

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

TÁLIS PEREIRA MATIAS

**BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DA ATRAZINA EM
DIFERENTES CONDIÇÕES DE OXIRREDUÇÃO**

Poços de Caldas / MG

2019

TÁLIS PEREIRA MATIAS

**BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DA ATRAZINA EM
DIFERENTES CONDIÇÕES DE OXIRREDUÇÃO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Tratamento de Efluentes.

Orientador: Dr. Gunther Brucha.

Coorientadora: Dra. Juliana Kawanishi Braga.

Poços de Caldas / MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca campus Poços de Caldas

M433b Matias, Tális Pereira.

Biodegradação anaeróbia da atrazina em diferentes condições de oxirredução / Tális Pereira Matias. -- Poços de Caldas/MG, 2019.
73 f. –

Orientador(a): Gunther Brucha.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) –
Universidade Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2019.
Bibliografia.

1. Herbicidas. 2. Microbiologia. 3. Agricultura. 4. Biorremediação. I.
Brucha, Gunther. II. Título.

CDD – 628

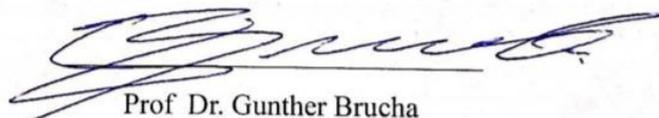
TALIS PEREIRA MATIAS

**BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DA ATRAZINA EM
DIFERENTES CONDIÇÕES DE OXIRREDUÇÃO**

A banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência e Engenharia Ambiental, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Alfenas.

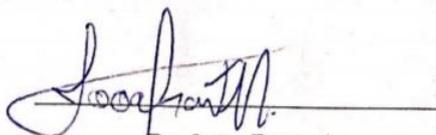
Área de Concentração: Ciência e Engenharia Ambiental.

Aprovada em: 30 de agosto de 2019.



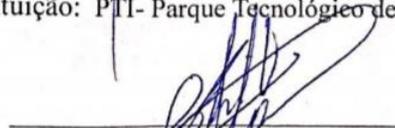
Prof Dr. Gunther Brucha

Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Dr. João Durval

Instituição: PTI- Parque Tecnológico de Itaipu



Prof Dr. Rafael Brito de Moura

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Dedico à Ilúvatar, a minha família, professores, colegas e amigos, pelo apoio, amparo e paciência.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alfenas – Campus Poços de Caldas, ao Instituto de Ciência e Tecnologia desta Universidade pela estrutura e oportunidade oferecida.

À Fundação Parque Tecnológico Itaipu (FPTI/BR), Ciência, Tecnologia e Inovação – C,T+I, pelo financiamento da pesquisa e concessão de bolsa sob nº. 902183/2018, e também pela oportunidade de parceria e apoio durante as pesquisas.

Ao meu orientador Gunther Brucha e coorientadora Juliana Kawanishi Braga pela dedicação e conhecimentos compartilhados com disposição, boa vontade e confiança.

A Simone Benassi, João Durval, Bianca do Amaral e toda a equipe de ITAIPU pelo auxílio e disponibilidade.

Aos colegas de laboratório, professores e amigos do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia Ambiental (PPGCEA) pela ajuda durante a execução das atividades práticas, especialmente à Frecia Maribel e Lívia Verola, pelo companheirismo, amizade e auxílio recíproco durante todo o processo de pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O uso indiscriminado do herbicida atrazina no Brasil e no mundo apresenta diversos efeitos adversos a saúde humana e aos ecossistemas, podendo ser encontrado no solo, nas águas subterrâneas e superficiais, no ar e também nos seres vivos. A biodegradação deste composto pode ocorrer por meio de diferentes condições de oxirredução, com a participação de consórcios microbianos aeróbios e anaeróbios, gerando diferentes intermediários metabólicos de degradação. Por meio de revisão bibliográfica e pesquisa experimental realizada com enriquecimento de microrganismos desnitrificantes, bactérias redutoras de sulfato (BRS) e arqueias metanogênicas, em reatores anaeróbios em diferentes condições de oxirredução (desnitrificantes, sulfetogênicas e metanogênicas) o presente trabalho traz uma explanação sobre os processos de biodegradação da atrazina, destacando os microrganismos detectados na literatura com potencial de degradação deste composto utilizando a atrazina como fonte de carbono e/ou nitrogênio, e os seus intermediários metabólicos formados durante os processos bioquímicos de degradação. A metodologia utilizada no procedimento experimental consiste na realização de dois ensaios distintos, sendo o primeiro chamado de reatores puros anaeróbios (RPA) e o segundo de reatores compostos anaeróbios (RCA). Os dois ensaios se diferenciam quanto ao inóculo utilizado, e às fontes de carbono disponibilizadas nos reatores. Em cada ensaio foram construídos 6 reatores para cada diferente condição de oxirredução, sendo 3 bióticos, 2 abióticos, e 1 branco (controle). Observou-se neste estudo que a remoção da atrazina depende de fatores bióticos e abióticos, podendo ocorrer pelas duas vias, e que fatores físico-químicos como adsorção e hidrólise química podem ter efeitos significativos neste processo. Os resultados dos ensaios apontam que não houve variação de remoção da atrazina entre os diferentes meios de oxirredução, 87% ($\pm 7\%$) para a condição desnitrificantes, 88% ($\pm 7\%$) para a sulfetogênica e 92% ($\pm 7\%$) para a metanogênese, nos reatores bióticos tendo a atrazina e o conteúdo orgânico do solo como únicas fontes de carbono para as bactérias nos reatores. Entretanto a variação dos resultados encontrados nos RCA suplementados com fontes complementares de carbono de acetado para os reatores desnitrificantes, lactato para os sulfetogênicos e acetato e formiato para os metanogênicos, e os reatores sem essa suplementação (RPA), indica que a alta remoção de atrazina (100%) em até 70 dias de análise para os reatores com suplementação deve ser feita em períodos menores de tempo.

Palavras-chave: Herbicidas, Microbiologia, Agricultura, Biorremediação.

ABSTRACT

The indiscriminate use of atrazine herbicide in Brazil and worldwide has several adverse effects on human health and ecosystems, and can be found in soil, ground and surface water, in the air and also in living beings. The biodegradation of this compound can occur through different oxidation conditions, with the participation of aerobic and anaerobic microbial consortia, generating different degradation metabolite intermediates. Through literature review and experimental research performed with enrichment of denitrifying microorganisms, sulfate reducing bacteria (SRB) and methanogenic arches, in anaerobic reactors under different oxidation conditions (denitrifying, sulfetogenic and methanogenic) the present work provides an explanation of the biodegradation of atrazine processes, highlighting the microorganisms detected in the literature with potential degradation of this compound using atrazine as carbon and / or nitrogen source, and its metabolite intermediates formed during the biochemical degradation processes. The methodology used in the experimental procedure consists of two distinct tests, the first called pure anaerobic reactors (PAR) and the second called anaerobic composite reactors (CAR). The two assays differ in the inoculum used and the carbon sources available in the reactors. In each trial 6 reactors were constructed for each different oxidation condition, 3 biotic, 2 abiotic, and 1 blank (control). It was observed in this study that the removal of atrazine depends on biotic and abiotic factors, which may occur in both ways, and that physicochemical factors such as adsorption and chemical hydrolysis may have significant effects on this process. The results of the tests indicate that there was no variation in atrazine removal between different oxidation media, 87% ($\pm 7\%$) for the denitrifying condition, 88% ($\pm 7\%$) for the sulfetogenic and 92% ($\pm 7\%$) for methanogenesis, in biotic reactors with atrazine and soil organic content as the only carbon sources for bacteria in the reactors. However, the variation of the results found in CAR supplemented with complementary sources of acetate carbon for denitrifying reactors, lactate for sulfetogens and acetate and formate for methanogens, and reactors without this supplementation (PAR), indicates that high atrazine removal (100%) within 70 days of analysis for supplemented reactors should be done in shorter time periods.

