumentação	38
3.5.2 Uso de fungos basidiomicetos na biorremediação	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Área da pesquisa.....	41
4.2 Caracterização do solo	41
4.3 Cultivo dos micro-organismos empregados e preparo do inóculo	42
4.4 Identificação dos pesticidas presentes no solo	42
4.5 Teste de toxicidade em placas de petri	42
4.6 Avaliação da degradação dos pesticidas no solo pelos fungos <i>P. ostreatus</i> e <i>P. chrysosporium</i> com uso de surfactante.....	43
4.6.1 Atividade Enzimática (AE)	44
4.7 Ensaio de degradação de Paraquat segundo a técnica de lixiviação em coluna de solo	45

4.8 Estudo de degradação de Paraquat na presença de surfactante para diferentes concentrações do pesticida	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 Caracterização do solo	47
5.2 Identificação dos pesticidas presentes no solo contaminado em Tianguá.	48
5.3 Teste de toxicidade em placa de Petri.....	49
5.3.1 Toxicidade para o fungo <i>Pleurotus ostreatus</i>	49
5.3.2 Toxicidade para o fungo <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	51
5.4 Avaliação da degradação dos pesticidas no solo pelos fungos <i>P.ostreatus</i> e <i>P.chrysosporium</i> com uso de surfactante	52
5.4.1 Produção de enzima Manganês Peroxidase no solo	54
5. 5 Ensaios de degradação do Paraquat e lixiviação em coluna de solo	56
5.6 Estudo da degradação do Paraquat na presença de surfactante em diferentes concentrações do pesticida	58
5.6.1 Contagem de fungos do solo com aplicação de Paraquat e surfactante.....	59
6 CONCLUSÕES	62
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	63
8 REFERÊNCIAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

A poluição do solo devido à presença de pesticidas é um problema ambiental grave. As moléculas sintéticas chamadas pesticidas são introduzidas em sistemas agrícolas com o objetivo de proteger as culturas contra plantas daninhas, insetos, fungos e outras pestes (YANG *et al.*, 2007).

O uso extensivo de pesticidas para a agricultura na produção de alimentos para a população tem levado à contaminação da água, solo e ar. Em práticas agrícolas convencionais, pesticidas de diferentes classes são frequentemente aplicados simultaneamente ou um após o outro para proteção das culturas e estes produtos químicos podem interagir um com outro dentro do solo (FLIEBACH *et al.*, 2004).

Extensivos estudos têm sido feitos sobre a mobilidade e destino destes contaminantes e em casos extremos de contaminação, também da remediação destes locais, evitando a migração destes produtos para áreas mais sensíveis como os recursos hídricos.

Em solos agrícolas, com intenso uso de pesticidas, é frequente a aplicação de vários compostos durante um mesmo cultivo resultando na contaminação destes com mais de um produto. A repetição nas aplicações destes produtos leva à acumulação no solo até altos teores, de forma que, após longo período, os pesticidas se tornam ligados ao solo por adsorção e indisponíveis a degradação.

Se o teor de pesticidas nestes solos for acima do tolerável pode ser necessária a biorremediação, processo que envolve a aplicação de micro-organismos ao solo contaminado com poluentes e também de nutrientes para acelerar os processos de degradação do contaminante (CUNNINGHAM *et al.*, 2008), sendo o ideal da biorremediação, pelo menos, reduzir a concentração de poluentes para níveis indetectáveis e não tóxicos dentro dos limites das agências regulatórias (MARIANO *et al.*, 2008).

A adição de matéria orgânica ao solo pode elevar as taxas de degradação devido à estimulação da atividade microbiana quando micro-organismos degradadores estão naturalmente presentes, porém se os produtos estão indisponíveis devido à adsorção não são susceptíveis à ação microbiana. O uso de surfactantes combinado com a adição de matéria orgânica pode ser um método simples e eficiente para a degradação nestes casos (RIZZO *et al.*, 2006)

Os fungos basidiomicetos surgem como alternativa de tratamento por serem capazes de degradar uma ampla faixa de produtos das mais variáveis classes químicas, devido à produção de exoenzimas de largo espectro. Desta maneira, seu uso na biorremediação de solos agrícolas contaminados com altos teores de vários produtos diferentes empregados no cultivo agrícola pode ser uma alternativa para a para controlar a poluição destes locais.

Os fungos da podridão branca estão sendo usualmente aplicados em tratamentos de biorremediação com o objetivo de degradar poluentes ambientais recalcitrantes, ocorrendo de forma natural à diminuição da toxicidade dos poluentes durante o processo de descontaminação, não sendo assim necessária a aplicação de substâncias químicas (SOUSA e ROSADO, 2009).

Durante a biorremediação, a adsorção e ligação do produto ao solo tem sido uma das maiores dificuldades. Os solos tendem a reter fortemente os produtos o que reduz a disponibilidade do produto impedindo a degradação pelos micro-organismos. O uso de surfactantes tem permitido fazer a remoção destes produtos da matriz do solo, devido a suas propriedades emulsificantes, embora nem sempre reduzam a tensão superficial (FREITAS *et al.*, 2009)

A aplicação destes produtos no solo pode ser melhorada através da determinação da frequência e da dose ideal de aplicação, onde o tempo de reação do produto e surfactante pode ser maximizado, obtendo-se assim uma maior eficiência no tratamento.

Dentro deste contexto, o trabalho tem por objetivo fazer a biorremediação de um solo contaminado com vários pesticidas de classes químicas diferentes com longo tempo de contaminação, utilizando os fungos basidiomicetos *Pleurotus ostreatus* e *Phanerochaete chrysosporium*.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o potencial de degradação de pesticidas presentes em solos utilizando os fungos basidiomicetos *Pleurotus ostreatus* e *Phanerochaete chrysosporium*.

2.2 Específicos

- ▶ Avaliar as características físicas e químicas do solo contaminado;
- ▶ Identificar os pesticidas presentes no solo contaminado;
- ▶ Realizar teste de toxicidade em diferentes concentrações dos pesticidas;
- ▶ Avaliar a degradação dos pesticidas no solo pelos fungos *P.ostreatus* e *P.chrysosporium* na presença e ausência de surfactante;
- ▶ Verificar a produção da enzima manganês peroxidase (MnP) pelos fungos na degradação dos pesticidas do solo;
- ▶ Investigar a degradação dos pesticidas do solo em diferentes concentrações na presença de surfactante, pelos fungos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Agrotóxicos

Agrotóxicos, defensivos químicos, pesticidas, praguicidas, remédios de planta e venenos são algumas das inúmeras denominações relacionadas as substâncias químicas utilizadas no controle de pragas (animais e vegetais) e doenças de plantas (FUNDACENTRO, 1998 *apud* RIBAS, 2009).

Grandes quantidades de substâncias químicas sintéticas são liberadas no meio ambiente como resultado do largo uso na agricultura. Cerca de 900 produtos comerciais e 600 ingredientes ativos estão atualmente no mercado (YOUNES e GALAL-GORCHEN, 2000), dos quais cerca de 300 são empregados em 2 mil formulações comerciais diferentes no Brasil (DAMS, 2006), envolvendo inseticidas, fungicidas, herbicidas, raticidas e pesticidas.

Segundo Moreira (2002) compete ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) realizar a avaliação de eficácia agrônômica dos agrotóxicos, ao Ministério da Saúde de executar a avaliação e classificação toxicológica dos mesmos e ao Ministério do Meio Ambiente avaliar e classificar o potencial de periculosidade ambiental das aplicações.

A utilização de pesticidas é quase tão antiga como a agricultura (CASIDA, 1998). A descoberta do querosene, no século XIX, considera-se o marco na história do uso dos pesticidas sintéticos. No início da Segunda Guerra Mundial a seleção de inseticidas limitava-se a diversos compostos como o arsênio, produtos de origem natural como piretrinas, nicotina e o enxofre (ALIFERIS E JABAJI, 2011). Inúmeros pesticidas têm sido desenvolvidos e utilizados em todo o mundo, entre os quais os organoclorados, os organofosforados e os carbamatos são os mais utilizados. Nos países industrializados, em 1960, assistiu-se ao processo de modernização da agricultura devido ao aparecimento de novas tecnologias, muitas delas baseadas na utilização intensiva de pesticidas (MNIF *et al.*, 2011).

O uso de pesticidas na agricultura tem crescido muito nas últimas décadas, principalmente nos países em desenvolvimento. O motivo desse crescimento são as possíveis finalidades de aumento da produtividade e garantia da produção de alimentos para a humanidade. Apesar da quantidade e variedade de produtos usados no campo para esse fim, durante muito tempo não houve preocupação com os problemas ambientais que os mesmos pudessem causar. Embora os pesticidas

possuam um papel benéfico sobre a produtividade agrícola, deve-se considerar o risco potencial desses compostos químicos no ambiente, o que tem despertado o interesse científico para a biodegradação de pesticidas e compostos relacionados (COLLA *et al.*, 2008).

Estudos físico-químicos, toxicológicos e ecotoxicológicos proporcionam a classificação dos agrotóxicos. Um dos critérios usados refere-se à periculosidade ambiental, em classes que variam de I a IV, (Classe I): produtos altamente perigosos ao meio ambiente, (Classe II): produtos muito perigosos ao meio ambiente, (Classe III): produtos perigosos ao meio ambiente e (Classe IV): produtos pouco perigosos ao meio ambiente (RIBAS, 2009).

Os agrotóxicos também podem ser classificados quanto aos efeitos à saúde humana devido à exposição ao produto químico. Essa classificação obedece a testes realizados em laboratório que tentam estabelecer a dosagem letal (DL) do agrotóxico em 50% dos animais utilizados nesta concentração (RIBAS, 2009).

Segundo Silva (2004) os agrotóxicos abrangem um grande número de moléculas químicas, com diferentes modos de ação e toxicidade, sendo divididos em três grandes classes: inseticidas, fungicidas e herbicidas, os quais são organizados em dois grupos principais:

- ▶ Não sistêmicos, que não penetram no tecido vegetal e, conseqüentemente não são transportados dentro do sistema vascular de plantas.
- ▶ Sistêmicos, introduzidos a partir de 1940, penetram na planta e são transportados no sistema vascular delas.

De acordo com Silva (2004), o aumento no uso de agrotóxicos é devido ao:

- ▶ Aumento nas atividades associadas ao uso dos recursos naturais e a necessidade para energia e intensificação da agricultura,
- ▶ A persistência de alguns compostos xenobióticos,
- ▶ Ao acúmulo em organismos biológicos, alcançando níveis tóxicos de contaminação.

Um pesticida ideal deve ser tóxico apenas aos organismos alvos, biodegradável a resíduos indetectáveis e não afetar espécies não alvo (GALIULIN *et al.*, 2001). O uso de produtos químicos como alternativa para melhorar a produção agrícola não deve oferecer nenhum tipo de risco exceto aqueles que causem efeito danoso.

Pesticidas são um dos grupos mais representativos de poluentes no ambiente. Devido ao contínuo uso de pesticidas, quantidades elevadas destes e seus produtos de degradação podem acumular no solo (CHOUDHORY *et al.*, 2008).

Os pesticidas organofosforados apresentam uma alta toxicidade com valores de DL_{50} variando entre 10-50 mg/kg e a sua ação tóxica no organismo se processa pela inibição da enzima colinesterase com consequente acúmulo de acetilcolina nas fibras nervosas, o que impede a transmissão de novos impulsos gerando uma série de efeitos no organismo tais como: convulsões, paradas respiratórias e coma (SILVA *et al.*, 1999).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda como valor máximo permitido em água de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ para cada pesticida e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ para o total de pesticidas (HATRÍK e TEKEL, 1996).

Por outro lado, os pesticidas organoclorados são relativamente inertes e sua elevada estabilidade está relacionada às ligações carbono-cloro. Estes compostos são muito estudados devido à alta toxicidade, baixa biodegradabilidade e bio-solubilidade em tecido lipídico (GALASSI e SANNA, 1996). Alguns organoclorados podem persistir por 15 a 20 anos no solo e parte destes são arrastados pelas chuvas (por lixiviação) para o interior dos cursos de água, que também recebem estes compostos através de efluentes industriais, de esgotos, de sedimentos, da atmosfera e por contaminação direta durante a aplicação (RISSATO *et al.*, 2004).

Com o aumento da utilização de pesticidas tem ocorrido a contaminação de solos e águas. Uma preocupação crescente nas áreas agrícolas com intenso uso de pesticidas é a ocorrência de solos contaminados com altas concentrações de pesticidas (ARTHUR *et al.*, 2000). A toxicidade destes produtos limita a sua degradação natural no ambiente, permanecendo no mesmo por longos períodos.

Sítios contaminados frequentemente contêm numerosos poluentes, os quais podem constituir um risco para a saúde de humanos, animais e o meio ambiente (ROCKNE, 2003). Pesticidas também podem afetar a fertilidade dos solos através da toxicidade à microbiota natural (GALIULIN *et al.*, 2001).

Os pesticidas estudados no trabalho são apresentados a seguir dentro dos parâmetros físicos e químicos.

3.1.1 O inseticida deltametrina

A deltametrina é um inseticida do grupo químico dos piretróides, conhecido quimicamente pelo nome oficial de (S)-alfa-ciano-3-fenóxi-benzil (1R,3R)-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropencarboxilato.

Os pesticidas piretróides são compostos sintéticos fabricados a partir de uma versão sintética de uma classe de inseticidas de origem natural extraídos de uma planta, o piretro. Estes compostos apresentam um mecanismo de ação semelhante ao dos pesticidas organoclorados e apresenta a sua elevada eficácia contra um largo espectro de insetos e são necessárias baixas quantidades para exercerem sua ação é adicionada uma reduzida toxicidade nos mamíferos. (GRISOLIA, 2005) É a classe de pesticidas que apresenta menores efeitos nocivos para o homem, porém estudos revelam ser tóxico a peixes e para o meio ambiente (PIMENTEL, 2007 ; VIRAN, 2003).

O inseticida piretróide tem efeito por contato, ingestão e repelência; apresenta amplo espectro de ação contra insetos e ácaros, é tóxico para abelhas e insetos aquáticos (WATTERSON, 1988; CROFT, 1990).

As propriedades físicas e químicas da deltametrina foram detalhadas por Tomlin (1995) estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros físicos e químicos da deltametrina.

Parâmetros	Valores
Fórmula molecular	$C_{22}H_{19}Br_2NO_3$
Peso molecular	505,2 g.mol ⁻¹
Ponto de fusão	100-102 °C
Coeficiente de partição (K_{OW})	4,6 (25 °C)
Solubilidade em água	< 0,2 µg.L ⁻¹
Pressão de vapor	1,33.10 ⁻⁵ Pa

Fonte: Tomlin (1995).

A deltametrina possui DL₅₀ aguda oral de 135mg.Kg⁻¹ para rato albino e superior a 300mg.Kg⁻¹ para cães; enquanto a DL₅₀ aguda dérmica é superior a 2000 mg.Kg⁻¹ para ratos (TOMLIN, 1995 *apud* FRANCO, 2004). No Brasil é comercializado com vários nomes entre eles: Decis 25 CE, Decis 100 CE, Decis

200SC e Decis 50, estando registrado segundo algumas formulações para uso de em mais de 30 culturas (ANVISA, 2004).

O inseticida deltametrina está entre os produtos frequentemente utilizados por produtores para controlar a lagarta-do-cartucho no milho e foi testado para controle de várias outras pragas do milho via quimigação (VIANA e COSTA, 1998).

3.1.2 O fungicida Clorotalonil

Pesticidas clorados são considerados poluentes potenciais do ambiente devido sua alta taxa de aplicação, sua persistência e sua toxicidade para humanos e outras espécies. O Clorotalonil, de nome químico: 2,4,5,6-tetracloroisofталонitrila (TPN), apresenta persistência considerada baixa em comparação aos outros pesticidas organoclorados (ANDREI, 1999), possuindo como contaminante o subproduto hexaclorobenzeno, o qual tem efeito carcinogênico.

O Clorotalonil é altamente tóxico para peixes e o metabólito principal deste produto é o 4-hidroxi-2,5,6-tricloroisofталонitrila, o qual é mais persistente, móvel e tóxico que o produto principal, podendo inibir a atividade microbiana no solo, impedindo a degradação após repetidas aplicações (VAN DOORN *et al.* 1995).

Outros metabólitos estão ligados à substituição dos átomos de cloro e conversão dos grupos cianetos para amidas, tiazóis e grupos acídicos (ROCHARD *et al.* 1988).