Key words: Herbicides, Microbiology, Agriculture, Bioremediation.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Fórmula estrutural da Atrazina..... | 14 |
| Figura 2 - Via enzimática mais conhecida de degradação da atrazina..... | 27 |
| Figura 3 - Localização da Bacia Hidrográfica do Paraná III..... | 28 |
| Figura 4 - Pontos de coleta na Sub Bacia Hidrográfica Sanga Memória..... | 32 |
| Figura 5 - Áreas de coleta (a) corresponde ao ponto 1 e (b) ao ponto 2. (c) e (d) correspondem aos respectivos pontos 1 e 2 após a limpeza do local..... | 33 |
| Figura 6 - Procedimento experimental para a construção de todos os reatores anaeróbios..... | 40 |
| Figura 7 - Reatores em descanso antes das retiradas de amostras..... | 42 |
| Figura 8 - Aspecto dos Reatores Puros Desnitrificantes (RPD)..... | 45 |
| Figura 9 - Fração clarificada dos RPD (abaixo)..... | 46 |
| Figura 10 - Consumo de nitrato nos Reatores Puros Desnitrificantes (RPD)..... | 46 |
| Figura 11 - Detecção de atrazina nos Reatores Puros Desnitrificantes (RPD)..... | 47 |
| Figura 12 - Aspecto dos Reatores Puros Sulfetogênicos..... | 48 |
| Figura 13 - Produção de sulfeto nos Reatores Puros Sulfetogênicos (RPS)..... | 49 |
| Figura 14 - Consumo de sulfato nos Reatores Puros Sulfetogênicos (RPS)..... | 49 |
| Figura 15 - Detecção de atrazina nos Reatores Puros Sulfetogênicos (RPS)..... | 50 |
| Figura 16 - Aspecto dos Reatores Puros Metanogênicos (RPM)..... | 51 |
| Figura 17 - Produção de metano nos Reatores Puros Metanogênicos (RPM)..... | 52 |
| Figura 18 - Detecção de atrazina nos Reatores Puros Metanogênicos (RPM)..... | 52 |
| Figura 19 - Reatores Compostos Desnitrificantes no final do ensaio (RCD)..... | 57 |
| Figura 20 - Consumo de Nitrato dos Reatores Compostos Desnitrificantes (RCD)..... | 58 |
| Figura 21 - Detecção de atrazina nos Reatores Compostos Desnitrificantes (RCD)..... | 58 |
| Figura 22 - Aspecto dos Reatores Compostos Sulfetogênicos (RCS)..... | 59 |
| Figura 23 - Produção de sulfeto nos Reatores Compostos Sulfetogênicos (RCS)..... | 60 |
| Figura 24 - Consumo de sulfato nos Reatores Compostos Sulfetogênicos (RCS)..... | 60 |
| Figura 25 - Detecção de atrazina nos Reatores Compostos Sulfetogênicos (RCS)..... | 61 |
| Figura 26 - Reatores Compostos Metanogênicos (RCM)..... | 62 |
| Figura 27 - Produção de metano nos Reatores Compostos Metanogênicos (RCM)..... | 62 |
| Figura 28 - Detecção da atrazina nos Reatores Compostos Metanogênicos (RCM)..... | 63 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Características gerais e propriedades físico-químicas da atrazina..... | 15 |
| Tabela 2 - Resumo funcional de cada gene (Banco de dados uniprot/adaptado)..... | 28 |
| Tabela 3 - Soluções para compor os meios utilizados nos reatores desnitrificantes..... | 35 |
| Tabela 4 - Soluções para compor os meios utilizados nos reatores sulfetogênicos..... | 36 |
| Tabela 5 - Soluções para compor os meios utilizados nos reatores metanogênicos..... | 37 |
| Tabela 6 - Composição dos primeiros reatores anaeróbios de volume líquido de 50 ml (Reatores Puros)..... | 41 |
| Tabela 7 - Composição dos reatores de volume maior (300 ml) feitos com adição de fonte de carbono..... | 42 |
| Tabela 8 - Informações cromatográficas..... | 44 |
| Tabela 9 - Remoção da ATZ nos Reatores Puros Anaeróbios (RPA)..... | 53 |
| Tabela 10 - Presença de deisopropilatrazina (DIA) nos RPA..... | 55 |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 11 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 13 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL..... | 13 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 13 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 14 |
| 3.1 | IMPACTOS DA ATRAZINA NA SAÚDE HUMANA..... | 15 |
| 3.2 | IMPACTOS AMBIENTAIS DA ATRAZINA..... | 16 |
| 3.3 | COMPORTAMENTO AMBIENTAL DA ATRAZINA..... | 17 |
| 3.4 | BIODEGRADAÇÃO DA ATRAZINA..... | 19 |
| 3.4.1 | Biodegradação aeróbia da atrazina | 19 |
| 3.4.2 | Biodegradação anaeróbia da atrazina | 21 |
| 3.4.2.1 | Desnitrificação..... | 22 |
| 3.4.2.2 | Sulfetogênese..... | 22 |
| 3.4.2.3 | Metanogênese..... | 23 |
| 3.5 | INTERMEDIÁRIOS METABÓLICOS DA ATRAZINA..... | 24 |
| 3.6 | CONSÓRCIOS MICROBIANOS..... | 25 |
| 3.7 | ENZIMAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO DA ATRAZINA..... | 26 |
| 3.8 | CONSIDERAÇÕES GERAIS..... | 28 |
| 4 | METODOLOGIA..... | 30 |
| 4.1 | DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO..... | 30 |
| 4.2 | COLETA DAS AMOSTRAS..... | 31 |
| 4.3 | MEIOS DE CULTIVO..... | 34 |
| i. | <i>Procedimento desnitrificantes.....</i> | 35 |
| ii. | <i>Procedimento sulfetogênicos.....</i> | 35 |
| iii. | <i>Procedimento metanogênicos.....</i> | 35 |
| 4.4 | INÓCULO..... | 39 |
| 4.5 | REATORES ANAERÓBIOS E ENRIQUECIMENTO..... | 36 |
| 4.6 | MONITORAMENTO DOS REATORES..... | 43 |
| 4.7 | DETECÇÃO DA ATRAZINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC/UV)..... | 43 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 45 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.1 | REATORES PUROS ANAERÓBIOS (RPA)..... | 45 |
| 5.1.1 | Reatores Puros Desnitrificantes (RPD)..... | 45 |
| 5.1.2 | Reatores Puros Sulfetogênicos (RPS)..... | 48 |
| 5.1.3 | Reatores Puros Metanogênicos (RPM)..... | 51 |
| 5.1.4 | Considerações Gerais sobre os Reatores Puros Anaeróbios (Desnitrificantes, Sulfetogênicos e Metanogênicos)..... | 53 |
| 5.2 | REATORES COMPOSTOS ANAERÓBIOS (RCA)..... | 57 |
| 5.2.1 | Reatores Compostos Desnitrificantes (RCD)..... | 57 |
| 5.2.2 | Reatores Compostos Sulfetogênicos (RCS)..... | 59 |
| 5.2.3 | Reatores Compostos Metanogênicos (RCM)..... | 62 |
| 5.2.4 | Considerações Gerais sobre os Reatores Compostos Anaeróbios (Desnitrificantes, Sulfetogênicos e Metanogênicos)..... | 63 |
| 6 | SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS..... | 64 |
| 7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 65 |
| | REFERÊNCIA..... | 66 |

1 INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos se justifica na melhoria agrícola, sendo a atrazina um herbicida muito utilizado em diversos países pelo mundo. Nos últimos 50 anos de uso desse defensivo agrícola, este destacou-se por seus resultados eficazes no controle de ervas daninhas na lavoura. (CAMPANARI, 2017). Entretanto, os defensivos podem apresentar características danosas aos seres vivos e ao meio ambiente, como é o caso da atrazina, um herbicida amplamente utilizado no Brasil desde meados de 1958, que apresenta toxicidade e outros efeitos adversos à saúde humana e aos ecossistemas (MA et al., 2017; VAIL et al., 2014).

Segundo o Boletim Nacional de Comercialização de Agrotóxicos feito pelo Ibama no ano de 2016, de 2014 a 2016 o consumo de atrazina no Brasil dobrou, passando de 13.911,37 toneladas para 28.615,70 toneladas de ingrediente ativo. Com essa grande quantidade de aplicação em cultivos, a atrazina já foi detectada em áreas degradadas correspondentes a locais de intensa atividade agrícola, nas regiões centrais e sul do estado de Goiás, Mato Grosso e no Rio Paraíba do Sul (RJ) próximo a áreas de lavoura de cana (DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2014). Em 2017, a atrazina ocupou 6º lugar no ranking de ingredientes ativos mais vendidos no Brasil, com 24730,90 toneladas de ingrediente ativo.

Na Bacia Hidrográfica do Paraná 3, a presença de atrazina é alvo de preocupação social e os impactos deste herbicida na saúde humana, por meio da ingestão de águas contaminadas, foi discutido no Plano da Bacia Hidrográfica do Paraná 3 feito em 2014, quando 250 óbitos infantis associados a má formação fetal foram levantados na região. Embora não haja comprovação de ligação direta entre os casos de óbito e a contaminação da água local com atrazina, a presença deste composto em corpos d'água acessíveis a população deve ser tratada com atenção.

A presença deste produto em lençóis freáticos e em outros corpos d'água se justifica pela sua aplicação em altas concentrações (acima daquelas indicadas para cada tipo de cultivo), ao regime intenso de chuvas, aos tipos de solos, topografia, declividade do terreno, e suas propriedades orgânicas. Desta forma, informações sobre a degradação do herbicida atrazina são importantes para lidar com a problemática que envolve este composto (DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2014).

A degradação microbiana da atrazina é bem conhecida em condições aeróbias cuja degradação ocorre sobre a presença de oxigênio molecular como receptor de elétrons utilizando a atrazina como doador de elétrons em processos sequenciais de reações bioquímicas (KABRA et al., 2014; KOLEKAR; PHUGARE; JADHAV., 2014). Todavia, conforme as características

ambientais da região em que este poluente está presente, este composto pode ser lixiviado atingindo zonas mais profundas do solo e águas subterrâneas, onde o potencial de oxirredução é característico de condições anaeróbias (TOMASSONI et al., 2014).

Os poucos trabalhos que relatam a degradação anaeróbia da atrazina (CECILIA; MAGGI 2016; DOUGLASS; RADOSEVICH; TUOVINEN 2014; TUOVINEN et al. 2015;) destacam a dificuldade de microrganismos anaeróbios em degradar este composto, permanecendo assim, uma lacuna no conhecimento necessário para o avanço no tratamento de ambientes anaeróbios impactados com este herbicida.

Portanto, devido aos riscos de impactos ambientais e aos danos potenciais à saúde, medidas que visem a eliminação, mineralização ou degradação da atrazina em subprodutos que representem impactos insignificantes são de extrema importância nos ambientes contaminados com este composto (TOMASSONI et al., 2014).

Diante disso, considerando o uso da atrazina na agricultura e o seu potencial de contaminar solos profundos e águas subterrâneas, o presente trabalho teve como objetivo estudar as principais características da atrazina, trazendo informações sobre a sua biodegradação em diferentes condições de oxirredução, os intermediários metabólicos produzidos durante a biodegradação e os genes que expressam enzimas específicas envolvidas no processo de degradação deste herbicida, por meio de um trabalho integrado composto por revisão bibliográfica e procedimento experimental.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral o estudo da biodegradação da atrazina sob diferentes condições de oxirredução, com ênfase para a desnitrificação, sulfetogênese e metanogênese.

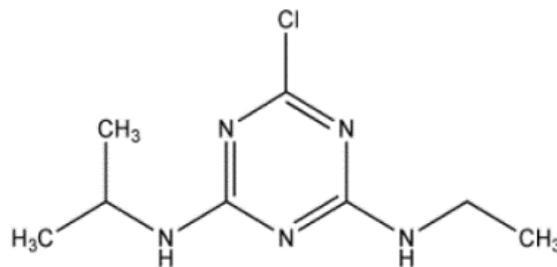
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar um levantamento bibliográfico sobre os principais fatores que envolvem a biodegradação da atrazina;
- b) Realizar enriquecimento microbiano em reatores anaeróbios;
- c) Estudar a atividade microbiana envolvida no processo de degradação da atrazina;
- d) Verificar a ocorrência de degradação da atrazina e formação de intermediários metabólicos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Atrazina (2-cloro-4-(2-isopropilamino)-6-etilamino-1,3,5-triazina) é um herbicida amplamente comercializado no Brasil, especialmente em culturas de milho, soja, cana-de-açúcar e também de gramíneas e outros cultivos, tanto em pré quanto em pós emergência, atuando no controle de ervas daninhas. A fórmula estrutural da atrazina é apresentada na Figura 1, e a Tabela 1 caracteriza a atrazina (LA CECILIA; MAGGI, 2016; MA et al., 2017; TUOVINEN et al., 2015).

Figura 1 - Fórmula estrutural da Atrazina



Fonte: USEPA, 2007.