A ANVISA (2010) não determinou um intervalo de segurança para a aplicação do fungicida, o qual apresenta uma ingestão diária aceitável de 0,03 mg.Kg⁻¹. O Clorotalonil possui DL₅₀ maior que 10.000 mg.kg⁻¹ para ratos e é altamente danoso aos olhos (TOMLIN, 1995).

Na Tabela 2 são detalhadas as propriedades físico-químicas do Clorotalonil.

Tabela 2- Propriedades físico-químicas do Clorotalonil.

Parâmetros	Valores
Formula molecular	C ₈ Cl ₁₄ N ₂
Pressão de vapor	0,076 mPA
Coeficiente de partição (Kow)	2,89 (25 °C)
Solubilidade em água	0,9mg.L ⁻¹
Solubilidade em xileno	80 g.L ⁻¹

Solubilidade em querosene

10 g.L⁻¹

Fonte: Tomlin (1995).

No Brasil o Clorotalonil é comercializado com os nomes de Bravonil 500, Daconil BR, Dacostar 500, Vanox 500 SC, entre outros (ANDREI, 1999), estando registrado para uso em 22 culturas, especialmente para hortaliças e fruteiras (AGROFIT, 2002).

3.1.3 O herbicida Paraquat

O Paraquat foi primeiramente sintetizado em 1882, mas sua propriedade como herbicida só foi descoberta em 1959. A partir de 1962, o uso do Paraquat foi difundido por todo o mundo principalmente devido à sua baixa ação residual e a possibilidade de utilização por um grande e diversificado número de culturas (BRASIL, 2000).

O Paraquat é comercializado com o nome de Gramoxe 200 e a nomenclatura conforme a IUPAC é 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto (International Programme on Chemical Safety - PISQ, 2001).

Dados da ANVISA (2007) afirmam que o Paraquat é amplamente utilizado em vários países do mundo nas culturas de abacate, abacaxi, algodão, arroz, aspargos, banana, batata, beterraba, cacau, café, cana-de-açúcar, chá, coco, couve, feijão, maçã, milho, pêra, pêssego, seringueiras, soja, trigo, uva e no controle de plantas classificadas como daninhas do ambiente aquático (BROMILOW, 2003).

De acordo com dados da ANVISA (2007), o limite máximo de resíduo (LMR) para o Paraquat varia de 0,05 a 0,2 mg.Kg⁻¹, com intervalos que variam de 1 a 7 dias. A ingestão diária aceitável (IDA) é de 0,004 mg.Kg⁻¹ e o herbicida está classificado como pertencente a classe 1. As propriedades físico-químicas do Paraquat estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Propriedades físico-químicas do Paraquat.

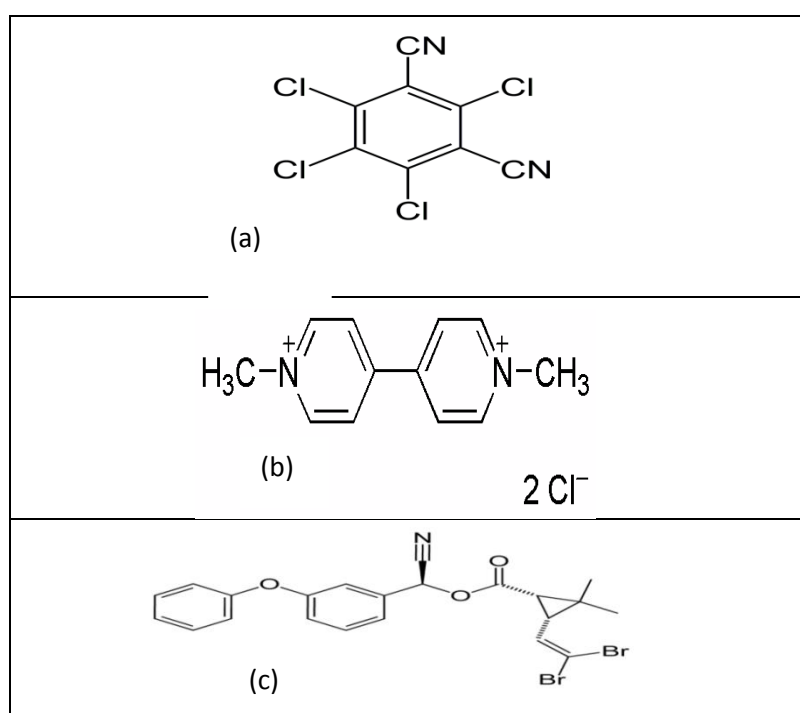
Parametros	Valores
Formula molecular	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₂ N ₂
Densidade	1,240-1,260 g.L ⁻¹ (20 °C)
Ponto de fusão(°C)	~300 com decomposição
Solubilidade em água	700 g.L ⁻¹ (20 °C)

pH	6,5-7,5
Volatilidade	não volátil

Fonte: Tomlin (1995).

Na figura 1 é apresentado a estrutura molecular dos compostos em estudo neste trabalho.

Figura 1 – Estrutura molecular dos contaminantes Clorotalonil (a), Paraquat (b) e Deltametrina (c).



Fonte: ANVISA (2010).

3.2 Aspectos físicos, químicos e biológico do Solo

De acordo com Doran *et al.*, (2005) o solo é um sistema vivo, dinâmico e um recurso não renovável, cuja condição influencia a produção de alimentos, a eficiência ambiental e o balanço global.

O solo é uma mistura de compostos minerais e orgânicos formada pela ação de agentes físicos, químicos e biológicos. No solo, a ação desses agentes, produz faixas horizontais, denominadas de horizontes, os quais lhes conferem características próprias (LUCHESE *et al.*, 2001).

O solo é um sistema composto por três fases, conforme Silva (2004):

- ▶ Líquida, onde as substâncias orgânicas e inorgânicas servem como nutrientes e ou inibidores da microbiota, sendo representado pela solução solo e água;
- ▶ Sólida, sistema composto de minerais, resíduos orgânicos, compostos complexos, polímeros e microbiota;
- ▶ Gasosa, também chamado de ar do solo, estando localizado no espaço poroso, também ocupado pela fase líquida, pois se trata de espaços entre as partículas sólidas do solo, tais espaços porosos são chamados de porosidade e isso é o que difere os solos entre si.

A proporção destas fases varia de um solo para outro e, mesmo, dentro do mesmo solo, de um horizonte para outro (MEURER, 2004).

O uso indevido de técnicas agrícolas, assim como a utilização descontrolada de agrotóxicos, possa a curto ou em longo prazo a alterar as condições químicas, físicas e biológicas dos solos, que são submetidos a condições constantes de estresse. A matriz do solo está constantemente interagindo com outros componentes como água e ar e assim sua poluição pode diretamente propagar contaminantes para as águas superficiais e subterrâneas e também para o ar (CONTE *et al.*, 2005).

Existem diversas formas de estresse, de acordo com Silva (2004), os quais estão relatados a seguir:

- ▶ Físico: relacionados à temperatura, a umidade e a pressão;
- ▶ Químico: relacionado ao pH, aumento ou diminuição da disponibilidade de nutrientes, salinidade e anoxia, podendo ser provocado, por exemplo, por contaminação por metais pesados, agrotóxicos e outros;
- ▶ Biológico: em consequência da competição entre as espécies endógenas ou exógenas, assim como crescimento não identificado de micro-organismos patogênicos.

Geralmente esses fatores ocorrem simultaneamente, sendo que raramente tais condições de estresse acontecem isoladas. Gianello e Giasson (2004) afirmou que desde a antiguidade os povos utilizam o solo para produzir alimentos, pois dependiam dele para garantir a sobrevivência. A classificação dos solos quanto à sua produtividade agrícola já era utilizada há mais de 4000 anos na China.

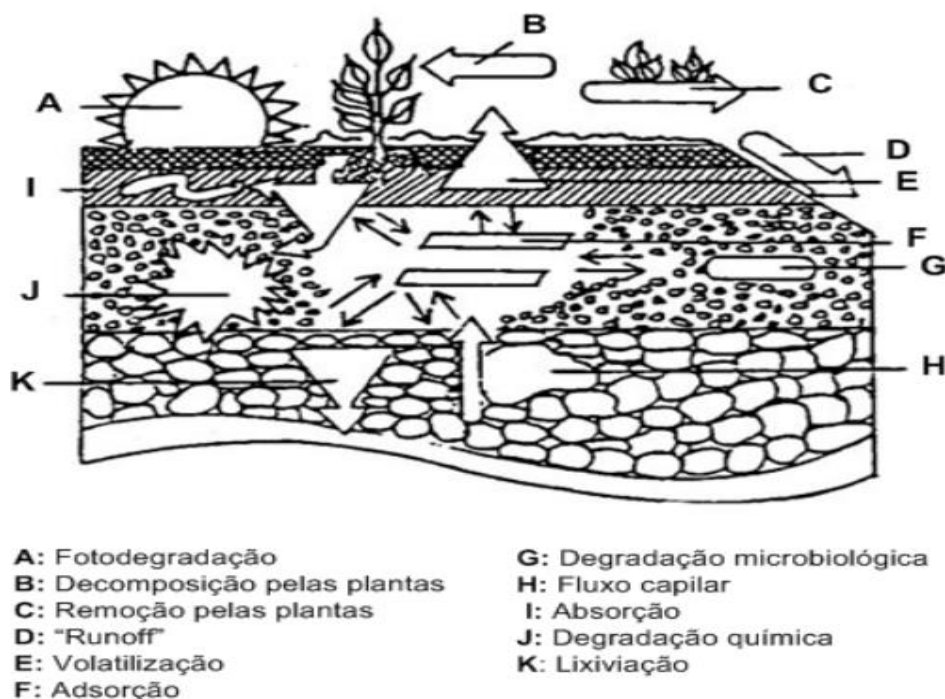
O solo possui pelo menos 16 elementos minerais considerados essenciais para o crescimento das culturas. O carbono, o oxigênio e o hidrogênio, combinados

na reação fotossintética, são obtidos do ar e da água. Nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre são necessários em maiores quantidades e são denominados de macronutrientes. Nutrientes requeridos em pequenas quantidades como o boro, o cobre, o cloro, o ferro, o manganês, o molibdênio e o zinco são chamados de micronutrientes (GIANELLO e GIASSEN, 2004).

Algumas características e propriedades do solo são determinadas ou afetadas pela presença de matéria orgânica. A existência de matéria orgânica humificada no solo demonstra a ação de agentes biológicos. Os organismos que habitam no solo, as associações entre eles, suas relações com o meio e as transformações bioquímicas decorrentes de sua atividade são de grande relevância para a produtividade agrícola, à reciclagem de nutriente e a qualidade ambiental (GIANELLO e GIASSEN, 2004).

O solo é o destino final dos produtos químicos utilizados na agricultura, os quais podem ser aplicados diretamente no mesmo ou na parte aérea das plantas. Ao entrarem em contato com o solo, os pesticidas ficam sujeitos a processos físico-químicos que regulam seu destino na ambiente, sendo alguns exemplos desses processos: retenção, lixiviação, volatilização, fotodegradação, decomposição química e biológica, escoamento superficial e adsorção pelas plantas (OLIVEIRA E BRIGUENTI, 2011). Tais processos podem ser observados na Figura 2.

Figura 2 – Destino dos pesticidas aplicados na agricultura.



Fonte: Oliveira e Briguenti (2011).

A retenção é um fenômeno complexo, por meio dos processos de adsorção e dessorção, influencia direta ou indiretamente na magnitude dos efeitos de outros fatores. A complexidade desse processo deve-se primariamente a heterogeneidade físico-química dos solos e suas inter-relações com os sistemas biológicos, atmosféricos e aquáticos. Portanto, um requisito básico para entender os processos de retenção é o conhecimento da composição do solo. (OLIVEIRA E BRIGUENTI, 2011)

3.3 O Uso de Micro-Organismos como Atenuante Ambiental

Os micro-organismos têm faixa limitada de tolerância para determinadas condições ambientais e condições ótimas para desenvolvimento. Enquanto que contaminantes são mais resistentes a condições adversas, o que caracteriza a persistência do produto no meio, a persistência do composto químico no ambiente depende das propriedades químicas do produto e de sua concentração (KULKARNI e CHAUDHARI, 2007).

O sucesso da degradação está relacionado à diferentes fatores: disponibilidade de nutrientes, umidade, pH e temperatura. Também podem afetar as condições abióticas e a predação por protozoários (CUNNINGHAM *et al.*, 2008).

Os fungos têm sido bastante utilizados como atenuantes ambientais por serem os principais agentes de degradação de matéria orgânica, sendo responsáveis pela ciclagem de nutrientes e são encontrados em praticamente todos os ambientes no planeta (SILVA e COELHO, 2009 *apud* ANDRADE *et al.*, 2010; PEREIRA, 2011).

Estima-se que atualmente existam em torno de 1,5 milhões de espécies de fungos, sendo de conhecimento dos micologistas somente cerca de 69.000 espécies, as quais são capazes de utilizar vários substratos como fonte de carbono. Porém, alguns fungos necessitam de substratos específicos (SILVA e COELHO, 2009 *apud* ANDRADE, 2010).

O tratamento biológico neste caso tem por base a inoculação de micro-organismos (bactérias e/ou fungos basidiomicetos) que atuam sobre o substrato, degradando preferencialmente a lignina, sem provocar perdas na celulose e hemicelulose. Estes processos apresentam segurança do ponto de vista ambiental,

principalmente por não utilizarem substâncias químicas durante o processo (SCHMIDT; WESCHSLER; NASCIMENTO, 2003).

Os fungos degradam o material lignocelulósico penetrando as hifas no lúmen das células vegetais. As hifas realizam a produção de uma grande diversidade de metabolitos extracelulares, que atuam ativamente na degradação da parede celular (FERRAZ, 2004, 2011).

Na visão ecológica, os basidiomicetos possuem papel fundamental na ciclagem de nutrientes e manutenção dos ecossistemas, atuando na degradação da matéria orgânica. Os basidiomicetos são sapróbios, parasitas e formam ectomicorrizas que são associações de fungos com as plantas (FERRAZ, 2004).

Os fungos da podridão branca estão sendo usualmente aplicados em tratamentos de biorremediação com o objetivo de degradar poluentes ambientais recalcitrantes, ocorrendo de forma natural à diminuição da toxicidade dos poluentes durante o processo de descontaminação, não sendo assim necessária a aplicação de substâncias químicas (SOUSA e ROSADO, 2009).

Segundo Silva (2009), vem sendo bastante estudada a aplicação dos fungos basidiomicetos para biodegradação de substâncias químicas recalcitrantes. Os fungos filamentosos possuem uma série de características que os tornam interessantes para aplicação em sistemas de biorremediação. Eles são capazes de crescer sob as condições de estresse ambiental que limitam o crescimento bacteriano. E ainda, o modo de crescimento dos fungos – induzido quimiostaticamente, através do alongamento e ramificação das hifas, em direção à fonte de carbono orgânico – permite a colonização de grandes áreas. Desta forma, o contato superficial com o contaminante é amplo, aumentando sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, podendo ter sua biodegradação aumentada.

Os fungos basidiomicetos são capazes de degradar compostos recalcitrantes através de enzimas extracelulares, como a manganês peroxidase. Já em fungos que utilizam o complexo enzimático intracelular para a remoção, a degradação não é tão eficiente (PEREIRA, 2011).

A enzima manganês peroxidase é uma enzima produzida pelos fungos basidiomicetos. O ciclo enzimático ocorre quando o ferro presente na enzima reage com peróxido, sendo formado um complexo ferro-peróxido, a ação enzimática ocorre pelo sistema de oxirredução difuso. Portanto, o ataque da enzima é inespecífico, atacando qualquer tipo de poluente orgânico (GUIMARÃES, 2009).

Segundo Matheus e OKINO (2002), podem-se enumerar algumas vantagens do uso de basidiomicetos na biorremediação de solos contaminados com compostos recalcitrantes:

- ▶ O sistema responsável pela degradação é extracelular podendo atuar em substratos insolúveis ou complexados ao solo, pouco acessíveis a ação bacteriana;
- ▶ A inespecificidade do sistema enzimático destes fungos permitem a degradação de uma ampla faixa de compostos separadamente ou misturados;
- ▶ Esses fungos possuem vantagem competitiva quando materiais lignocelulolíticos são utilizados como fonte de carbono;
- ▶ São capazes de promover a degradação completas de compostos recalcitrantes.

3.3.1 *Pleurotus ostreatus*

De acordo com Bettin (2010), o gênero *Pleurotus* é pertencente ao filo *Basidiomycota* e da classe *Basidiomycetes*, ordem *Aphylllophorales*, possuindo características específicas como o basidiocarpo pileado, com sua estipe lateral ou central com consistência carnosa. Seu corpo de frutificação possui hastes concêntricas que estão em formato de conchas de ostra e lamelas unidas, como pode ser observado na Figura 3.