A família S-triazinas, a qual a atrazina se enquadra, pode ser classificada em três grupos distintos, clorotriazinas, metoxitriazinas e metiltiotriazinas. Estes herbicidas normalmente são sólidos brancos cristalinos, fracamente básicos, com baixa solubilidade em água e alta solubilidade em solventes orgânicos. Normalmente são estáveis na fase sólida e em solução apresentam baixa pressão de vapor em condições mesotérmicas (BONFLEUR, 2010).

A atrazina é um composto polar, estável, em função de seu anel heterocíclico, a sua solubilidade em água praticamente independe do pH, embora em soluções cujo o pH é 2,0 a solubilidade aumente (JAVARONI; LANDGRAF; REZENDE, 2016). Este composto é considerado persistente devido a sua solubilidade moderada e ao seu coeficiente de participação de sorção do solo ser baixo ($K_d = 3,7 \text{ L/kg}$), o que significa que este composto não é facilmente adsorvido pelo solo, sendo considerado móvel (SENE et al., 2010). Portanto essas características definem seu alto potencial de escoamento, hidrólise lenta e adsorção moderada pela matéria orgânica e argila (NEIVERTH, 2015; SILVA, 2014).

Tabela 1 - Características gerais e propriedades físico-químicas da atrazina

| Características Gerais da Atrazina | |
|---|--|
| Ingrediente ativo ou nome comum | Atrazina |
| Nome químico | 6-chloro-N ² -ethyl-N ⁴ -isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamineisopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine |
| Fórmula bruta | C ₈ H ₁₄ ClN ₅ |
| Grupo químico | Triazina |
| Classe | Herbicida |
| Classificação toxicológica | Classe III |
| Modo de ação | Ação seletiva, sistêmica, com atividade residual e foliar. Inibe a fotossíntese (fotossistema II). |
| Massa molecular | 215.68 g/mol |
| Detalhes de formulação e aplicação | Disponível em uma variedade de formulações, incluindo fluidos secos fluidos, líquidos fluidos, líquidos, dispersíveis em água. |
| Solubilidade | 35 mg/L em água (20°C) 24000 mg/L (20°C) Acetato de Etilo |
| Solubilidade em solventes orgânicos | 28000 mg/L (20°C) Diclorometano 400 mg/L (20°C) Tolueno 110 mg/L (20°C) Hexano |
| Ponto de ebulição | Decompõe-se antes de ferver (100°C) |
| Ponto de Fulgor | Não é altamente inflamável |
| Coeficiente de partição octanol-água a pH 7, 20°C | P 5.01 x 10 ⁻² Log P 2,7 (moderado) |
| Densidade aparente | 1,23 g/mL |
| Constante de dissociação pKa (25°C) | 1,7 |
| Pressão de vapor mPa (20°C) | 0,039 (Baixa volatilidade) |
| Índice potencial de lixiviação | 3,20 (Alta lixiviabilidade) |

Fonte: Adaptado de (ANVISA 2016; IUPAC, 2018).

3.1 IMPACTOS DA ATRAZINA NA SAÚDE HUMANA

A União Internacional de Química Pura e Aplicada, no dia 23 de maio de 2018, atualizou a base de dados sobre agroquímicos, e destaca como principais efeitos da atrazina à saúde humana o seu potencial carcinogênico, indução ao coma, colapso circulatório, sangramento

gástrico, insuficiência renal, perturbação no metabolismo da testosterona e problemas endócrinos como a inibição androgênica e o efeito estrogênico fraco.

Já foram detectados efeitos danosos deste herbicida ao ser humano, principalmente nos sistemas endócrino, nervoso central, imunológico e reprodutivo para concentrações entre 5 e 10 µg/L no ambiente (DOUGLASS; RADOSEVICH; TUOVINEN, 2014). Atrazina foi detectada em 4 de 5 pontos de coleta nas águas do Rio Pardo (variando de: 0,16-0,32 µg/L) porém em concentrações abaixo dos limites estabelecidos pela legislação brasileira (2,0 µg/L), mas acima dos níveis permitidos pela União Europeia (0,1 µg/L). Para o valor encontrado, riscos de saúde associados ao contato primário foram excluídos, embora os autores enfatizem que podem haver riscos no caso de ingestão de águas contaminadas (MACHADO et al., 2018).

Para a saúde humana, a toxicidade da atrazina pode ter efeito mutagênico e o contato da atrazina pode ser irritante para o nariz, garganta, pele e os olhos e venenoso, se inalado (CETESB, 2018).

Segundo dados registrados pelo Ministério da Saúde no Brasil (2019), uma em cada quatro cidades do país apresentam agentes químicos na água, em 45 cidades do Sul de Minas a água chega às estações de tratamento contaminada com algum tipo de agrotóxico, em Campinas detectou-se atrazina em água potável em 2019. O Ministério da Saúde reconhece que a exposição aos agrotóxicos é um problema de saúde pública e afirma que cada situação deve ser analisada individualmente considerando o histórico de dados de cada região e dos valores de referência da legislação.

3.2 IMPACTOS AMBIENTAIS DA ATRAZINA

Como mencionado anteriormente a atrazina apresenta diversas propriedades prejudiciais aos ecossistemas e aos seres vivos, pois apresenta toxicidade moderada, efeitos carcinogênicos, mutagênico, teratogênico, podendo causar alterações no desenvolvimento do feto, problemas reprodutivos, e alteração nos nichos ecológicos em consequência desses efeitos adversos. É um poluente orgânico ubíquo, que pode ser encontrado no ar, no solo, e também em águas superficiais e subterrâneas (KOLEKAR; PHUGARE; JADHAV, 2014; ZHANG et al., 2015).

Assim como vários outros agrotóxicos este composto é capaz de inibir a fotossíntese, sendo considerado, por muitos autores como um veneno, e como tal, o seu uso irrestrito pode

gerar a morte de indivíduos, e por consequência perda de biodiversidade e do patrimônio natural (DOUGLASS; RADOSEVICH; TUOVINEN, 2014; OLIVEIRA, 2015; VAIL et al., 2014).

A atrazina também pode ser incorporada e propagada em cadeias tróficas, podendo alterar uma ampla gama de espécies vegetais e animais, levando o ecossistema ao desequilíbrio, além da geração de uma pluma de contaminação, derivada da mobilidade deste composto no solo e em corpos d' água (KANISSERY; SIMS, 2011; KUMAR; PHILIP, 2004). A toxicidade da atrazina para ratos por via oral (DL 50) é de 1.750 mg/kg; 3.080 mg/kg por via cutânea (DL 50): LDLo: 550 mg/kg. Enquanto que para coelhos a via oral de intoxicação (DL 50) é de 750 mg/kg e para a via cutânea (DL 50) é de 7.500 mg/kg enquanto que para organismos aquáticos *Microcystis aeruginosa* o início de inibição da multiplicação celular ocorre a 0,003 mg/L (CETESB, 2018).

3.3 COMPORTAMENTO AMBIENTAL DA ATRAZINA

As características do solo podem afetar a biodegradação deste pesticida, tal como a sua persistência no ambiente, uma vez que variáveis como pH, e umidade interferem nas ligações químicas do solo com o pesticida, tal como a sua adsorção físico-química. Se a atrazina encontra-se adsorvida na fase sólida do solo, ela não está realmente disponível para os microrganismos, que são capazes de metabolizar substâncias apenas na solução do solo, o que aumenta a persistência do poluente no meio, ficando sujeito a processos de lixiviação para as camadas mais profundas do solo sem sofrer os processos de degradação biológica (DOUGLASS; RADOSEVICH; TUOVINEN, 2014; LA CECILIA; MAGGI, 2016; TUOVINEN et al., 2015).

As condições do solo também interferem na movimentação deste micropoluento, a presença de colóides orgânicos no solo contribui para a retenção da atrazina, assim como solos ricos em motmorilomita, mineral 2:1 com maior capacidade de troca de cátions (CTC). Desta forma, solos pobres em matéria orgânica e com baixa CTC apresentam maior suscetibilidade a lixiviação deste herbicida solúvel (ALMEIDA; GUIMARÃES, 2017; SOUZA et al., 2018). Destaca-se ainda que a presença de ácido húmico é responsável por cerca de 70% da capacidade de sorção da atrazina em pH 3,0 (MARTINS et al., 2014).

A atrazina pode persistir nos solos e em águas subterrâneas por décadas, e o seu comportamento no ambiente pode variar conforme o tipo de solo em que ela se encontra, tal

como as condições ambientais, como eventos de precipitação, que podem lixiviar este poluente para as águas subterrâneas e superficiais, temperatura e entre outros parâmetros ambientais capazes de influenciar o seu processo de biodegradação (FURLAN, RG; MARTINS, JF; SANTOS, JI; ALVES, 2016; CECILIA; MAGGI, 2016; SWISSA et al., 2015).

Em um argissolo vermelho-amarelo, após 90 dias de aplicação de atrazina, este composto foi encontrado a 50 cm de solo, em que verificou-se adsorção em função da matéria orgânica disponível. Todavia os riscos de contaminação das águas do subsolo não foram descartadas (MAURO; CAMPOS; LANGENBACH, 2007).

Em ambientes naturais, a meia-vida da atrazina é varia entre 4 e 385 dias em solos, ou mais em aquíferos de solos profundos, podendo variar também entre 10 e 105 dias em águas superficiais, apresentando, em média, uma meia-vida de 4 dias em condições aeróbias (CECILIA; MAGGI, 2016). Outros autores afirmam que a variação da meia-vida da atrazina pode ficar entre dois meses até seis anos, com possíveis variações conforme as condições ambientais e tipo de solo (FURLAN; MARTINS; SANTOS; ALVES, 2016).

A atrazina também possui ampla mobilidade no solo, e devido a sua solubilidade moderada em água, concentrações de até 3 μL já foram encontradas nas águas subterrâneas, valor acima das concentrações contraindicadas para a saúde no Brasil (2 $\mu\text{g/L}$) (SWISSA et al., 2015) O que mostra que a meia vida da atrazina está diretamente associada à parâmetros ambientais.

Quanto mais profunda a camada de solo em que este herbicida se encontra, mais complexo é o seu processo de biodegradação. Todavia, acredita-se que na maioria dos solos a biodegradação seja o principal método de decomposição da atrazina, pois pode ocorrer de forma natural (FREEMAN; THANKI, 2017). Outros processos como a desalogenação química abiótica em solos com pH baixo também pode ocorrer, além de adsorção por compostos de afinidade química no solo com a atrazina (HUNTER; SHANER, 2009).

Devido aos diversos efeitos adversos à saúde e à manutenção dos ecossistemas, a União Europeia como medida de cautela, proibiu o uso deste pesticida em 2004. Entretanto, em países como China, Austrália e Brasil, este herbicida ainda é amplamente comercializado (CECILIA; MAGGI, 2016). Como no Brasil os órgãos regulamentadores estabelecem que os níveis de atrazina em água doce não devem ser superiores a 2,0 $\mu\text{g/L}$ (CONAMA, 2005), isso justifica a importância do controle quantitativo deste micropoluento e da sua degradação em compostos inofensivos à saúde e ao meio ambiente (NEIVERTH, 2015).

3.4 BIODEGRADAÇÃO DA ATRAZINA

Em uma determinada área contaminada, os microrganismos nativos podem desenvolver a capacidade de degradar contaminantes. Entretanto, é possível que haja a necessidade de projetos específicos de engenharia para promover condições favoráveis aos processos biológicos e obter melhores resultados em um intervalo de tempo menor, uma vez que a biodegradação pode ser afetada por processos intrínsecos e extrínsecos de cada microrganismo de metabolizar substâncias (BERTICELLI et al., 2016; GARGOURI et al., 2015; RODR, 2015).

A atrazina pode ser utilizada como fonte de carbono e/ou nitrogênio pelos microrganismos que apresentam capacidade em degradar este composto (ARIOLE; ABUBAKAR, 2015). Desta forma o processo de biodegradação pode ser feito por um consórcio de microrganismos, tanto aeróbios como anaeróbios (utilizando diferentes receptores de elétrons) (ADRIAN; SUFLITA, 1990; AHARON; FU, 2000; ALMEIDA; GUIMARÃES, 2017).

A biodegradação deste herbicida pode variar conforme a sua localidade e as condições de oxirredução do meio ao qual está inserido. Com o aumento da profundidade do solo, ocorre uma diminuição da concentração de oxigênio resultando em diferentes potenciais de oxirredução o que favorece o metabolismo de diferentes grupos de microrganismos (anaeróbios redutores de nitrato, de ferro, de sulfato e metanogênicos) (KOLEKAR; PHUGARE; JADHAV, 2014; CECILIA; MAGGI, 2016; QUEIROZ; MONTEIRO, 2000; VAIL et al., 2014).

Sabe-se que a degradação aeróbia da atrazina que ocorre nas regiões mais aeradas do solo é favorecida, uma vez que com o aumento da profundidade do solo e conseqüentemente a formação de zonas anaeróbias, essa degradação tende a diminuir em função de características cinéticas e termodinâmicas dos processos anaeróbios, o que frisa a importância de estudar a biodegradação da atrazina nestas condições (LA CECILIA; MAGGI, 2016; TUOVINEN et al., 2015).

3.4.1 Biodegradação aeróbia da atrazina

Os processos aeróbios consistem no uso de um doador de elétrons em que o receptor final de elétrons é o oxigênio, e o processo se completa com a geração de dióxido de carbono

(estado mais oxidado do carbono) e água. Nos processos metabólicos durante catabolismo microbiano ocorre a degradação de compostos orgânicos utilizados como fonte de carbono (doador de elétrons), e durante o anabolismo ocorre a produção de biomassa.

Dentre os microrganismos aeróbios degradadores de atrazina destacam-se os gêneros *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Nocardia* (TOMASSONI et al., 2014).

Os microrganismos nas camadas mais profundas de solo são menos abundantes do que nas camadas superficiais, e são desfavorecidos pelos parâmetros cinéticos dos processos anaeróbios (VAIL et al., 2014). Entretanto, a atrazina pode estar presente em várias camadas de solo. Em camadas entre 0-90 cm de solo já verificou-se a atividade de degradação da atrazina predominante em condições aeróbias, com degradação média de 75% (0-15 cm) sobre 65% nas camadas profundas (0,75-90 cm) considerando 0,123 μmol de atrazina (TUOVINEN et al., 2015).