Figura 3 – Fotografia do fungo *Pleurotus ostreatus*.



Fonte: Micoplant (2013).

O *Pleurotus* é usado para varias finalidades, como as medicinais e terapêuticas, sendo seu cogumelo com elevado valor nutricional. Há aplicações ainda em biotecnologia e na área ambiental que apontam que o *Pleurotus* é um fungo bem sucedido neste quesito, com bons resultados na colonização e degradação de resíduos em geral, especialmente os lignocelulósicos (BETTIN, 2010).

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* apresentam grande potencial de cultivo no Brasil em razão de sua maior rusticidade e por ser um eficiente decompositor de resíduos agrícolas e agroindustriais como: esterco, palhas e outros resíduos do trigo, do arroz, do milho, do algodão, do bagaço de cana-de-açúcar, resíduos de serrarias, dentre outros (EIRA, 2004).

Entre os resíduos de potencialidade no Nordeste para produção de cogumelos, destaca-se a casca do coco. Após o consumo *in natura* ou industrializado da água de coco, o resíduo (casca do coco) é muitas vezes depositado em lixões e às margens de estradas e rios, o que gera um problema ambiental (ROSA, 2001).

O fungo *Pleurotus ostreatus* é lignocelulítico e responsável pela reciclagem do carbono nos ecossistemas. É capaz de degradar celulose, hemicelulose e lignina. O interesse em estudar esse micro-organismo se dá pela possível utilização de enzimas lignolíticas úteis para aplicações biotecnológicas. Segundo estudos, esses fungos são capazes de promover tanto a biosorção quanto a degradação do contaminante (RODRIGUES, 2003).

Os fungos deste gênero são conhecidos por serem eficientes na degradação de lignina, pois produzem enzimas extracelulares como a lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacases (fenol oxidases) que podem modificar e degradar a lignina (RODRIGUES, 2003).

3.3.2 *Phanerochaete chrysosporium*

Este fungo tem a capacidade de mineralizar, além da lignina, pelo menos parcialmente e, em alguns casos completamente, uma variedade de outros poluentes resistentes à degradação. O sistema lignolítico deste fungo é representado principalmente pelas enzimas lignina e manganês peroxidase, as quais são produzidas em meios contendo fontes limitadas de carbono e nitrogênio. Estas

enzimas têm a capacidade de despolimerizar a lignina e uma grande variedade de outros compostos (KUNZ, 2002).

O *Phanerochaete chrysosporium* é o basidiomiceto mais utilizado em processos de biorremediação. Suas exo-enzimas têm demonstrado possuir um grande potencial para detoxificação de vários xenobióticos, incluindo os herbicidas diuron e bentazon (COELHO, 2009).

Com o conhecimento do mecanismo sobre o sistema enzimático lignolítico dos basidiomicetos, intensificou-se a proposta de utilização desses micro-organismos na degradação de poluentes ambientais. A maioria das descobertas sobre o mecanismo envolvido na degradação de xenobióticos foi feita com o basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium*, que apresentou evidências de possuir capacidade de mineralizar DDT, TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-*p*-dioxina), benzo(α)pireno, lindano (1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano), bifenilaspolicloradas (PCBs), além de degradar clorofenóis (REDDY e GOLD 1998, REDDY e GOLD, 2000; POINTING *et al.*, 2001; SHIM e KAWAMOTO, 2002; KRISHNA, 2005; TORTELLA *et al.*, 2005).

O *Phanerochaete chrysosporium*, em condições adequadas de crescimento pode ser eficiente para o uso em biorremediação em solos contaminados com compostos recalcitrantes. Esse fungo foi avaliado em laboratório e depois aplicado em escala de campo (6000 m³ de solo contaminado), tendo demonstrado capacidade em remover mais de 80% de clorofenóis em solo, embora tenha sido relatado que, para isto, foi necessário adequar as condições de crescimento do fungo para grandes quantidades de solo contaminado (SILVA, 2009).

3.4 Biossurfactantes e a Questão Ambiental

Os biossurfactantes são agentes ativos de superfície que reduzem a energia livre do sistema por substituir a maior parte das moléculas de alta energia na interface diminuindo, assim, a tensão superficial e interfacial dos líquidos, que agem como emulsificantes (BUENO, SILVA e GARCIA-CRUZ, 2010).

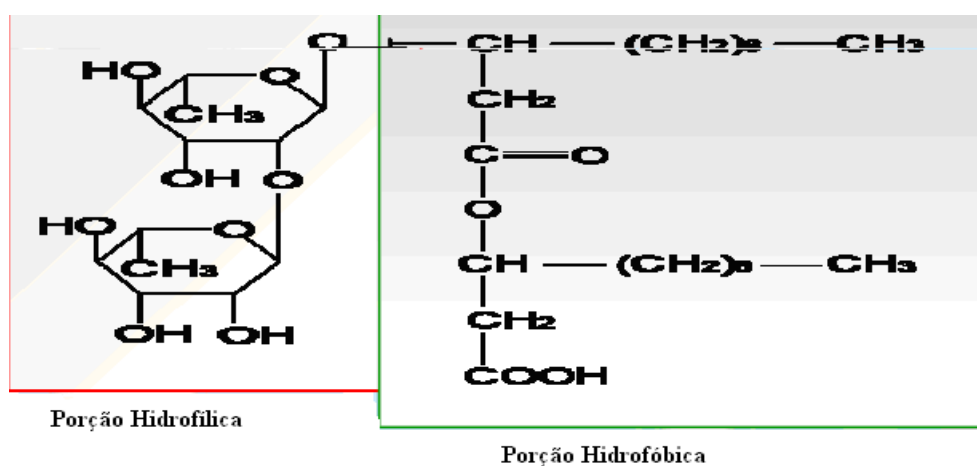
O surfactante é uma molécula anfipática, apresentando uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica, com capacidade de diminuir a tensão superficial. A redução da tensão superficial ocorre devido à característica anfipática (porção polar+apolar) da molécula capaz de reduzir a energia livre do sistema pela transferência de moléculas de alta energia do interior de uma solução para a

interface. A principal característica dos surfactantes é a capacidade de reduzir a tensão superficial de um meio líquido (MULLIGAN, 2005). Na Figura 4 é mostrada a estrutura típica de um surfactante com as suas porções, hidrofílica e hidrofobia.

A porção apolar dos surfactantes é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica (NITSCHKE, 2002).

A porção apolar dos surfactantes é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica (NITSCHKE, 2002).

Figura 4- Estrutura típica de um surfactante.



Fonte: MAKKAR e CAMEOTRA (1998).

Existem no mercado surfactantes sintéticos que são de custo elevado. Como solução a isso se destaca os biossurfactantes, pois estes devido à origem microbiana são uma alternativa para substituir parcialmente ou totalmente o uso dos compostos sintéticos de forma economicamente viável. Entre as vantagens que elevam o potencial comercial dos biossurfactantes destacam-se a baixa toxicidade, a biodegradabilidade, a seletividade e a atividade específica em temperaturas extremas, pH e salinidade (MULLIGAN, 2005).

A maioria dos surfactantes disponíveis no mercado é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o crescimento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente levaram à procura por surfactantes natural como alternativa aos produtos existentes.

Biossurfactantes são compostos estruturalmente diversos produzidos por micro-organismos (JAYASHRRE *et al.*, 2006), principalmente bactérias e leveduras, e em geral, são biodegradáveis, não tóxicos ou menos tóxicos que surfactantes químicos.

Alguns compostos poluentes são de difícil degradação devido à indisponibilidade deles aos micro-organismos. A forte sorção pode ocorrer quando contaminantes são adsorvidos a matéria orgânica ou adsorvidos em poros microscópicos no interior das partículas de solo, também inacessíveis aos micro-organismos do solo (NWACHUKWEE e OSUJR, 2007).

Surfactantes podem aumentar a concentração de um pesticida na solução do solo através de processos de emulsificação e solubilização. A solubilização é a incorporação do pesticida dentro das micelas surfactantes, o que causa a redução da tensão superficial e é o principal processo envolvido no aumento da disponibilidade (JAYASHRRE *et al.*, 2006).

A concentração ótima de surfactante deve ser estabelecida antes da biorremediação e depende da natureza do contaminante e tipo de solo, do grau de hidrofobicidade do pesticida, do tipo de surfactante e da concentração deste (IGLESIAS-JIMENEZ *et al.*, 1996). Perdas devido à sorção no solo também devem ser consideradas, principalmente em solos com altos teores de matéria orgânica (LAHA *et al.*, 2009).

Como alternativa econômica para parcialmente ou totalmente substituir o uso dos surfactantes sintéticos, sendo assim, economicamente viável é que surgem os biosurfactantes, pois são de origem microbiana. Entre as vantagens que elevam o potencial comercial entre duas biomoléculas destacam-se baixa toxicidade, biodegradabilidade, seletividade, atividade específica em temperaturas extremas, pH e salinidade (MULLIGAN, 2005).

As principais substâncias produzidas, segundo Maier e Saberón (2000) e Lang (2002), são: glicolípidios, lipoproteínas e poliméricos. Os glicolipídios são os mais estudados e possuem um grupamento carboidrato ligado a uma ou mais cadeias longas de ácidos graxos. O ramnolipídio, surfactante (biotensoativo) que é produzido pela *Pseudomonasa eruginosas* no final da fase logarítmica, assim como na fase estacionária, é produzido a partir de grande variedade de fontes de carbono, desde glicose a uso de substratos alternativos como borra oleosa, óleos usados, melaço de cana, resíduos do processamento de queijo, batata e mandioca, os quais

são alguns exemplos de resíduos e subprodutos com potencialidade para produção de biotensoativos (ABALOS *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2006; HABA *et al.*, 2000;.

As lipoproteínas são caracterizadas por possuírem uma parte proteína e outra de ácido graxo e as substâncias poliméricas de alto peso molecular apresentam cadeias longas de carboidratos ou de proteínas, podendo ter uma fração lipídica (MAIER e SABERÓN, 2000; LANG, 2002).

Desai e Banat (1997) e Banat (2000) classificaram os surfactantes de acordo com seu micro-organismo produtor, conforme detalhado na Tabela 4.

Tabela- 4 Classes de micro-organismos produtores de biosurfactante.

Biotensoativo	Micro-organismo
Lipopeptídios e Lipoproteínas	
Peptidolipídio	<i>Bacillus lincheformis</i>
Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>
Ácidos graxos e fosfolipídios	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
Emulsan	<i>Anthrobacter calcoaceticus</i>
Manana lipídio proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Liposan	<i>Candidali polytica</i>

Fonte: DESAI *et al.*,(1997) e BANAT (2000)

A biorremediação de hidrocarbonetos é a principal forma de utilização de biosurfactantes devido à sua propriedade de estabilização. No entanto, para o tratamento de metais pesados, Camargo (2004) afirmou que os surfactantes

disponibilizam os compostos a serem degradados, pois a maioria desses compostos está adsorvida na matriz coloidal do solo.

3.5 A Tecnologia de Biorremediação

A biorremediação é o uso de organismos vivos para tratamento de ambientes contaminados com a finalidade de reduzir a concentração dos poluentes a níveis não detectáveis, não tóxicos ou aceitáveis, isto é, dentro dos limites estabelecidos pelas agências de controle ambiental (LITCHFIELD, 2005).

É um método efetivo e de baixo custo para degradação de compostos tóxicos em produtos inócuos. Sucesso na remoção de pesticidas tem sido relatado para muitos compostos (YOUNES e GALAL-GORCHEN, 2000). Após a mineralização do poluente, metabólitos são liberados no ambiente, geralmente com toxicidade menor que o composto parental, como CO₂, água e compostos inorgânicos que surgem como produtos da degradação (MARIANO *et al.*, 2008).

Os compostos ao serem oxidados, prioritariamente por micro-organismos, perdem elétrons para umceptor final, sendo então reduzidos. O oxigênio geralmente é usado como oceptor final de elétrons o que caracteriza oxidação de compostos orgânicos com a redução do oxigênio molecular. Na ausência de oxigênio os micro-organismos utilizam outros compostos orgânicos ou inorgânicos como aceptores finais de elétrons assinalando, assim, a respiração anaeróbia. A desnitrificação, redução do ferro, redução do sulfato ou condições metanogênicas caracterizam a biodegradação anaeróbia (CORDAZZO, 2000).

Embora vários poluentes possam ser degradados pelos micro-organismos alguns compostos são mais facilmente degradados que outros. A velocidade de metabolização desses compostos vai depender de fatores como, a concentração do contaminante e da quantidade de espécies catalisadoras, como as enzimas extracelulares geradas pelos micro-organismos. Nesse contexto, a quantidade de catalisador presente, é representada pelo número de micro-organismos hábeis em metabolizar o contaminante, bem como a quantidade de enzimas produzidas por cada célula. Então, qualquer fator que afeta a concentração do contaminante, o número de micro-organismos presentes ou a quantidade de enzimas específicas, pode aumentar ou diminuir a velocidade da biodegradação do contaminante (ANDRADE *et al.*, 2010).

Segundo Younes e Galal-Gorchen (2000), o processo de biorremediação pode ser dividido em três fases. Primeiro, por atenuação natural (biorremediação intrínseca ou natural), onde os contaminantes são reduzidos por micro-organismos nativos sem adição de inóculo. O segundo método, bioestimulação, é empregado onde nutrientes e oxigênio são aplicados ao sistema para melhorar a eficiência e acelerar o processo. Finalmente, no processo de bioaumentação, micro-organismos exógenos com habilidade para a degradação são adicionados aos solos que não contém microbiota nativa capaz de transformar os xenobióticos presentes.

A biorremediação, a bioestimulação e a bioaumentação têm como objetivo principal a ruptura de moléculas complexas, resultando em produtos de mais fácil degradação, gerando menor quantidade de impactos no ecossistema (MARIANO, 2006). Os três processos mencionados utilizam a capacidade metabólica dos micro-organismos para utilizar moléculas complexas como fonte de energia para o seu crescimento (KULKARNI e CHAUDHARI, 2007).

Durante a degradação a atividade microbiana pode ser monitorada. Parâmetros microbiológicos no solo podem dar informações importantes sobre a presença de micro-organismos viáveis para degradação e também efeitos danosos dos poluentes aos micro-organismos (VAN BEELEN e DOELMAN, 1997). Os parâmetros mais utilizados envolvem as determinações de: respiração do solo, biomassa microbiana, atividade enzimática e contagem de micro-organismos.

O princípio de todos os processos de biorremediação é propiciar um aumento na biodegradação e provocar um estímulo da atividade microbiana degradadora por diferentes mecanismos (MOLINA BARAHONA *et al.*, 2004).

3.5.1 Biorremediação *in situ*

No tratamento *in situ*, os micro-organismos são aplicados no próprio local onde ocorreu a perturbação ambiental. Os produtos finais de uma biorremediação eficaz são água e gás carbônico, que não apresentam toxicidade, por isso podem ser devolvidos ao ambiente sem prejuízo aos organismos vivos. A biorremediação *in situ* tem a vantagem de causar mínima alteração ao ambiente e possui baixo custo (CUNNINGHAM *et al.*, 2008; CORDAZZO, 2000).

3.5.1.1 Biorremediação intrínseca ou natural

Na biorremediação natural, a degradação do poluente orgânico presente no solo ocorre sem adequação de qualquer condição ambiental, sendo a desestruturação do poluente realizada pelos micro-organismos nativos do local, devido à adaptação natural destes à presença do contaminante (PERELO, 2010). Os micro-organismos passam, então, a utilizar o composto orgânico poluente como fonte de carbono, ocasionando assim redução da sua concentração ao longo do tempo. Nesse sistema não só os processos biológicos estão envolvidos, mas também, processos físicos e químicos podem ser responsáveis pela redução da concentração do poluente (BEZERRA, 2009).

O monitoramento da biorremediação intrínseca é feito pelo acompanhamento da evolução temporal e espacial da concentração de indicadores geoquímicos como, oxigênio dissolvido e temperatura em águas subterrâneas, por exemplo. Resultados desse monitoramento podem ser usados para identificar fatores que podem controlar a taxa de biodegradação bem como identificar o processo microbiológico de respiração aeróbia ou anaeróbia (MARIANO, 2008).