Em estudo com *Rhodococcus sp*, isolada de solo contaminado com Atrazina, Kolekar et al., 2014 relataram 75% de degradação da Atrazina na concentração de 30 mg/L. *Ensifer sp*. apresentou eficiência média de degradação: 54,3% a 25°C, 99,7% a 30°C e 84,7% a 35°C, e é ideal sob condições neutras a ácidas (pH 5, 91,5%; pH 7, 99,7%; pH 9, 91,7%), bem como baixas velocidades de agitação 100 rpm (99,4%) e 180 rpm (99,71%) (MA et al., 2017). Verificou-se também que a eficiência de degradação da atrazina com base na temperatura, sendo a degradação da atrazina a 30 °C melhor do que a 25 °C e 35 °C.

A degradação da atrazina também já foi estudada em biofiltros, em que a biodegradação pelo biofilme ligado à um tecido de fibras de vidro e à folha de PET têxtil atingiu 100% em 6 horas, enquanto a biodegradação pelo biofilme ligado a cinza de carvão chegou a $69 \pm 4\%$ em 8 horas (SWISSA et al., 2015).

Após 48h de incubação, para 1000 mg/L de atrazina utilizada como fonte de carbono, foi detectado 80% degradação deste composto pela ação de *Rhodococcus sp* que foram isolados à 30°C (FAZLURRAHMAN et al., 2009).

Embora a atrazina apresente alto potencial de degradação em condições aeróbias, este composto pode ser facilmente lixiviado para camadas mais profundas de solo, dependendo assim, da atividade metabólica de microrganismos anaeróbios para o seu processo de biodegradação. A seguir abordar-se-á os aspectos envolvidos na biodegradação anaeróbia da atrazina.

3.4.2 Biodegradação anaeróbia da atrazina

A biodegradação anaeróbia é um processo que resulta na transformação de constituintes orgânicos biodegradáveis em moléculas mais simples, como metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2), além de subprodutos em solução aquosa, como amônia, sulfetos e fosfatos (FEIJOO et al., 2018). Este processo é realizado por uma diversidade de microrganismos, em reações bioquímicas sequenciais conhecidas como: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (BATSTONE et al., 2002; BOUALLAGUI et al., 2005; YEN; BRUNE, 2007).

O processo de biodegradação anaeróbia da atrazina, apresenta comportamento cinético inferior ao das condições aeróbias, entretanto, esse processo não é impedido nas camadas mais profundas de solo, e pode ocorrer através do uso de diferentes receptores de elétrons, como o dióxido de carbono (CO_2), nitrato (NO_3^-) e sulfato (SO_4^{2-}) (DOUGLASS; RADOSEVICH; TUOVINEN, 2014; FREEMAN; THANKI, 2017).

A biotransformação da atrazina foi afetada pelas condições redox de um solo contaminado, coletado de um riacho próximo à um plantio de cana-de-açúcar sob o uso de atrazina nas planícies do rio Mississippi, em que a taxa de biotransformação da atrazina foi extremamente rápida no solo oxidado. A concentração de atrazina caiu de aproximadamente 70 $\mu\text{g/g}$ de solo para níveis não detectáveis após duas semanas de incubação, enquanto que a biotransformação da atrazina foi consideravelmente mais lenta nos solos mantidos sob condições anaeróbias, variando de uma concentração inicial de atrazina de 70 $\mu\text{g/g}$ de solo para 9 $\mu\text{g/g}$ atrazina após 99 dias (87% de degradação), o que destaca uma degradação mais favorável em condições aeróbias (DELAUNE et al., 1997).

Estudos mais recentes mostram a resistência de degradação da atrazina em zonas anaeróbias. Um trabalho realizado por Bertelkamp (2018) não verificou a degradação deste herbicida em condições mais reduzidas (BERTELKAMP et al., 2018). Todavia, a degradação anaeróbia da atrazina (100 mg/L) já foi verificada a 35° C por *Pseudomonas sp.* (82,67%) seguida por *Bacillus sp.* (75,33%) e *Micrococcus sp.* (69,33%) ao final de 30 dias com amostras de águas lólicas contaminadas com o herbicida utilizado como única fonte de carbono e nitrogênio (ARIOLE; ABUBAKAR, 2015).

O uso da atrazina como fonte de nitrogênio já foi reportado em trabalho realizado na Nova Zelândia, em que os autores isolaram *Arthrobacter nicotinovorans* do solo contaminado com atrazina mantendo as condições de cultivo a 25°C, suplementação com citrato de sódio como fonte de carbono e 1000 mg/L de atrazina como fonte de nitrogênio. Os autores observaram a degradação de 45,9% da atrazina em 6 meses (AISLABIE et al., 2018).

Os microrganismos envolvidos na biodegradação da atrazina em condições anaeróbias podem utilizar este composto como fonte de carbono/ doador de elétrons no seu processo de respiração anaeróbia, e diferentes compostos inorgânicos podem ser utilizados como receptores de elétrons, dentre os quais destacam-se os que serão discutidos nos próximos tópicos: nitrato, sulfato e dióxido de carbono.

3.4.2.1 Desnitrificação

Sobre condições de redução de nitrato, os microrganismos utilizam o nitrato (NO_3^-) como receptor de elétrons para a degradação da atrazina. Primeiramente o nitrato (NO_3^-) é reduzido a nitrito (NO_2^-), e o processo se completa com a desnitrificação até nitrogênio gasoso (N_2), passando ainda pelas formas de NO e N_2O , antes de atingir a forma inerte (CHEN et al., 2016).

O contexto histórico de estudos sobre a degradação da atrazina em condições de redução de nitrato já observaram fenômenos de desalogenação hidrolítica da atrazina, sendo convertida a hidroxilado que é degradado mais facilmente em regiões submersas sob atmosfera de N_2 (ADRIAN; SUFLITA, 1990). Esses processos são mediados por consórcios bacterianos, e podem ser verificados pela liberação de N_2 pelo processo de desnitrificação, envolvendo a formação de intermediários metabólicos como a hidroxiatrazina (MANDELBAUM; WACKETT; ALLAN, 1993)

Quanto às condições de pH e temperatura em meios de redução de nitrato, faixas de pH entre 5,5 e 8,5 se mostraram favoráveis ao processo de degradação, enquanto que temperaturas abaixo de 7°C limitaram a degradação (MANDELBAUM; WACKETT; ALLAN, 1993) e temperaturas mais elevadas entre $15 - 30^\circ\text{C}$ favorecem a cinética microbiana, em que já foi observada a biodegradação da atrazina (100 mg/L) por *Clostridium michiganese* após 4 dias de incubação (MANDELBAUM; WACKETT; ALLAN, 1993).

3.4.2.2 Sulfetogênese

O enxofre, assim como o nitrogênio é um nutriente essencial à vida, e pode apresentar-se na natureza através de sulfetos metálicos, gesso (CaSO_4) e depósitos de enxofre elementar (DENNIS, 2015; LIN et al., 2017). É responsável pela mineralização de 50% das moléculas de

carbono em sedimentos marinhos, atuando como doador de elétrons em processos aeróbios ou como receptor de elétrons em condições anaeróbias (BOWLES et al., 2014). Entretanto, poucos trabalhos abordam sobre a degradação da atrazina em condições de redução de sulfato. Todavia o sulfato (SO_4^{2-}), que é a forma mais oxidada do enxofre, também pode ser utilizado como receptor de elétrons nos processos anaeróbios, enquanto que na sua forma S^{2-} encontra-se no seu estado mais reduzido, destacando-se, portanto, como um possível doador de elétrons (CAO et al., 2014; QIAN et al., 2017).

A redução de sulfato (SO_4^{2-}) ocorre através da ação de bactérias redutoras de sulfato (BRS) que utilizam o SO_4^{2-} como receptor de elétrons (CAO et al., 2014; DANG; LOVELL, 2016; POUS et al., 2018; QIAN et al., 2017). Ocorrendo o processo de redução de sulfato, pode haver formação de sulfetos, que deixam o meio com uma coloração escura.

Quando submetida a estas condições, a atrazina pode ser metabolizada pelas BRS como doadora de elétrons para os processos anaeróbios que envolvem a redução de sulfato, sofrendo degradação até atingir formas menos impactantes aos sistemas naturais, entretanto não são encontrados trabalhos recentes que avaliem a degradação da atrazina sobre estas condições de oxirredução. Deursen (2016) estudou a degradação de outros pesticidas sobre essa condição de oxirredução e destaca que este é um processo lento, e que sobre estas condições a degradação de pesticidas (2,4,D, BAM, MCPP) foi praticamente insignificante. (FREEMAN; THANKI, 2017; HARDISON et al., 2015).

3.4.2.3 Metanogênese

O processo metanogênico é realizado através de um grupo muito especializado de microrganismos, as arqueias metanogênicas, que apresentam maior sensibilidade a choques orgânicos do que as bactérias que participam das etapas anteriores dos processos anaeróbios: hidrólise, acidogênese e acetogênese (VILCÁEZ, 2017; WANG et al., 2015). Esta etapa consiste na conversão de acetato e H_2 em metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2) (WILKIE et al., 1986). As arqueias utilizam um número limitado de substratos: acetato, H_2/CO_2 , fórmico, metanol e metilaminas (YAMADA et al., 2014a). E para o equilíbrio deste processo é necessário baixas pressões de H_2 (YAMADA et al., 2014b).

Sobre condições metanogênicas o processo de biodegradação implica na formação de metano (CH_4), e os microrganismos envolvidos utilizam dióxido de carbono (CO_2) dissolvido

no líquido como receptor de elétrons para a degradação da atrazina. Em condições metanogênicas já verificou-se maior recalcitrância da atrazina à biodegradação (GU; FAN; GU, 2003). A operação de reatores anaeróbios exige condições operacionais e ambientais que favoreçam a atividade metanogênica, tendo em vista que o objetivo principal desse processo é a degradação do herbicida atrazina (BATSTONE; LU; JENSEN, 2015).

Na literatura não são encontrados trabalhos específicos que retratem o processo de biodegradação da atrazina pela ação de arqueias metanogênicas, incluindo a sua abordagem sobre o uso da atrazina como fonte de carbono ou nitrogênio, o que frisa a importância de pesquisas nesse aspecto, uma vez que há possibilidade de biodegradação da atrazina nessas condições.

3.5 INTERMEDIÁRIOS METABÓLICOS DA ATRAZINA

Melhores resultados nas taxas de degradação da atrazina vem sendo estudados com mais ênfase a partir da década de 90, em que estudos sobre a atividade microbiana acerca deste micropoluinte destacam que processos combinados de degradação aeróbia e anaeróbia apresentam maior eficiência nos ambientes naturais, considerando a lixiviação da atrazina de uma camada aeróbia para camadas mais profundas, em condições anaeróbias, sendo submetida a uma série de processos físico-químicos paralelos a degradação biológica (BEHKI et al., 1993; SOUZA et al., 1998).

São poucos os microrganismos capazes de mineralizar completamente a atrazina. Entretanto, a degradação da atrazina já foi observada pela ação de *Pseudomonas* sp. (87% p/ 100 mg/L de atz) (CECILIA; MAGGI, 2016; VAIL et al., 2014), e de *Rhodococcus* sp. utilizando a atrazina como fonte de carbono e energia, com geração de intermediários menos tóxicos como o N-isopropylammilide (KOLEKAR; PHUGARE; JADHAV, 2014).

Outros metabólitos da degradação da atrazina foram identificados por cromatografia em camada delgada. Foram observados, nas frações desorvidas, hidroxiatrazina (44%), desisopropilatrazina (3,28%) e atrazina (52,72%) e nas frações extraídas, hidroxiatrazina (16,22%), desisopropilatrazina (2,25%), desetilatraxina (2,24%) e atrazina (79,29%) (QUEIROZ, B. P. V.; MONTEIRO, 2000). E os mesmos autores frisam que a mineralização da atrazina foi beneficiada pela alternância de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) de dias e noites durante o período de 150 dias de incubação.

Usando a levedura *C. laurentii* a degradação da atrazina chegou a 100% em 9 dias sendo as melhores condições de crescimento foram encontradas em pH 7, 30°C e 120 rpm, para 150 mg/L de atrazina (ABIGAIL; LAKSHIMI; DAS, 2012). Por meio de análise por GC-MS Estes mesmos autores detectaram a formação de quatro metabólitos oriundos da degradação da atrazina por meio de GC-MS: hidroxitrazina, deetilatrazina, deisopropilpirazina e deetildeisopropilatrazina.

As interações entre os elementos bióticos e abióticos do solo com a atrazina formam intermediários como hidroxiatrazina, deetilatrazina, deisopropilatrazina, nisopropilammilida, N-etilaminilida e ácido cianúrico. A deisopropilatrazina e a deetilatrazina também já foram encontradas após 1 ano de aplicação da atrazina (KOLEKAR; PHUGARE; JADHAV, 2014).

A formação de intermediários metabólitos da atrazina pode, portanto, variar pela influência de condições ambientais e de grupos microbianos que atuam em sua biodegradação, sendo importante compreender as relações microbiológicas que interferem neste processo.

3.6 CONSÓRCIOS MICROBIANOS

A mineralização da atrazina não ocorre pela ação exclusiva de uma espécie microbiana, este processo necessita de diversidade biológica, com a participação de microrganismos aeróbios e anaeróbios. Os consórcios microbianos de degradação da atrazina em ambientes aeróbios e anaeróbios foram observados por trabalhos que encontraram organismos do gênero *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Rhizobium*, *Escherichia coli.*, *Nocardia sp.* (GIARDI; GIARDINA; FILACCHIONI, 2014; SOUZA et al., 1995; YANZE-KONTCHOU; GSCHWIND, 1994).