3.5.1.2 Bioestimulação

O processo de bioestimulação necessita que no local contaminado exista uma população natural de micro-organismos capazes de biodegradar os contaminantes presentes e que as condições ambientais sejam favoráveis para que se obtenha uma atividade microbiológica compatível com a biodegradação. Medidas das propriedades físicas e químicas de amostras do local de estudo podem revelar as limitações físico-químicas para a atividade microbiológica, a qual pode então ser modelada para indicar os fatores críticos limitantes (RAMASWAMI e LUTHY, 1997).

A bioestimulação de populações de micro-organismos autóctones com o objetivo de aumentar as taxas de biodegradação é frequentemente empregada em projetos de biorremediação (MARIANO, 2006).

Tecnicamente, o processo de bioestimulação consiste em introduzir nutrientes adicionais na forma de fertilizantes orgânicos e/ou inorgânicos na área contaminada, incentivando o crescimento de micro-organismos capazes de degradar os poluentes existentes no meio (MILLER, 2010) e, com isso, promover o aumento da população microbiana e conseqüentemente, uma degradação mais rápida do contaminante (KANISSERY e SIMS, 2011).

Os micro-organismos se nutrem dos múltiplos compostos orgânicos para o desenvolvimento de seus metabolismos de manutenção e reprodução culminando na remoção do contaminante (ALVAREZ e ILLMAN, 2006; MARIANO *et al.*, 2008).

3.5.1.3 Bioaugmentação

A bioaugmentação é um processo de biorremediação que utiliza micro-organismos alóctones. Esse processo é necessário quando um local contaminado não possui condições favoráveis para que biodegradação ocorra. Assim, essa técnica tem como objetivo acelerar ou estimular a biodegradação através da intensificação do crescimento microbiano tanto quanto pela otimização do ambiente em questão (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

A bioaugmentação é definida como uma implementação de micro-organismos ao sistema natural, com capacidade para degradar um poluente específico (MACÊDO, 2010), ou ainda a adição de consórcio de micro-organismos enriquecidos no local contaminado (BENTO *et al.*, 2004).

Neste sistema inoculam-se micro-organismos com potencial de degradação elevado do contaminante, sendo o tratamento também auxiliado por processos típicos naturais (JACQUES *et al.*, 2007).

A bioaugmentação é mais apropriada para tratamentos de contaminantes muito recalcitrantes em contaminações recentes e/ou onde se pretende aplicar a degradação acelerada (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

De acordo com Siqueira *et al.*, (1994), a bioaugmentação pode ocorrer de três maneiras: a) estimulação da população existente através de alterações no ambiente ou aplicação de nutrientes; b) isolamento e seleção de micro-organismos competentes e posterior aplicação ao solo e c) uso de micro-organismos clonados pela engenharia genética, os denominados MEG (micro-organismos da engenharia genética).

3.5.2 Uso de fungos basidiomicetos na biorremediação

A maioria dos estudos de biorremediação utilizava bactérias devido à facilidade que ofereciam para estudar suas vias metabólicas e utilizar construções genéticas que permitam degradar especificadamente determinados compostos contaminantes. Porém quando ocorrem condições de estresse ambiental, como, baixos teores de nutrientes, baixos valores de pH, elevadas concentrações dos

contaminantes. Além disso, as bactérias têm baixa eficiência na degradação de compostos solúveis em água, ou ligados ao solo, e seu sistema enzimático pode ser induzido somente na presença do contaminante. Sendo assim, níveis ainda indesejáveis do contaminante podem ser insuficientes para induzir a produção ou atividade das enzimas, diminuindo o processo de biodegradação (Moreno *et al.*, 2004).

Aust (1990) e Eerd *et al.*, (2003) listaram algumas vantagens em utilizar fungos basidiomicetos para os processos de biorremediação:

- ▶ Os fungos estão em contato direto com o solo, líquido ou porções de vapor do solo;
- ▶ São capazes de transformar um grande número de compostos com estruturas dissimilares;
- ▶ São capazes de diminuir o efeito tóxico de muitos xenobióticos;
- ▶ Libera metabólitos que podem ser degradados por outros microrganismos;
- ▶ O sistema enzimático sendo extracelular pode atuar em substratos insolúveis ou complexados aos solos e, portanto, pouco acessíveis à ação bacteriana;
- ▶ O sistema sendo inespecífico pode ser usado para uma ampla variedade de poluentes orgânicos ou mesmo para a mistura deles;
- ▶ O sistema, sendo produzido em resposta a condições de limitação de nutrientes, não necessita ser induzido pela exposição prévia ou pela presença de lignina ou do composto poluente;
- ▶ Este grupo de fungos possui vantagens competitivas quando materiais ligninocelulósicos são utilizados como fonte de carbono;
- ▶ A degradação da lignina ocorre até que sua concentração seja reduzida a níveis não detectáveis, onde o produto final é CO₂. Este é o tipo de processo desejável para os xenobióticos.

Em face das vantagens elencadas, são relatadas pesquisas em que ocorreu grande êxito na mineralização de poluentes no solo, como no trabalho realizado por Fragoeiro (2008) que utilizou os fungos basidiomicetos *Trametes versicolor* e *Phanerochaete chrysosporium* para biorremediação de solos contaminados pelos

pesticidas Simazina, Trifluralina e Dieldrina e obteve taxas de remoção que chegaram a 100%.

Ramadevi *et al.*, (2012), em estudo da degradação do pesticida organofosforado Malation no solo pelo fungo *Aspergillus niger*, sua concentração inicial era de 20 ppm após o tratamento houve degradação de 90,07 % , observaram que este fungo foi bastante eficaz na degradação deste produto devido à ação das enzimas lignolíticas, podendo, portanto ser usado na biorremediação O mesmo na pesquisa feita por Nyakundi *et al.*, (2012) que isolou 5 fungos da podridão branca e avaliou a degradação do Metomil e Diazinon em meio de cultura usando os fungos isolados e em consorcio, analisaram durante 100 dias fazendo acompanhamento da degradação a cada 10 dias. Perceberam que a degradação em quando usada em consorcio (58 dias) foi melhor que quando foi usado o fungo separadamente (100 dias).

Essas pesquisas sugerem que o emprego de fungos, incluindo os da podridão branca, pode ser considerado uma alternativa viável, a natureza, a toxicidade e estabilidade dos sistemas uma vez que estes fungos apresentam potencial para mineralizar pesticidas de diferentes classes. Mostrando que esses micro-organismos podem ser usados na biorremediação de solos, melhorando assim as condições ambientais de solos contaminados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área da pesquisa

O local onde foram realizadas as coletas está situado no município de Tianguá, na serra da Ibiapaba, região noroeste do estado do Ceará. A área estudada é cultivada com hortaliças e produtores locais utilizam pesticida, que provavelmente pode estar ocasionando a contaminação do solo.

A região da Serra da Ibiapaba no Ceará, a mais importante do estado quanto à produção de hortaliças, apresenta clima tropical quente sub-úmido, com estação chuvosa concentrada nos meses de fevereiro a maio, temperaturas mínimas em torno de 15°C e máximas de 32°C (MESQUITA *et al.*, 2011). Na Figura 5 está representado a área de onde eram realizadas as coletas das amostras de solo.

Figura 5 – Canteiro no Município de Tianguá, Serra da Ibiapaba, Ceará.



Fonte: Autor (2013).

4.2 Caracterização do solo

Para caracterização do solo a amostra coletada na área da pesquisa foi submetida a análises de granulometria e de fertilidade no Laboratório de Solos do Departamento de Ciências do Solo da Universidade Federal do Ceará – UFC, segundo procedimentos descritos no Manual de Análise de Solos da Embrapa (EMBRAPA, 1997).

A análise de granulometria envolveu a determinação dos diferentes extratos que compõem o solo em relação às suas dimensões. Para a avaliação do grau de fertilidade foram realizadas as determinações de fósforo, potássio, cálcio, magnésio, alumínio, sódio e pH.

4.3 Cultivo dos micro-organismos empregados e preparo do inóculo

Nesta etapa foram empregados os fungos basidiomicetos *Pleurotus ostreatus* e *Phanerochaete chrysosporium* que foram submetidos a crescimento sobre o grão de trigo (50g) e hidratados em uma solução de carbonato de cálcio e sulfato de cálcio, na razão mássica de 1:4, contendo 1% de água, sendo que esta mistura foi esterilizada em autoclave durante 20 minutos a temperatura de 121 °C.

Para a etapa do trabalho que foi utilizado o inóculo crescido sobre o bagaço de caju, primeiramente foi feito a inoculação do fungo no meio de cultura (malte) e, após o crescimento fúngico ocorreu a inoculação dos fungos sobre o bagaço de caju.

As culturas foram submetidas ao crescimento em placas de Petri com meio sólido malte-agar (2% de malte e 0,2% de extrato de levedura) e incubadas a 28°C durante 8 dias. A quantidade de inóculo utilizada foi de 5 g, contendo os fungos e o meio de cultura usado para o crescimento dos mesmos nas placas.

4.4 Identificação dos pesticidas presentes no solo

Primeiramente foi feita a extração dos pesticidas presentes no solo, com base na metodologia multi-resíduo descrita por Tadeo *et al.*, (2010). Assim, 5 g de solo foram colocadas em Erlenmeyers, adicionando-se ainda 10 mL do solvente acetato de etila. O sistema passou por sonificação durante 30 minutos, sendo o extrato posteriormente filtrado em algodão e então adicionado sulfato de sódio anidro para retirada da umidade.

As amostras foram injetadas em cromatógrafo a gás Perkin Elmer, com temperatura do injetor de 250°C, da coluna inicialmente em 100°C por 1 min e rampa de 23,5°C/min até 280°C por 12 minutos e temperatura no detector de 320°C. Utilizou-se N₂ como gás de arraste a 13,6 psi.

4.5 Teste de toxicidade em placas de petri

Avaliou-se o crescimento fúngico de *P. ostreatus* e *P. chrysosporium* em duas concentrações diferentes dos pesticidas encontrados, de 10 e 25 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, considerado os princípios ativos dos produtos comerciais empregados, a saber: Gramoxone (200 $\text{g}.\text{L}^{-1}$ de paraquat), Decis (25 $\text{g}.\text{L}^{-1}$ de deltametrina) e Bravonil (500 $\text{g}.\text{L}^{-1}$ de clorotalonil).

Os estudos foram feitos usando placas de Petri em meio de cultura com a seguinte composição: 6,0 g de NaNO_3 , 1,52 g de KH_2PO_4 , 0,52 g de $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$, 0,52 g de KCl, 0,01 g de FeSO_4 , 0,01 g de ZnCl_2 , 10 g de glicose, 15 g de ágar e 1000 mL de água destilada (PONTERCORVO *et al.*, 1953). O meio de cultura foi esterilizado em autoclave na temperatura de 120 °C.

O crescimento dos fungos foi avaliado pela medição do diâmetro do crescimento micelial ao longo de 1, 3, 5, 7 e 9 dias de desenvolvimento.

4.6 Avaliação da degradação dos pesticidas no solo pelos fungos *P. ostreatus* e *P. chrysosporium* com uso de surfactante

A amostra do solo contaminado (1 kg) da área agrícola em estudo foi trazida para o Laboratório de Tecnologia Ambiental (LATAM) a fim de verificar a ação dos fungos *P. Ostreatus* e *P. Chrysosporium* durante o processo de biorremediação, sendo a degradação dos pesticidas avaliada na presença e na ausência de surfactante, em um período de 42 dias.

O surfactante utilizado foi produzido microbiologicamente a partir da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, conforme Robert *et al.* (1989) e Nitsche *et al.* (2010), a fim de obter biossurfactante de potencial elevado em processo de biorremediação, pois a referida espécie possui capacidade de produzir rhamnolipídeos em meio de cultura, os quais têm propriedades que diminuem a tensão superficial do meio em que se encontram, favorecendo a emulsificação (SANTA ANNA *et al.*, 2007, GUO-LANG *et al.*, 2005, WEI *et al.*, 2005, CHA *et al.*, 2007).

Desta forma, *Pseudomonas aeruginosa* foi incubada em meio Luria-Bertani (LB) contendo 1% de óleo de babaçu, durante 48 h, sob agitação orbital de 150 rpm. Após este procedimento, promoveu-se centrifugação do meio produzido a 3500 rpm durante 7 minutos para obtenção apenas do biossurfactante (ROBERT *et al.*, 1989; NITSCHKE *et al.*, 2010).

A degradação foi realizada para amostras de 100 g de solo, as quais foram colocadas em frascos de 500 mL e a umidade acertada para capacidade de campo,

que é a quantidade máxima de retenção de água pelo solo sem causar danos ao sistema.

A capacidade de campo das amostras de solo estudadas foi determinada para posterior ajuste da umidade do solo nos estudos de degradação. Para isto, um Becher de 250 mL foi preenchido com solo (10g) e 2 mL de água ou solução surfactante, sendo os mesmos gotejados lentamente durante 40 segundos até a formação de um aglomerado (torrão) úmido. Este aglomerado foi cuidadosamente removido e colocado para secar a 100°C em estufa durante 24 h. A partir de cálculos gravimétricos simples foi estimada a umidade correspondente a 100 g de solo.

Nos tratamentos realizados em presença do biossurfactante a própria solução surfactante foi utilizada para acerto da umidade no solo.

Para esta etapa do trabalho foi utilizado o inóculo já preparado e crescido sobre bagaço de caju, conforme o item 4.3, sendo empregado cerca de 5 g (micélio e bagaço de caju). No decorrer de 7, 14, 28 e 42 dias analisou-se a degradação através da quantificação da concentração dos pesticidas conforme descrito no item 4.4 e avaliação da atividade enzimática.

4.6.1 Atividade Enzimática (AE)

Para a análise da enzima manganês peroxidase (MnP) no solo realizou-se a extração, misturando-se 10 g de solo com 30 mL de acetato de sódio (50 mM) em erlenmeyer que foi submetido a agitação eletrônica em Vortex. Em seguida a amostra foi centrifugada durante 7 minutos a 3500 rpm e o sobrenadante separado e utilizado para análise.

A atividade da enzima manganês peroxidase (MnP) foi determinada pela oxidação de vermelho de fenol, de acordo com Kuwahara *et al.* (1984). A mistura reacional (1,0 mL) foi constituída por 0,6 mL de sobrenadante contendo a enzima MnP; 0,1 mL de lactato de sódio (0,25M); 0,2 mL de albumina bovina (0,5%); 0,05 mL de $MnSO_4$ (2,0 mM); 0,05 mL de uma solução de H_2O_2 em tampão succinato de sódio 0,2 M (pH 4,5) e 0,1 mL do indicador da reação, vermelho de fenol (0,1%). A mistura foi incubada durante 10 minutos e a reação interrompida pela adição de 0,04 mL de NaOH (2,0 N), sendo a leitura em absorbância realizada no comprimento de onda de 610 nm.

A concentração de enzima foi determinada a partir da diferença de absorbância, conforme descrito a seguir (Equação1):

$$UI/L = \frac{\Delta_{abs.}}{\varepsilon \times R \times t} \times 10^6 \quad [Equação 1]$$

Sendo, Δ_{abs} é a variação da absorbância, ε é o coeficiente de absorção molar ($\varepsilon_{610nm} = 44600 \text{ L/M. cm}$), R é a quantidade de solução da amostra e t é o tempo de reação em minutos. UI/L é a unidade internacional, que significa $\mu\text{mol/min}$.

4.7 Ensaio de degradação de Paraquat segundo a técnica de lixiviação em coluna de solo

Amostras de solo da área contaminada com Paraquat foram confinadas em tubos de PVC de modo a constituírem colunas com 50 cm de comprimento e 12 cm de largura. Foi aplicado 1L de biosurfactante na parte superior da coluna e, posteriormente, coletado o lixiviado resultante. A concentração de pesticida no solo da coluna foi determinada aos 14º e 28º dias, sendo analisadas amostras do topo (superfície), parte medial e da base da coluna. Foi montada ainda uma coluna controle com as mesmas dimensões acima mencionadas, porém sem receber adição do surfactante, sendo que a determinação da concentração do pesticida nesta coluna realizada apenas no 28º dia.

A degradação do Paraquat foi determinada a partir da sua concentração no biosurfactante que foi lixiviado e no solo da coluna (conforme 4.4) via cromatografia gasosa. Para a determinação da concentração do pesticida no lixiviado foi feito inicialmente sua extração que ocorreu da seguinte forma, foram transferidos 25 mL do líquido lixiviado para um funil de separação, onde foram adicionados 25 mL do solvente (acetato de etila). Após tempo de contato de 20 minutos ocorreu a separação de fases com a retirada do solvente, sendo a amostra submetida ao filtro de algodão e, em seguida, adicionado sulfato de sódio anidro para retirada da umidade e, por fim, concentrado a 10 mL de solução por evaporação em rotoevaporador.

As condições de injeção das amostras no cromatógrafo gasoso para leitura da concentração dos pesticidas foram às mesmas descritas no item 4.4.

Os resultados para este ensaio são comparados ao da coluna controle onde foi adicionado apenas água destilada, sendo detectada a concentração de Paraquat ao longo da coluna (topo, meio e base).

4.8 Estudo de degradação de Paraquat na presença de surfactante para diferentes concentrações do pesticida

Em frascos de vidro foram transferidos 100g de solo e diferentes doses de paraquat foram aplicadas, correspondentes as concentrações de: 10, 20 e 40 ug/g, individualmente. A umidade do solo foi acertada para 70%, de acordo com a norma da CETESB L6.350 (CETESB, 1990) e conforme descrito no item 4.7.1 usou-se solução biossurfactante (volume total de 14 mL de líquido metabólico) para esta adição. O acompanhamento analítico foi realizado para leituras aos 7, 14 e 19 dias da degradação via cromatografia gasosa. Adicionalmente também se realizou contagem manual dos micro-organismos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do solo

O solo estudado coletado no município de Tianguá na Serra da Ibiapaba foi classificado como areia quartzosa distrófica. As análises de granulometria e fertilidade resultaram nos dados apresentados nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 – Composição granulométrica do solo da área de estudo em Tianguá.

COMPOSIÇÃO GRANULOMÉTRICA (g . kg ⁻¹)					
Amostra	Areia grossa	Areia fina	Silte	Argila	Argila natural
Valor	597	259	92	52	19

Fonte: Autor (2013).

Tabela 6 – Análise da fertilidade dos solos coletados da área de estudo em Tianguá.

PARÂMETROS	SOLO
Fósforo	138 mg/dm ³
Potássio	230 mg/dm ³
Cálcio + Magnésio	3,4 cmol/dm ³
Cálcio	2,2 cmol/dm ³
Magnésio	1,2 cmol/dm ³
Alumínio	0,1 cmol/dm ³
Sódio	11 mg/dm ³
pH	5,4

Fonte: Autor (2013)

O solo apresentou alto teor de potássio, fósforo, cálcio e magnésio mostrando boa fertilidade o que favoreceu o crescimento de micro-organismos e o processo de degradação, conforme Alvarez *et al.* (1999).

Os teores de K, P, Ca e Mg são necessários para a nutrição dos micro-organismo pois estes se nutrem dos múltiplos compostos orgânicos e inorgânicos para o desenvolvimento de seu metabolismo de manutenção e reprodução culminando na remoção do contaminante (ALVAREZ E ILLMAN, 2006; MARIANO *et al.*, 2008).

Na biorremediação por bioestimulação a adição de compostos como os citados acima se torna necessário a fim de gerar condições favoráveis ao desenvolvimento microbiológico, o que não foi necessário para este trabalho devido ao solo já conter esses compostos que aumentam o crescimento da população microbiana e criam condições ótimas para o máximo de degradação possível. (MOREIRA E SIQUEIRA, 2002; BENTO *et al.*, 2004).

5.2 Identificação dos pesticidas presentes no solo contaminado em Tianguá

Dos pesticidas identificados, o que apresentou maior concentração foi o herbicida Paraquat ($7,76 \mu\text{g.g}^{-1}\text{solo}$). O fungicida Clorotalonil foi encontrado na concentração de $2 \mu\text{g.g}^{-1}\text{solo}$ e a Deltametrina, na de $0,31 \mu\text{g.g}^{-1}\text{solo}$.

Goel *et al.* (2005) afirmaram que a meia vida de compostos no solo é aumentada devido à presença de outros compostos e a frequência das doses de aplicação dos pesticidas no solo.

Porém, sabe-se que dentre os pesticidas encontrados, o Paraquat é o que apresenta maior tempo de persistência no solo, tendo sua meia-vida aumentada devido à adsorção às partículas deste (VIDAL e NUNES, 2010), o que justificou o fato deste pesticida com maior concentração em relação as demais moléculas estudadas.

Em relação ao Clorotalonil, o mesmo tem meia vida intermediária que é de aproximadamente 90 dias e a Deltametrina tem meia vida minimizada no solo devido à sua menor persistência e também pela maior solubilidade em água (FILHO *et al.*, 2010), podendo ser mais facilmente lavado do solo onde é aplicado e levado para outras áreas e camadas mais profundas do solo.

Silva *et al* (2010) em estudo sobre a degradação do Sulfato de Endossulfam e Diuron encontraram concentração desses pesticidas de 1 a $4 \mu\text{g.kg}^{-1}\text{solo}^{-1}$ e de 3 a $10 \mu\text{g.kg}^{-1}\text{solo}^{-1}$, respectivamente, em até 83 cm da camada de solo, atribuindo isso a solubilidade em água e temperatura como fatores determinantes a persistência desses compostos.

Em trabalho realizado por Pinheiro (2011) foi avaliado os pesticidas (alacolor, atrazina, diurom azoxistrobina, metalaxil, metconazol, tebuconazol e lambda-cialotrina) no perfil de solo nas profundidades de 0 a 100 cm observou que

os pesticidas alcançaram profundidade de 80 a 100 cm, podendo representar potencial de contaminação das águas subterrâneas.

Wu *et al.* (2002) encontraram os fungicidas: metalaxil e clorotalonil, em maior quantidade na camada de aproximadamente 10 cm atribuindo-se, a isto, o alto teor de carbono orgânico e o revolvimento do solo da superfície, relacionando isso com a adsorção a região da superfície, tempo de aplicação e sua persistência no solo.

5.3 Teste de toxicidade em placa de Petri

5.3.1 Toxicidade para o fungo *Pleurotus ostreatus*

Sabe-se que certos poluentes podem alterar o crescimento dos fungos, muitas vezes devido à toxicidade destes compostos (MOREIRA-NETO, 2006).

Porém, ao final do período dos testes, observou-se que nas concentrações testadas de 10 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dos pesticidas Deltametrina e Paraquat não houve efeito tóxico sobre o fungo *Pleurotus ostreatus*, não se tendo observado grande redução no diâmetro micelial, nas concentrações estudadas, em comparação com as placas nas quais os fungos cresceram sem a presença do pesticida.

Particularmente, em relação ao Paraquat, nos últimos dias em que o crescimento nas placas foi monitorado, observou-se diâmetro micelial superior na presença do pesticida em comparação com o branco, caracterizado pela ausência do pesticida, mostrando que o Paraquat não inibiu o *P. ostreatus* e que possivelmente foi empregado como fonte de carbono pelo fungo que se adaptou a referido poluente.

A adaptação dos micro-organismos aos poluentes pode ocorrer, sendo que a mesma pode ser reversível, o que depende do micro-organismo envolvido, do tempo de exposição e da aplicação de doses gradualmente maiores ao longo do tempo (SINGH, 2006).

Nas Tabelas 7 e 8 são apresentadas as medidas do crescimento micelial do fungo *Pleurotus ostreatus* na presença da Deltametrina e do Paraquat, respectivamente.

Tabela 7 – Diâmetro fúngico (cm) de *P.ostreatus* em concentrações diferentes de Deltametrina.

Dia	Branco	10 µg.mL⁻¹	25 µg.mL⁻¹
1	2,7	2,1	2,6
3	3,2	2,5	2,7
5	3	2,7	3
7	2,8	2,7	3
9	8,5	8,5	8

Fonte: Autor (2013).

Tabela 8 – Diâmetro fúngico (cm) de *P.ostreatus* sem três concentrações do pesticida Paraquat.

Dia	Branco	10 µg.mL⁻¹	25 µg.mL⁻¹
1	2,3	1,8	2
3	2,7	2,8	2,9
5	3,8	4,8	4,7
7	4,1	6,45	5,65
9	7	7,5	7,1

Fonte: Autor (2013).

Somente para o pesticida Clorotalonil foi verificado efeito tóxico sobre o fungo nas concentrações citadas (Tabela 9), mesmo na concentração mais baixa empregada (10 µg.mL⁻¹). O efeito inibitório foi maior a 25 µg.mL⁻¹ em todos os dias analisados, ainda que não tenha causado morte dos micro-organismos para nenhuma das concentrações, apresentou somente um efeito inibitório.

Tabela 9 – Diâmetro fúngico (cm) de *P.ostreatus* nas concentrações do pesticida Clorotalonil no teste de toxicidade em placas

Dia	Branco	10 µg.mL⁻¹	25 µg.mL⁻¹
1	2,6	1,1	0,9
3	3,15	1,35	1,05
5	4	1,65	1,25
7	4,1	2,4	1,7
9	7,6	2,85	2,05

Fonte: Autor (2013).

Contudo, é importante ressaltar que, possivelmente, poderia se alcançar a diminuição da inibição do Clorotalonil pela exposição gradual e contínua a fim de alcançar adaptação microbiana ao composto, do modo que o efeito inibitório seria temporário (Singh, 2006).

5.3.2 Toxicidade para o fungo *Phanerochaete chrysosporium*

De acordo com o teste de toxicidade para o fungo *Phanerochaete chrysosporium* o mesmo não apresenta crescimento inibido por nenhum dos pesticidas testados.

Nas Tabelas 10 e 11 são mostrados os valores para o diâmetro das colônias de *P.chrysosporium* nas placas de Petri na ausência e presença de Detametrina e Paraquat.

Verificou-se que o crescimento das colônias de *P. chrysosporium* ocorre no intervalo de tempo menor que para *P. Ostreatus*, nas concentrações estudadas, o que levou a concluir que os pesticidas não causaram efeito inibitório a este fungo.

Tabela 10 – Diâmetro fúngico (cm) de *P.chrysosporium* em três concentrações do pesticida Deltametrina no teste de toxicidade em placas.

Dia	Branco	10 µg.mL ⁻¹	25 µg.mL ⁻¹
3	5	4,75	4
5	8,5	8	8,5

Fonte: Autor (2013).

Tabela 11 – Diâmetro fúngico (cm) de *P.chrysosporium* em três concentrações do pesticida Paraquat.

Dia	Branco	10 µg.mL ⁻¹	25 µg.mL ⁻¹
3	5	5	5
5	8,5	9	9

Fonte: Autor (2013).

Tabela 12 - Diâmetro fúngico (cm) de *P.chrysosporium* em três concentrações do pesticida Clorotalonil

Dia	Branco	10 µg.mL ⁻¹	25 µg.mL ⁻¹
-----	--------	------------------------	------------------------

3	5	5	4,5
5	8,5	8	8

Fonte: Autor (2013).

Leontievsky *et al.* (2002), D'Annibale *et al.*, (2005) e Machado *et al.*, (2005) afirmaram que os fungos basidiomicetos possuem capacidade em tolerar altas concentrações de poluentes orgânicos, endossando o fato de que, nesta pesquisa, *P. chrysosporium*, não ter apresentado inibição na presença dos pesticidas, nas concentrações estudadas.

Semelhantemente, Ekundayou (2003) estudou o efeito do Paraquat sobre microbiota nativa de solo contaminado, tendo sido o referido pesticida aplicado no solo na concentração de 1,3 g.100 g.solo⁻¹. A avaliação do efeito do composto foi analisada pelo número de unidades formadoras de colônias em meio Agar. Para amostra de solo analisada o Paraquat não apresentou efeito tóxico aos fungos nativos, assim como neste trabalho.

O estudo de taxas de crescimento de fungos é muito importante para avaliar a capacidade de colonização dos micro-organismos, uma vez que proporciona boa indicação da velocidade com a qual o fungo é capaz de colonizar um meio, quando submetido a condições de contaminação ambiental (NYAKUNDI *et al.*, 2012).

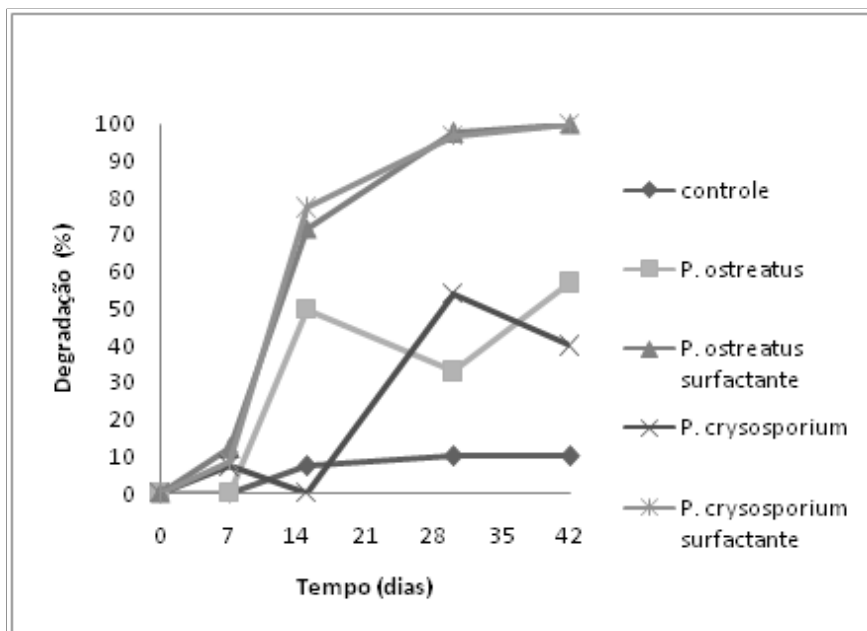
As espécies de rápido crescimento têm uma vantagem sobre as espécies mais lentas devido à competição pelo alimento (NYAKUNDI *et al.*, 2012). Portanto, melhor crescimento garante o sucesso na prática de biorremediação, como ocorreu neste trabalho com o fungo *P.chrysosporium* que teve melhor taxa de crescimento sem sofrer inibição a exposição aos pesticidas.

5.4 Avaliação da degradação dos pesticidas no solo pelos fungos *P.ostreatus* e *P.chrysosporium* com uso de surfactante

Ao final dos 42 dias de incubação, ocorre degradação completa do pesticida Paraquat pelos fungos *P.ostreatus* e *P.chrysosporium* quando da aplicação do surfactante (Figura 6). O Paraquat apresentou forte sorção ao solo e o surfactante foi capaz de aumentar a disponibilidade do produto à degradação.

O surfactante aumentou relativamente a degradação do herbicida, sendo que os percentuais de degradação do mesmo por *P. ostreatus* e *P.chrysosporium* sem surfactante foram apenas de 56,86% e 39,76%, respectivamente.

Figura 6 – Degradação do herbicida paraquat pelos fungos *P. ostreatus* e *P.chrysosporium* com e sem surfactante



Fonte: Autor (2013)

O pesticida Clorotalonil só começou a ser degradado após 30 dias do experimento, sendo a remoção por *P.chrysosporium* de 85,52% e 40,57%, com e sem surfactante, respectivamente ao final de 42 dias de operação.

O fungo *P. ostreatus* foi mais eficiente na remoção do Clorotalonil, registrando-se valores de 87,10% e 100%, com e sem surfactante, respectivamente. O Clorotalonil somente foi utilizado como substrato pelo fungo após a degradação do Paraquat, o que mostrou que este foi mais facilmente assimilado do que os outros pesticidas estudados. Isso pode ser explicado, considerando que dentre os 3 pesticidas em estudo este é o que estava em maior concentração e possivelmente mais biodisponível ($7,76 \mu\text{g.g}^{-1}\text{solo}^{-1}$).

Os fungos têm sido reportados como excelentes agentes de biorremediação de pesticidas. Fragoeiro e Magan (2008) estudaram a degradação de diferentes grupos de agrotóxicos (Simazina, Dieldrin e Trifluralina), na concentração de 10 mg.kg^{-1} de solo, pelos fungos *P.chrysosporium* e *Trametes versicolor* e afirmaram que os pesticidas em mistura são diferencialmente degradados pelos fungos. No experimento, os referidos autores usaram 95 g de solo e 5 g do inóculo (micélio e

meio de cultura sólido) e obtiveram degradações de 40% para Simazina e 50% para Trifluralina e Dieldrin pelo fungo *T. versicolor*. Para *P. chrysosporium*, as degradações foram 64%, 94% e 80% de Simazina, Trifluralina e Dieldrina, respectivamente.

Na presente pesquisa, a degradação do pesticida Deltametrina pelos fungos, em comparação com o controle (3,5%) foi pequena, o que foi justificado pelo fato do pesticida se encontrar na menor concentração, de $0,31 \mu\text{g.g}^{-1}\text{solo}^{-1}$, o que pode ter dificultado sua remoção pelos micro-organismo, a qual pode ainda ter sido agravada possivelmente porque a fração do pesticida em questão estaria fortemente adsorvida às partículas de solo, dificultando a sua metabolização pelo fungo (SILVA *et al.*, 2010).

Krishna e Philip (2011) realizaram experimentos de degradação do Lindano, Metil-paration e Carbofurano em amostras de solo por bactérias e utilizaram 25 g de solo esterelizado, com a concentração de $2 \text{ mg.g}^{-1}\text{solo}$ dos pesticidas ($0,4 \text{ mg.g}^{-1}\text{solo}$ de lindano, $0,8 \text{ mg.g}^{-1}\text{solo}$ de Metil-paration e $0,8 \text{ mg.g}^{-1}\text{solo}$ de Carbofurano). Foi adicionado ainda 1 L de meio de cultura contendo bactérias, ao final de 84 dias, as taxas de degradação foram de 71%, 92% e 100% de Lindano, Carbofurano e Metil-paration, respectivamente. A menor degradação, portanto, foi de Lindano, o que os autores atribuíram à falta de afinidade da bactéria ao composto ou mesmo a sua biodisponibilidade.

A redução da tensão superficial utilizando os surfactantes pode ter papel fundamental sobre a degradação dos contaminantes (BANAT *et al.*, 2000 e SINGH *et al.*, 2007). Moreira Neto (2006), em estudo de degradação de $200 \text{ mg.kg}^{-1}\text{solo}^{-1}$ HCB pelo fungo da podridão branca *Psilocybe castanella*, observou o aumento da degradação na primeira semana de incubação do fungo com a utilização dos biossurfactantes.

Déziel *et al.* (1996) observaram, respectivamente, a melhora do processo de degradação de Fenantreno e de Naftaleno pela adição de biossurfactantes, verificando-se o aumento nas taxas de mineralização e solubilização destes poluentes.

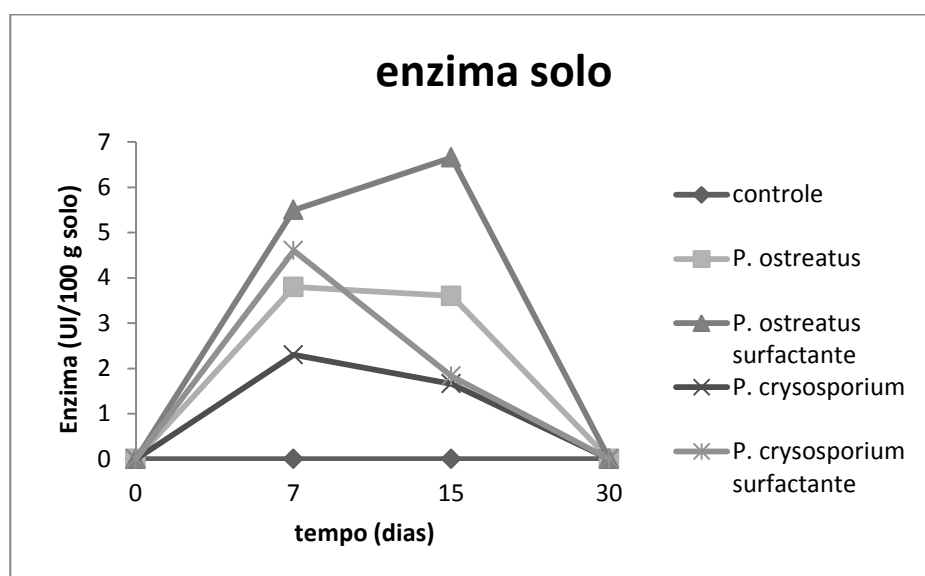
5.4.1 Produção de enzima Manganês Peroxidase no solo

A maior produção enzimática foi realizada pelo fungo *P. ostreatus*. Esta produção foi otimizada com o acréscimo do surfactante, a qual foi de

6,8 UI.100g⁻¹solo, embora sem a presença do surfactante também tenha ocorrido razoável produção de MnP, a qual foi de, aproximadamente 4,9 UI.100g⁻¹solo.

Na Figura 7 são apresentados os valores da concentração da enzima Manganês Peroxidase na presença e ausência do surfactante pelos fungos *P. ostreatus* e *P. chrysosporium*.

Figura 7 – Produção da enzima Manganês Peroxidase no solo pelos fungos com e sem surfactante.



Fonte: Autor (2013).

O *Phanerochaete chrysosporium* também apresentou produção de MnP, porém em menor quantidade que o *P. ostreatus*, com valores aproximados de 2,1 UI.100g⁻¹solo e 4 UI.100g⁻¹solo, na ausência e na presença do surfactante, respectivamente. Os valores demonstraram que a adição de surfactante melhorou a produção da enzima manganês peroxidase no solo (Figura 7).

Ao final dos 30 dias, não foi mais detectada a enzima no solo, o que coincide com a total degradação do Paraquat, tanto na presença como na ausência do surfactante. O decaimento de MnP começa a ser considerável a partir do 7º dia para *P. chrysosporium* e para o *P. ostreatus* no 15º dia (Figura 7).

O pesticida Clorotalonil foi degradado após este período, não ocorrendo atividade enzimática durante a degradação deste produto, reforçando que o Paraquat é o composto que mais facilmente foi assimilado pelos micro-organismos.

Mohammadi e Nasernejad (2009) observaram que a imobilização de células de *Phanerochaete chrysosporium* em bagaço de cana-de-açúcar favoreceu a produção e atividade de MnP em comparação com células sem imobilização em 7 dias de incubação.

Na presente pesquisa, os fungos também foram cultivados em bagaço de caju, verificando-se que os mesmos apresentaram atividade enzimática acompanhando a disponibilidade de nutrientes, de modo que, à medida que os pesticidas foram degradados, a produção de enzimas decaiu.

A produção de enzimas ligninolíticas está diretamente associada à aplicabilidade dos fungos na biorremediação de solos contaminados com pesticidas, pois os fungos dependem da sua capacidade para crescer na presença de tais compostos poluidores e a sua capacidade para a produção de enzimas de degradação desses contaminantes, ou seja, a degradação microbiológica acompanha a atividade enzimática (FRAGOEIRO e MAGAN, 2008).

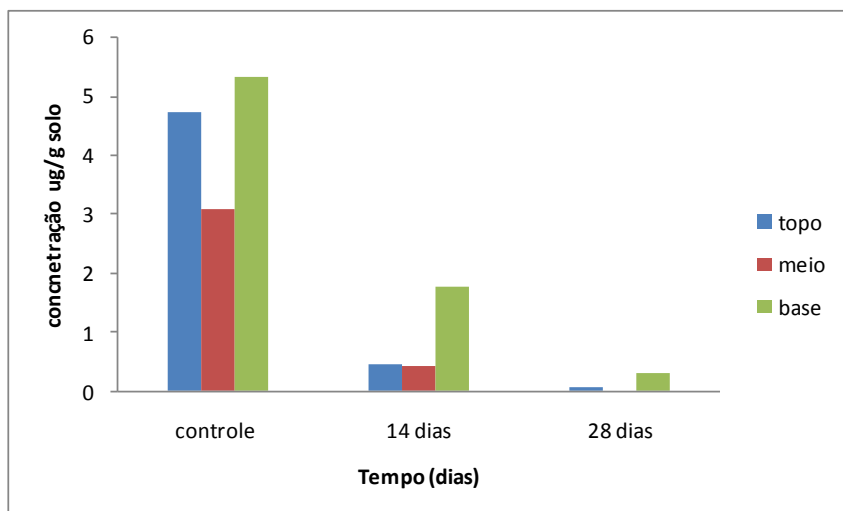
Estudos de degradação do fenantreno e antraceno detectaram a produção de enzimas Manganês Peroxidase pelos fungos *P. chrysosporium* e *P. ostreatus* (MACIEL *et al.*, 2010).

Em trabalho de biorremediação de solo contaminado por pesticidas (Simazina, Trifluralina e Dieldrina) pelos fungos *Trametes Versicolor* e *P.chrysosporium*, realizado por Fragoeiro e Magan (2005), o solo inoculado com *T. versicolor* teve aumento da atividade após 12 semanas de tratamento. No entanto a atividade para o *P. chrysosporium*, diminuiu após o tempo de incubação, podendo estar relacionado com a degradação dos poluentes, a qual para o *P.chrysosporium* chegou a valores próximos a 100%.

5. 5 Ensaios de degradação do Paraquat e lixiviação em coluna de solo

Na coluna de solo foi verificada remoção de 94% do Paraquat aos 14 dias de experimento, no topo e meio da coluna. Na base da coluna a remoção foi menor, sendo de aproximadamente de 76,8% (Figura 8).

Figura 8 - Concentração da degradação do Paraquat na coluna de solo em comparação com a coluna controle.



Fonte: Autor (2013).

Aos 28 dias, a remoção foi de quase 99% no topo, enquanto que no meio da coluna houve remoção total do Paraquat. Na base, o nível remanescente também foi baixo, o que pode ter sido ocasionado pelo lixiviamento do produto e/ou pela degradação pelos micro-organismos.

No lixiviado foi detectada concentração elevada de Paraquat ($3,27 \mu\text{g.mL}^{-1}$), correspondente a 42,14% de remoção da concentração inicial do pesticida ($7,76 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O surfactante causa altas perdas do pesticida, tendo resultado maior dessorção do pesticida adsorvido ao solo. Porém a maior parte do Paraquat foi lixiviada junto com o surfactante e o restante foi degradado microbiologicamente.

Assim, uma aplicação excessiva de surfactante causaria a saturação hídrica do solo, podendo levar à lixiviação em detrimento da degradação, constituindo-se, portanto, em poluição do subsolo.

Rodrigues e Almeida (2005) realizaram ensaio em coluna de solo com amostras de solo que continham o herbicida Alachlor, que é um herbicida organoclorado usado para controle de pragas em plantações de milho, cujas características são parecidas com as dos pesticidas usados no presente trabalho. As amostras de solo foram submetidas à saturação da umidade utilizando água e verificaram que ocorreu até 90% de perdas por lixiviação. Segundo os autores esses resultados são compatíveis para qualquer tipo de solo em relação à lixiviação do Alachlor.

Boeira (2005) avaliou a lixiviação do Tebutiuron em 3 solos diferentes utilizando colunas de PVC com 15 cm de diâmetro por 80 cm de comprimento. Estes solos foram submetidos à saturação hídrica durante 24 horas, após isso foram realizadas as análises de concentração dos pesticidas nas diferentes camadas de solo. Foi encontrada concentração de Tebutiuron em profundidade de 60 cm apenas para o solo que era pobre em matéria orgânica. Observou-se ainda que a maior concentração do pesticida ficou entre 10 e 20 cm da coluna de solo. A coluna de solo deste trabalho tinha 25 cm de comprimento e foi encontrado Paraquat até essa profundidade.

O uso das colunas de solo tem sido usado como método para avaliar a lixiviação de compostos ao longo dos extratos do solo, e assim avaliar ao potencial contaminante dos pesticidas em diferentes profundidades. As colunas de solos possibilitam também estudos da lixiviação de compostos recalcitrantes ao longo do tempo, bem como avaliações de sua biodegradação e/ou volatilização (BOEIRA, 2005).

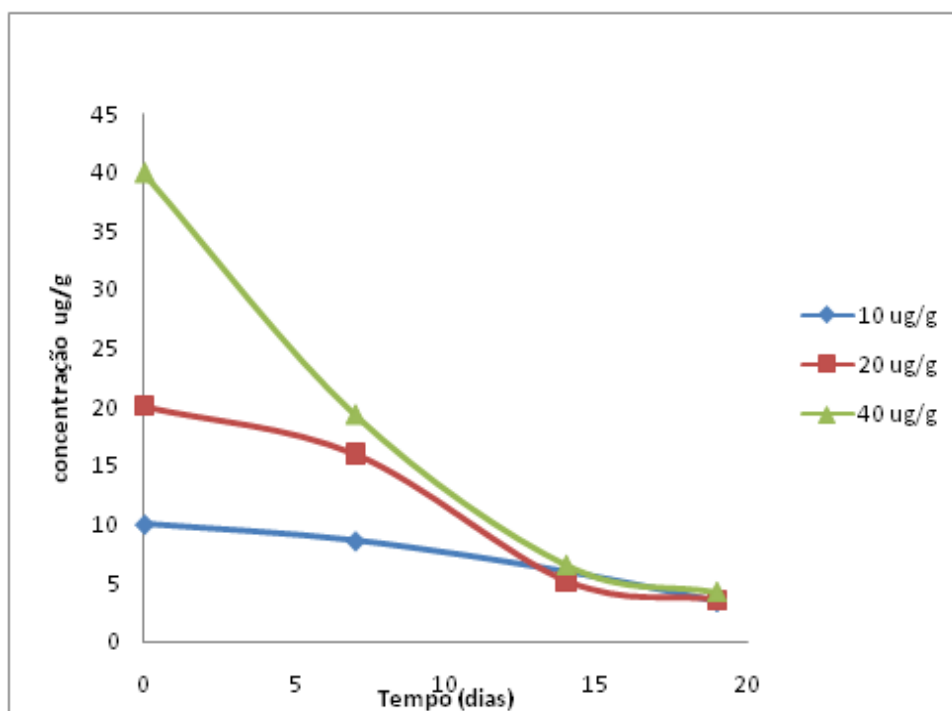
5.6 Estudo da degradação do Paraquat na presença de surfactante em diferentes concentrações do pesticida

Na concentração de $40 \mu\text{g.g}^{-1}$ houve degradação de, aproximadamente, 87,5%, enquanto que nas concentrações de $20 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $10 \mu\text{g.g}^{-1}$, os percentuais de remoção registrados foram de 75% e 50%, respectivamente, no tempo final de 19 dias (Figura 9).

No final, o nível de resíduo nas três concentrações estudadas foi semelhante, mostrando que o pesticida alcançou sua maior remoção até o 14º dia, como pode ser observado na Figura 9.

A degradação aumentou proporcionalmente com o aumento na concentração do produto, ocorrendo, provavelmente, maior produção de enzimas MnP com o aumento da concentração de Paraquat, já que, como já foi citado por Leontievsky *et al.* (2002), D'Annibale *et al.*, (2005) e Machado *et al.*, (2005), os fungos reagem bem a exposição a altas concentrações do poluente, o que é atribuído à ativação do sistema enzimático que é responsável pela produção de enzimas que atuam diretamente na degradação dos contaminantes.

Figura 9 – Degradação de paraquat no solo com surfactante para concentração de 10, 20 e 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do pesticida.



Fonte: Autor (2013).

O resultado de degradação corrobora com os resultados de toxicidade do fungo *P. chrysosporium* e *P. ostreatus* ao Paraquat feito neste trabalho que mostrou que este pesticida não causou efeito inibitório a nenhum dos fungos em estudo.

A biodisponibilidade do Paraquat nas amostras de solo pode ter sido aumentada, em função do uso de biosurfactante pela diminuição da tensão superficial no solo em estudo (SINGH *et al.*, 2007), o que também contribuiu para os resultados de degradação do pesticida.

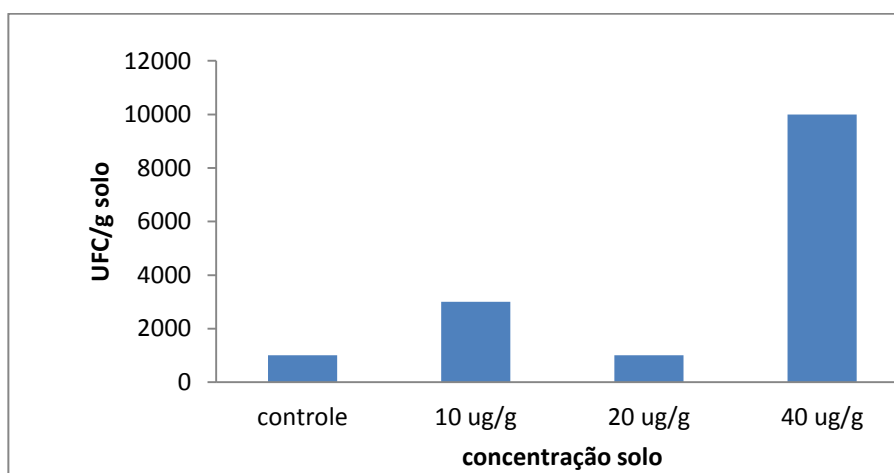
5.6.1 Contagem de fungos do solo com aplicação de Paraquat e surfactante

A partir da análise microbiológica se observou na contagem de fungos para o solo contaminado com Paraquat na presença de surfactante que este resultado está coerente com a degradação do produto no solo, pois onde houve maior degradação, concentração de 40 $\mu\text{g.g}^{-1}$ -solo, e ocorreu o aumento da população de micro-organismos ao final do período de tratamento (20 dias) que foi de 10.000 UFC. g^{-1} -solo (Figura 10), demonstrando que os fungos utilizaram o produto como alimento e se reproduziram.

Porém, a degradação ao final do tempo do experimento não foi completa, pois ainda havia pesticida disponível no meio. Provavelmente, quando a concentração de Paraquat diminuisse os micro-organismos entraria em decaimento.

Para a concentração de $10 \mu\text{g.g}^{-1}$.solo de Paraquat, onde a degradação foi de 50%, observa-se na Figura 10, que a quantidade de unidades formadoras de colônias foi maior que na concentração de $20 \mu\text{g.g}^{-1}$.solo, na qual a degradação foi de 75%. A degradação para a menor concentração ainda não havia sido significativa, portanto poderia ainda estar ocorrendo multiplicação dos fungos degradadores do pesticida, assim como pode ser devido ao efeito não inibitório dos pesticidas aos fungos *P. ostreatus* e *P. chrysosporium* para a concentração de $10 \mu\text{g.g}^{-1}$.solo, conforme pode ser observado nas Tabelas 8 e 11 no item 5.3.

Figura 10 – Contagem de fungo no solo com paraquat e surfactante.



Fonte: Autor (2013).

Cerqueira (2007) avaliou a biorremediação de solo por derrames de óleo e derivados usando biosurfactate, produzido a partir do fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus*. Dentre os experimentos realizados foi utilizado biosurfactante e bioestimulação do solo e então avaliada a degradação e realizada a contagem de micro-organismos. Para contagem de fungo nos tempos de 0, 7, 15, 30, e 60 dias houve aumento, sendo esse valor no tempo de 60 dias de $4,6 \cdot 10^5 \text{ NMP. g}^{-1}\text{.solo}$, ocorrendo um decaimento aos 90 dias ($2,1 \cdot 10^5 \text{ NMP.g}^{-1}\text{.solo}$) quando a degradação foi de 100%. Pode-se observar que à medida que os compostos biodegradáveis ficaram escassos, o numero de micro-organismos decaiu, possivelmente, pela

competição pelo alimento, assim como foi verificado no presente trabalho onde a quantidade de biodisponível de pesticidas interferiu na contagem de fungos.

Abdulsalam e Omale (2009) avaliaram a relação da degradação com o crescimento de micro-organismos usando as técnicas de bioestimulação e bioaumentação em solo contaminado com 40.000 ppm de óleo de motor. Obtiveram a melhor degradação de hidrocarbonetos quando utilizaram a bioestimulação tendo ao final do tratamento (6 semanas) 75 % de remoção, houve crescimento (fase Lag) dos micro-organismos nas primeiras 4 semanas, onde ocorreu a rápida degradação, a partir de então ocorre decaimento no numero de colônias formadas a medida que o alimento (hidrocarboneto) vai ficando escasso. Portanto mostra que os micro-organismos desempenham papel fundamental nos processos de biorremediação e seu numero pode determinar a capacidade de degradação global (ADEYNKA e URUM, 2001).

Os biossurfactantes agem como redutores da tensão superficial e interfacial, com isso ocorre o aumento da área de contato e a quebra dos compostos na forma de micela (quando o surfactante envolve a substancia hidrofóbica), diminuindo a área de contato entre as cadeias hidrocarbônicas do surfactante e a água, facilitando a dispersão dos contaminantes no ambiente e sua consequente metabolização pelos micro-organismos presentes no meio (ZILIO *et al.*, 2012).

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram observar que:

- ▶ O solo estudado apresentou ter alto valor de nutrientes, o que favorece a degradação, demonstrando que o tratamento biológico pode ser utilizado na região em estudo;
- ▶ No solo estudado foram encontrados os seguintes pesticidas Deltametrina: $0,31 \mu\text{g.g}^{-1}\text{solo}^{-1}$, Clorotalonil: $2 \mu\text{g.g}^{-1}\text{solo}^{-1}$ e Paraquat: $7,76 \mu\text{g.g}^{-1}\text{solo}^{-1}$.
- ▶ Apenas para o Clorotalonil, nas três concentrações estudadas, houve efeito tóxico ao fungo *P.ostreatus*, enquanto que para o *P.chrysosporium* não houve efeito inibitório.
- ▶ A biorremediação foi aumentada com o uso do biossurfactante para os pesticidas Paraquat e Clorotalonil, sendo que para a Deltametrina não foi observada degradação significativa possivelmente pela indisponibilidade do produto devido a sua baixa concentração na amostra de solo, tanto para os dois fungos estudados (*P. ostreatus* e *P.chrysosporium*).
- ▶ A produção da enzima Manganês Peroxidase pelos fungos *P. ostreatus* e *P.chrysosporium* e a atividade enzimática acompanhou as taxas de degradação dos pesticidas pelos fungos.
- ▶ A maior degradação do pesticida ocorreu em sua maior concentração ($40 \mu\text{g.g}^{-1}$ de Paraquat), aproximadamente 42,15% do Paraquat foi lixiviado na coluna de solo, enquanto que a outra parcela foi degradada microbiologicamente.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com a finalidade de aprimorar os resultados aqui obtidos, sugere-se:

- ▶ Avaliar a ação do biossurfactante para maiores concentrações dos pesticidas.
- ▶ Verificar a influência da concentração na degradação da Deltametrina.
- ▶ Realizar teste de lixiviação para colunas de solo de comprimentos maiores.
- ▶ Analisar o potencial de degradação dos fungos *P.ostreatus* e *P.chrysosporium* para outras classes de pesticidas.

8 REFERÊNCIAS

ABALOS, A. PINAZO, A., INFANTE, M.R.; CASALS, M.; GARCIA, F. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir*, **Washington, DC**, v.17, n.5 p. 1367-1371, 2001.

ABDULSALAM, S; OMALE, A. B. Comparison of biostimulation and bioaugmentation techniques for the remediation of used motor oil contaminated soil. **Braz. arch. biol. technol.**, Curitiba, v. 52, n. 3, June 2009 .

ADEYNKA, J.S e URUM, K.C.N. **Avaliação e determinação de eficiência de biorremediação em um tratamento de poluição de petróleo**, Trop. Environ. Res.3, 181-187, 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **C18 Clorotalonil** (Jun2007).

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Deltametrina**. <http://www.anvisa.gov.br/AGROSIA>. (15 jun2004).

AGROFIT. **Acephate: relatório de ingredientes ativo**. Out/2002.

ALIFERIS KA, JABAJI S. Metabolomics – A robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: **A review. Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 100: p. 105-117, 2011.

ALVAREZ V., V.H. (Ed.).**Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais**: 5. Aproximação. Viçosa: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 1999. p. 67-78.

ALVAREZ, PEDRO J.J.; ILLMAN, WALTER A. **Bioremediation and natural attenuation: process fundamentals and mathematical models**. New Jersey: Wiley-Interscience, 2006. 609 p.

ANDRADE, J. A., AUGUSTO, F. e JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados com petróleo e seus derivados. **Eclética Química** v. 35 (3): p. 17-43, 2010.

ANDREI, E. Applicability of bioremediation to eastern European pollution problems. **Compêndio de defensivos agrícolas**. 6ed. São Paulo: Organização ,1999.

ANVISA - Agência nacional de vigilância sanitária. Consulta pública nº 60, de 26 de junho de 2007. **Regulamento Técnico do Paraquat**.

ANVISA- Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análises de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**, 2010.

ANVISA. **Relatório do agrotóxico**. Disponível em:
http://www.4anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm_dados_agrotoxico.asp. Acesso em:
 16/mar/2010.

ARTHUR,E.L.; PEROVICH, B.S.; ANDERSON,T.A.; COATS,J.R. Degradation of an atrazine and metolachlor herbicide mixture in pesticide contaminated soils from two agrochemical dealerships in Iowa. **Water, air and soil pollution**, v. 119, p. 79-90, 2000.

AUST, S. D. Degradation of enviromental pollutants by Phanerochaete chrysosporium. **Microbial Ecology** v. 20: p. 197-209, 1990.

BANAT, I. M. Les biosurfactants, plus que jamais sollicités. **Biofutur**, n. 198, p. 44-47, 2000.

BANAT, I. M., Makkar, R. S.e Cameotra, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appiedl Microbiology and Biotechnology** v. 53: p. 495–508, 2000.

BENTO .F; CAMARGO FLÁVIO A.O.; OKEKE BENEDICT C.; FRANKENBERGER WILLIAN T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by

natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1049-1055, 2004.

BETTIN, F. **Cinética de Crescimento e Produção de Lacases do Fungo *Pleurotus Sajor-Caju* PS- 2001(Fr.) Singer em Processo Submerso em Biorreator com Agitação Mecânica. 230 f.** Tese(Doutorado em Biotecnologia), Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2010.

BEZERRA, R. S. Avaliação da adição de PRP no tratamento de solo contaminado por petróleo. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 17., 2009, Ijuí. Anais... Ijuí: UNIJUI, 2009.

BOEIRA,C.R.; SOUZA, D.M. Movimento do herbicida Tebutiuron no perfil de três tipos de solos através de colunas de lixiviação. **Comunicado Técnico 25**. Jaguariuna, 2005.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Monografias uso agrícola e domissanitário: portarias e resoluções de ministério da saúde**. São Paulo: LAI, 2000.

BROMILOW,R.H. Paraquat and sustainable agriculture. **Management Science**, v. 60, p. 340- 349, 2003.

BUENO, S. M.; SILVA A. N.; GARCIA-CRUZ, C. H. Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1572-1577, 2010.

CAMARGO, F. M.; OKEKE, B. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34 (Suppl.1), p. 65-68, 2004.

CASIDA JE, QUISTAD GB. Golden Age of Insecticide Research: Past, Present, or Future? **Annual Reviews Entomology**. v 43: p 1-16,1998.

CERQUEIRA, VANESSA SACRAMENTO. **Produção de biosurfactante e lipase *Aspergillus fumigatus* cultivado em estado sólido e avaliação da**

biorremediação em derrames de óleos e derivados. 153f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2007

CHA, M., LEE, N., KIM, M.; LEE, S. Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida*. **Bioresour. Technol.** doi:10.1016/j.biortech.2007.05.035, 2007.

CHOWDHURY, A.; PRACHAN, S.; SOHO, M.; SANJAL, N. Impact of pesticide on soil microbiology parameters and possible bioremediation strategies. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 114-127, 2008.

COELHO, S.J. **Envolvimento das enzimas lignolíticas de *Ganoderma lucidum* na remoção dos herbicidas diuron e bentazon.** Dissertação (Pós graduação em Ciências Biológicas), Maringá, 2009.

COLLA, L.M; PRIMAZ,L.A; LIMA,M; BERTOLIN,E.T; COSTA,V.A.J. Isolamento e Seleção de Fungos para Biorremediação a partir de Solo Contaminado Com Herbicidas Triazínicos. **Ciênc. Agrotec.** Lavras, v. 32, n. 3, p.809-813, 2008.

CONTE, P.; AGRETTO, A.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Soil remediation humic acids as natural surfactants in the washings of highly contaminated soils. **Environmental Pollution**, v. 135, p. 515-522, 2005.

CORDAZZO, J. **Modelagem e simulação numérica do derramamento de gasolina acrescida de álcool em águas subterrâneas.** Dissertação (mestrado) – Departamento de Engenharia Mecânica, UFSC – Florianópolis, SC, 2000.

COSTA, S. G. V. A. O. Nitschke, M.; Haddad,R.; Eberlin, M.N. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 483-488, 2006.

CROFT, B.A. **Arthropod biological control agents and pesticides.** New York: J. Wiley, 1723 p, 1990.

CUNNINGHAM, C. J.; IVSHINA, I.B.; LOZINKY, V.I.; KUYUKINA, M.S.; PHELP, J.C. Bioremediation of diesel contaminated soil by microorganisms immobilized in polyvinyl alcohol. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 2008, in press.

D'ANNIBALE, A., RICCI, M., LEONARDI, V., QUARATINO, D., MINCIONE, E. & PETRUCCIOL, M. Degradation of aromatic hydrocarbons by white-rot fungi in a historically contaminated soil. **Biotechnology and Bioengineering** v. 90: p. 723-731, 2005.

DAMS.R.I. Pesticidas: Usos e perigos à saúde e ao meio ambiente. **Health and Enviromental Journal**, v.7, n.2, dezembro 2006.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DEZIEL E., PAQUETTE G., VILLEMUR R., LEPINE F. ; BISAILLON J. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. **Appl. Environ. Microb.** v. 62, p. 1908–1912, 1996.

DORAN.J.W.; ZEISS, M.R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. **Applied Microbiology**. v.15, p.3-11 , 2005.

EERD, L. L. V., HOAGLAND, R. E., ZABLOTOWICZ, R. M. & Hall, J. C. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. **Weed Science** v. 51: p. 472–495, 2003.

EIRA, A. F. Fungos comestíveis. In: ESPÓSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, cap. 12, p. 379-448, 2004

EKUNDAYO, E.O. Effect of common pesticides used in the Niger Delta basin of southern Nigeria on soil Microbial populations. **Environmental Monitoring and Assessment** v. 89: p. 35-41, 2003.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. 2.ed.Rio de Janeiro, Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 1997.212p

FERRAZ, A.L.. Fungos decompositores de materiais lignocelulolíticos. Pp. 215 – 242. In: Esposito, E.; Azevedo, J.L. (orgs). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnológica**. Caxias do Sul: Educs, 2004.

FILHO, M., DELLA LUCIA, T., CRUZ, I., GALVÃO, J., VEIGA, C.. Impacto de Deltametrina em artrópodes- pragas e predadores. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, América do Norte, v 1, 2010

FLIEBBACH, A., OBERHOLZER, H.-R., GUNST, L. AND MÄDER, P. Soil organic matter and biological soil quality indicators after 21 years of organic and conventional farming. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 118: p. 273–284, 2007.

FRAGOEIRO, S.; MAGAN, N. Enzymatic activity, osmotic stress and degradation of pesticide mixture in soil extract liquid broth. **Environmental Microbiology**, v. 7, p. 348-355, 2005.

FRAGOEIRO, S.; MAGAN,N. Impact of *Trametes versicolor* and *Phanerochaete Chrysosporium* on differential breakdown of pesticides mixtures in soil microcosms at two water potentials and associated respiration and enzyme activity. **International Bioremediation e Biodegradation**. v. 62: p. 376 – 383, 2008.

FRANCO, A. A. **Resíduos de deltametrina, aplicada em diferentes formulações, em compartimentos da cultura do pepino (*Cucumis sativus* L.) tutorado e ação do inseticida no controle da broca-das-cucurbitáceas *Diaphania nitidalis* (Cramer, 1782) (Lepidoptera: Crambidae)**. Dissertação (mestrado), 2004

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; CARVALHEIRA, M.; COSTA, N.; OLIVEIRA, R.; REIS, M.A.M. **Emulsifying behavior and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol by roduet Carboidrate Polymers**, v.78, p.549 – 556, 2009.

FUNDACENTRO. **Prevenção de acidentes no trabalho com agrotóxicos: segurança e saúde no trabalho**, São Paulo: Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho, Ministério do Trabalho, 1998.

GALASSI S, V. L. e SANNA M. Bioconcentration of organochlorine pesticides in rainbow trout caged in the river Po. **Chemosphere** v. 32: p. 1729- 1739, 1996

GALIULIN, R.V.; RASHKIN, V.N. GALIULIN, R.A.; BIRCH, P. The theoretical basis of microbiological transformation and degradation of pesticides in soil. **Land Contamination and Reclamation** , v.9, p.4- 9, 2001.

GIANELLO, C.; GIASSEN, E. **Fatores que afetam o rendimento das culturas e sistemas de cultivos**, 2004.

GOEL, A.; McCONNEL, L. L.; TORRENTS, A. West deposition of currient use pesticides at a rural location on the Delmarva Peninsula: impact of rainfall patterns and agricultural activity. **Journal os Agricultural and food Chemistry**, v.53, p. 7915- 7928, 2005.

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução**. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2005.

GUIMARÃES, M.S.O. **Coleta, isolamento e identificação de fungos presentes em sistemas de tratamento de efluentes de indústria petroquímica para utilização em processos degradação de hidrocarbonetos aromáticos**. 56 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009.

GUO-LIANG, Z., YUE-TING, W., XIN-PING, Q. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. **Journal of Zhejiang University Science** v. 8, p. 725-730, 2005.

HABA, E. VIDAL-MASJ., BASSAS, M., ESPUNY, M.J. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBI 40044 from waste frying oils. **J. Appl. Microbiol.**, London, v. 88, n. 3, p. 379-387, 2000.

HATRIK, S. e TEKEL, J. Application pesticide review: Extraction methodology and chromatography for the determination of residual pesticide in water. **J. Chromatogr.** p 217–233, 1996.

IGLESIAS-JIMENEZ, E.; SANCHEZ-MARTIN, M.J., SANCHEZ-CAMAZANO, M. Pesticide adsorption in a soil water system in the presence of surfactant. **Chemosphere**, v. 32, p. 1771-1782, 1996.

JACQUES, R. J. S.; OKEKE, B.C.; BENTO, F.M.; PERALBA, M. C. R.; CAMARGO, F. A. O. Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial consortium from a petrochemical sludge landfarming site. **Bioremediation Journal**, v.11, n.1, p.1-11, 2007.

JAYASHREE, R; VASUDIVAN, N; CHANDRASEKARAN, S. Surfactants enhanced recovery of endosulfan from contaminated soils. **Int. J. Environ. Sci Tech**, v. 3, p. 251-259, 2006.

KANISSERY, R. G.; SIMS, G. K. **Biostimulation for the enhanced degradation of herbicides in soil. Applied and Environmental Soil Science**, v. 2011, Article ID 843450, 10 pages. DOI:10.1155/2011/843450 v. 2011.

KRISHNA, R.K.; PHILIP, L. Biorremediation of Single and Mixture of Pesticide-Contaminated Soils by Mixed Pesticide-Enriched Cultures. **Environmental and Water Resources Engineering Division**, 2011.

KRISHNA. C. Solid-state fermentation systems - an overview. **Critical Reviews in Biotechnology** 25: 1–30, 2005

KULKARNI, M.; CHAUDHARI, A. Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: An overview. **Journal of Environmental Management**, v. 85, p. 496-512, 2007.

KUNZ, A; PERALTA-ZAMORA,P; MORAES,G.S, DURÁN,N. Novas Tendências no Tratamento de Efluentes Têxteis. **Quim. Nova**, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.

KUWAHARA,M.; GLENN,J.K.; MORGAN,M.A.; GOLD,M.H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letter**, v. 69, p.247 – 250, 1984.

LAHA, S.; TANSEL,B.; USSAWARYCKULCHAN, A. Surfactant soil interaction during surfactant-amended remediation of contaminated soils by hydrophobic organic compounds: A review. **Journal of Environmental Management**, v.90, p. 95-100, 2009.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial surfactants). **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.7, p.12-20, 2002.

LEONTIEVSKY, A. A., MYASOEDOVA, N. M., GOLOVLEVA, L. A., SEDARATI, M. & EVANS, C. S. Adaptation of the white-rot basidiomycete *Panus tigrinus* for transformation of high concentration of chlorophenols. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 59: p. 599-604, 2002.

LITCHFIELD, C. Thirty Years and Counting: Bioremediation in Its Prime. **BioScience** v. 55 (3): p. 273-279, 2005.

LUCHESI, E.B.; FAVERO, L.O.B.; LENZI, E. **Fundamentos da química do solo**, Livraria Freitas Bastos Editora S.A. Rio de Janeiro, 182p, 2001.

MACÊDO, J. A. B. **Programa de bioaugmentação (bioaugmentation), uma tecnologia avançada para tratamento de efluentes de laticínios.** *Revista do Instituto de laticínios Cândido Tostes*, v. 55, n. 315, p.47-52, 2010.

MACHADO, K. M. G., MATHEUS, D. R., MONTEIRO, R. T. R. & BONONI, V. L. R. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** v. 21: p. 297-301, 2005.

MACIEL, C. C. S., SOUZA, M. A. GUSMÃO, N. B., CAMPOS-TAKAKI, G. M. Produção de enzimas do sistema lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactado por petroderivados. **Exacta, São Paulo**. v. 8(2): p. 133-144, 2010.

MAIER, R.M.; SOBERÓN – CHAVES, G. pseudomonas *aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential application. **Applied Microbiology and Biotechnology**,v. 54, p. 625-633,2000.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus strains* at thermophilic conditions. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 74, p. 887 – 889, 1997.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel.** Rio Claro: Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2006.

MARIANO, A. P.; TOMASELLA, R. C.; MARCONDES DE OLIVEIRA, L.; CONTIERO, J.; DE ANGELIS, F. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 1323-1328, 2008.

MATHEUS, D. R. e OKINO, L. K. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. In: **Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos – noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas**, 2002.

MEURER, J.E.; **Fundamentos de química do solo**. 2°.ed. Porto Alegre: SIARGS, 2004.

MILLER, H. Bioestimulation as a form of bioremediation of soil pollutants. **Basic Biotechnology Journal**, , v. 6, n. 1, p. 7-12, 2010.

MNIF W, HASSINE AIH, BOUAZIZ A, BARTEGI A, THOMAS O, ROIG B. Effect of Endocrine Disruptor Pesticide. **A Review. International Journal of Environmental Research and Public Health**.v. 8: p. 2265-2303, 2011.

MOHAMMADI, A., e NASERNEJAD, B. Enzymatic degradation of anthracene by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on sugarcane bagasse. **Journal of Hazardous Materials**, v.161, p.534–537, 2009.

MOLINA-BARAHONA, L. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. **Applied Soil Ecology**, v. 27, p. 65-175, 2004.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Ed. UFLA, 2002.

MOREIRA, J.C. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 7/2, p. 299-311, 2002.

MOREIRA-NETO, S. L. **Enzimas ligninolíticas produzidas por Psilocybecastanella CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 124p, 2006.

MORENO, C. M., BECERRA, A. G. e SANTOS, M. J. B. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. **Revista Iberoamericana de Micología** v. 21: p. 103-120, 2004.

MULLIGAN, C. N. Environmental application for biosurfactants. **Environmental Pollution**. v. 133, p. 183-198, 2005.

MYCOPLANT. Disponível em: <<http://lojadassementes.pt/repolga-pleurotus-ostreatus-pronto-produzir-p-2931.html>> 2012. Acesso em: 25/07/13.

NITSCHKE, M., COSTA, S.G.V.O., CONTIERO, I. structure and Applications of a Rhamnolipid Surfactant Produced in Soybean Oil Waste. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 160, p. 2066 – 2074, 2010.

NITSCHKE, M.; POSTORE, M.G.; Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Quim. Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.

NWACHUKWEE, E. O.; AND OSUJR, J.O. Bioremedial degradation of some herbicides by indigenous white rot fungus *Lentinus subnudus*, **J. Plant Sci**, v. 2, p. 619-624, 2007.]

NYAKUNDI, W.O.; MAGONA, G.; OCHORA, J.; NYENDE, A.B. Biodegradation of Diazinon and methonil pestides by white rot fungi from selected horticultural farms in rift valley and central provinces, Kenya. **Institute for Biotechnology research**, Department of Biochemistry and Departament of Botany Kenyatta, 2012.

OLIVEIRA, F.M; BRIGHENTI, M. A. **Comportamento dos Herbicidas no Ambiente**. Eds, Biologia e Manejo de Plantas Daninhas, 2011.

PEREIRA, P. M. **Avaliação do potencial de fungos na degradação do herbicida Atrazina**. 92 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária), Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

PERELO, L. W. In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 177, n. 1-3, p. 81-89, 2010.

PIMENTEL,V,R. **Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de resíduos de pesticidas em medicamentos à base de plantas.** Dissertação (Mestrado em Controle da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos). Coimbra, 2007.

PINHEIRO, A.; MORAES, J.C.S.; SILVA, R.M. Pesticidas no perfil de solos em áreas de plantações de cebolas em Itaporanga, SC. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.** V 15, n. 5, p. 533- 538, 2011.

POINTING, S. B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology.** v. 57: p. 20–33, 2001

PONTECORVO, G.; ROPER,J.A.; CHEMMONS, L.M. **The genetics of Aspergillusnidulans.** **Advances in Genetics**, v.5, p.141-238, 1953.

RAMADEVI, C.; NATH,M.M.; PRASAD, E.M. Mycodegradation of Malathion by a soil fungal isolete, *Aspergillus Niger* . **International Journal of basic and applied Chemical Sciences.** v. 2, p. 108 -115, 2012.

RAMASWAMI, A.; LUTHY, R.G. Mass transfer and bioavailability of PAH compounds in coal tar NAPL–slurry systems. 1. Model development. **Environ. Sci. Technol.**, v. 31, p. 2260–2267, 1997.

REDDY, G. V. B e GOLD, M. H. Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved. **Microbiology** v. 146: p. 405–413, 2000.

REDDY, G. V. B., GELPKE, M. D. S. e GOLD, M. H. Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of Reductive Dechlorination. **Journal of Bacteriology** v. 180 (19): p. 5159–5164, 1998.

RIBAS,P.P.;MATSUMURA,S.T.A. A química dos agrotóxicos: impactos sobre a saúde e ensino. **Revista Liberato**, v.10, n.14, p.144-158, 2009.

RISSATO, R. S; LIBÂNIO, M. GIAFFERIS, P.G; GERENUTTI, M. Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de Bauro (SP). **Quim.Nova**, v. 27, n.5, p. 739-743, 2004.

RIZZO, A. C. L.; LEITE, S. G. F.; SORIANO, A. U.; SANTOS, R. L. C.; SOBRAL, L. G. S.; **Série Tecnologia Ambiental**, STA-37, CETEM/MCT, 2006.

ROBERT, M.; MARCADÉ, M.E.; BOSCH, M.P.; PARRA, J.L.; ESPINY, M.J.; MANRESA, M.A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*44T1. **Biotechnology Letters**, v. 11, p. 871-874, 1989.

ROCKNE, K.J.; REDDY, K. R. **Biorremediation of contaminated sites** ; International e-Conference on Modern Trends in Foundation Engineering: Geotechnical Challenges and Solutions; pp. 1-22. Oct. 2003;

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 5.ed. Londrina: Autores, 2005.

RODRIGUES, T.A. **Estudo da interação biosortiva entre o corante reativo procion blue Mxg e as linhagens Ccb 004, Ccb 010 e Ccb 650 de *Pleurotus ostreatus* paramorfogênico**. 2003. 97 f. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação) - Departamento de Instituto de Biociências “Júlio de Mesquita Filho”, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro - Sp, 2003.

ROSA, M. F. Caracterização do pó da casca de coco verde usado como substrato agrícola. **Comunicado Técnico Embrapa Agroindústria Tropical**, n. 54, p. 01-06, 2001.

ROUCHAUD, J.; ROUCOURT, P.; VANACHTER, A.; BENOIT, F. ; CEUSTERMANS, N. Hydrolytic biodegradation of chlorothalonil in the soil and in cabbage crops. **Toxicol. Environ Chem**, v. 17, p. 59-68, 1988.

SANTA ANNA, L. M. M., SORIANO, A. U., GOMES, A. C. "Use of biosurfactant in the removal of oil from contaminated sandy soil", **Journal of Chemical Technology & Biotechnology** v. 82, n. 7, pp. 687-691, 2007.

SÃO PAULO. CETESB Determinação da biodegradação de resíduos- método respirométrico de Bartha. **Norma L6.350**. São Paulo: CETESB, Abril/1990. 15 p.

SCHMIDT, P.; WECHSLER, F. S.; NASCIMENTO, J. S.; VARGAS JUNIOR, F. M. Tratamento do feno de braquiária pelo fungo *Pleurotus otreatus*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1866-1871, 2003.

SHIM, S. S. e KAWAMOTO, K. Enzyme production activity of *Phanerochaete chrysosporium* and degradation of pentachlorophenol in a bioreactor. **WaterResearch** v. 36: p. 4445–4454., 2002.

SILVA, C. F; CARDEAL, L. Z; CARVALHO, R. C. Determinação de pesticidas organofosforados em água usando microextração em fase sólida e CGAE-EM. **Quim. Nova** vol.22, n.2. 1999.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. **Agrotóxicos e ambiente**. In: Célia Maria Maganhotto de S. Silva; Elisabeth Franciscon iFay. (Org.). Pesticidas: visão ambiental. 1 ed. Brasília, DF: Embrapa, 2004.

SILVA, F. A.; LOURENCETTI, C.; DORES, E. F. G. C. Influência da temperatura, umidade e profundidade do solo na persistência do diurom e sulfato de endossulfam em um solo tropical. **Quím. Nova**, v. 33, n. 7, 2010

SILVA, J. H.; MONTEIRO, R.T.R. Degradação de xenobióticos por fungos filamentosos isolados de areia fenólica. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 669-674, 2000.

SILVA, R. R. **Biorremediação de solos contaminados com organoclorados por fungos basidiomicetos em biorreatores**. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente). São Paulo, 2009.

SILVA, R. R., COELHO, G. D. **Fungos: principais grupos e aplicações biotecnológicas**. Curso de Capacitação de monitores e educadores – Instituto de Botânica de São Paulo, 2009.

SINGH, A., VAN HAMME, J. D. & WARD, O. P. 2007. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances** v. 25: p. 99-121, 2007.

SINGH, J.; SINGH, D. K. Dehydrogenase and phosphomonoesterase activities in groundnut (*ArachisHypogaea*L.) field after diazinon, imidacloprid and lindane treatments. **Chemosphere**, v.60 (1), p. 32-42, 2006.

SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S; GRISI, B. M; HUNGRIA, M; ARAÚJO, R. **Microrganismos e processos biológicos do solo. Perspectiva ambiental**. 1 ed. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 142 p., 1994.

SOUSA, A.F; ROSADO, F.R. Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.2, n.1, p. 121-139, 2009.

SOUZA, A.F.; ROSADO, F.R. Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.2, n.1, p. 121-139, 2009.

TADEO, J.L.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; ALBERO, B.; GARCIA-VALCÁRCEL, A.I. Application of ultrasound assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2415-2440, 2010.

TOMLIN, C. World compedium the pesticide manual: incorporanting the agrochemicals hand book. 10 ed. Cambridge: **British crop protection Council**; Royal Society of chemistry, 1341p,1995.

TORTELLA, G. R., DIEZ, M. C. & DURÁN, N. Fungal Diversity and Use in Decomposition of Environmental Pollutants. **Critical Reviews in Microbiology** v. 31: p. 197–212, 2005.

VAN BEELEN, P.V.; DOELMAN, P. Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. **Chemosphere**, v. 34, p. 455-499, 1997.

VAN DOORN, C.; VINK, M.; VAN DER POLL, J. M. Gas chromatographic determination of chlorothalonil and its metabolite 4-hydroxy-2,5,6-trichloroisophthathalonitrile (HTI) in water. **Chromatographia** v. 40, p. 458-462, 1995.

VIANA, P.A; F. COSTA. Controle da lagarta-docartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho com inseticidas aplicados via irrigação por aspersão. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Piracicaba, v. 27, p. 451-458, 1998.

VIDAL, R.A; NUNES, A.L. Persistência do herbicida imazaquin associado ao glyphosate ou paraquat em plantio direto. **Planta daninha**, Viçosa, v. 28, n. 4, 2010 .

VIRAN, R. ÜNLÜ ERKOÇ,F.; POLAT,H.; KOÇAK,O. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (Poeciliareticulata). **Ecotoxicol. Environ.** v.55, p.82-85, 2003

WATTERSON, A. **Pesticide user's health and safety handbook: an international guide**. Aldershot: Grower Technical, 504p, 1988.

WEI, Y., CHOU, C., CHANG, J., Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. **Biochemical Engineering Journal** v. 27, p. 146-154, 2005

WU, L.; LIU, G.; YATES, M. V.; GREEN, R. L.; PACHECO, P.; GAN, J.; YATES, S. R. Environmental fate of metalaxyl and chlorothalonil applied to a bentgrass

putting green under southern California climatic conditions. **Pest Management Science**, v.58, p.335-342, 2002

YANG, C. L.; SUN, T. H.; HE, W. X.; ZHAN, Q. X.; CHEN, S. Single and joint effects of pesticides and mercury on soil urease. **Journal of environmental sciences**, v. 19, p. 210-216, 2007.

YOUNES, M.; GALAL-GORCHEN, H. Pesticides in drinking-water- a case study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 87-90, 2000.

ZILIO, L.R.; HOLZ,P.C.J.;GOULARTE, G.P.; RADMANN,M.E.; TREICHEL,M.;COSTA,V.A.J. Biorremediação de solo arenoso contaminado por derrame simulado com benzene, toluene e xileno. **BBR- Biochemistry and Biotechnology Reports**. v.1, n.2, p.39-47, 2012.