A degradação da atrazina por microrganismos anaeróbios de cultura mista também já foi confirmada no processo co-metabólico, com concentrações de atrazina de 15 mg/L chegando até 95% de degradação (KUMAR; PHILIP, 2004). Outros estudos também mostram que a biodegradação da atrazina pode ser promovida em solos insaturados, por meio de técnicas de bioaumentação, favorecidas pelas interações naturais da diversidade microbiana presente no solo contaminado (JENKINS, 2015).

Outros trabalhos observam espécies como *Acinetobacter spp.*, *Aerobacterium sp.*, *Microbacterium sp.*, *Bacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Deinococcus sp.*, e *Delftia acidovorans*, bem como consórcios de espécies *Agrobacterium tumefaciens*, *Caulobacter crescentus*,

Pseudomonas putida, *Sphingomonas yanikuyae*, *Nocardia sp.*, *Rhizobium sp.*, *Flavobacterium oryzihabitans* e *Variovorax paradoxos* em ambientes contaminados com atrazina (BATSTONE et al., 2002; BEHKI et al., 1993; BOE et al., 2017; CHEN et al., 2016; JAVARONI; LANDGRAF; REZENDE, 2016; JENKINS, 2015; KUMAR; PHILIP, 2004; NEIVERTH, 2015; OLIVEIRA, 2013). Estes microrganismos apresentam potencial de degradação da atrazina por meio de seus processos metabólicos, principalmente *Pseudomonas sp.*, que atingem valores mais altos de degradação, em torno de 80 a 90% (100mg/L de atrazina) em condições mesofílicas, (ARIOLE; ABUBAKAR, 2015).

Em trabalhos abordando diferentes tipos de manejo de solos contaminados com atrazina, foram encontrados 56 gêneros de bactérias e arqueias com potencial para degradação do herbicida atrazina, divididos em 178 espécies e destas, 43 foram comuns a todos os tipos de manejos e 135 espécies diferentes entre os solos, dentre as quais destacam-se as que foram citadas no parágrafo anterior (CAMPANARI, 2017).

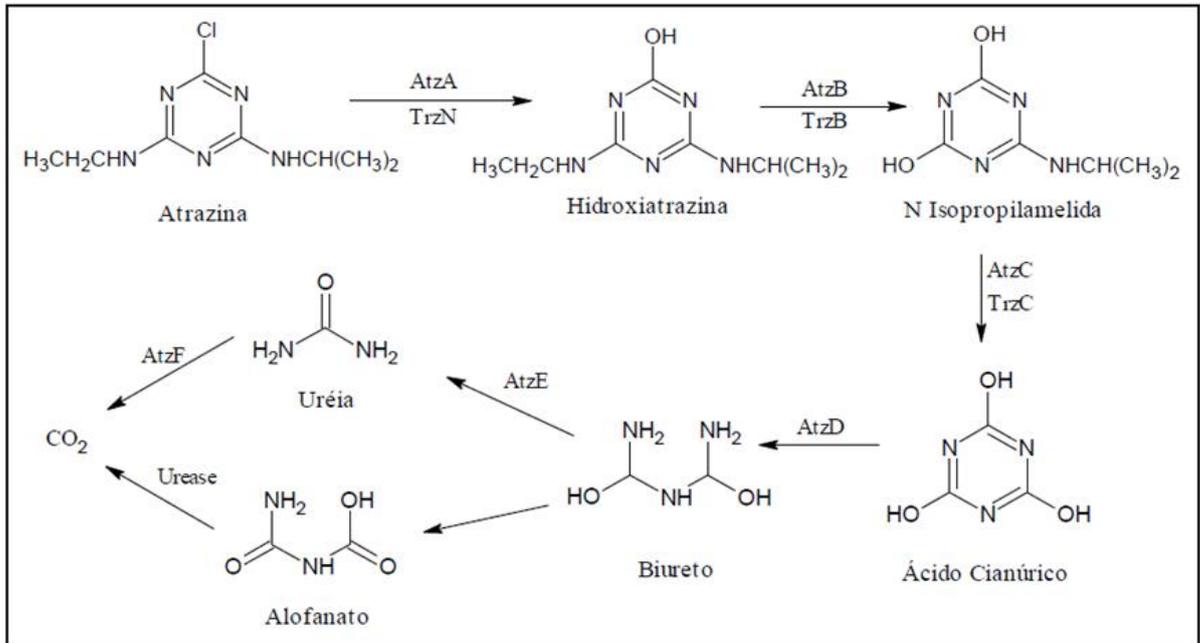
3.7 ENZIMAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO DA ATRAZINA

A biodegradação da atrazina também pode ocorrer pela ação enzimática, que baseia-se na ação de um catalisador biológico sobre o herbicida. As enzimas redox ou oxireductases catalisam as reações de oxirredução, e estão incluídas nessa classe as hidrogenases, oxidases, peroxidases e hidroxilases (BALESTEROS, 2009). Os produtos dos genes *atzA*, *atzB*, *atzC* são responsáveis pela remoção do cloro e dos resíduos de isopropilamina e etilamina para produzir ácido cianúrico, que é convertido a NH_3 e CO_2 pela ação das enzimas decodificadas pelos genes *atzD*, *atzE* e *atzF* (FERNANDES, 2014).

A proteína relativa ao gene *trzD* é um análogo metabolizador considerado mais eficiente na metabolização da atrazina, por meio de uma rápida conversão em ácido cianúrico catabolizante na primeira parte da via de degradação. Outro gene que participa da degradação da atrazina é o gene *trzN*, que é considerado parte da família das amidohidrolases atuando na degradação da atrazina, possuindo, entretanto, uma diversidade mais ampla de substratos. Por esse motivo, estima-se que este gene está se tornando mais disperso em relação ao gene *atzA* (ACCEPTS; SOCIETY; RESERVED, 2014; CAMPANARI, 2017). A Figura 2 mostra a via

mais conhecida de degradação da atrazina e os genes que expressam enzimas são sintetizados na Tabela 2.

Figura 2 - Via enzimática mais conhecida de degradação da atrazina



Fonte: (SENE et al., 2010).

Tabela 2 - Resumo funcional de cada gene (Banco de dados uniprot/adaptado)

| Funções dos genes que expressam enzimas na biodegradação da atrazina | | |
|---|---|---|
| Gene | Proteína | Função |
| atzA | Atrazina clorohidrolase | Descloração da atrazina para HA |
| atzB | Hidroxidecloroatrazina etilaminohidrolase | Catalisador da reação de desaminação de HA para N-isopropilamelida |
| atzC | N-isopropilamelida isopropilamidohidrolase | Conversão de N-isopropilamelida para ácido cianúrico e isopropilamina |
| atzE | Biureto hidrolase | Hidrolisa biureto em alofanato e amônia |
| atzF | Alofanato hidrolase | Hidrolisa alofanato em amônia e gás carbônico |
| ipuC | Glutamato-isopropilaminaligase | Envolvida na degradação de isopropilamina, constituinte da atrazina |
| ipuF | Gama-glutamil-L-1-hidroxiisopropilamida hidrolase | Envolvida na degradação de isopropilamina |
| tchE | Metanol:N,N-dimetil-4-nitrosoanilina oxidoreductase | Catalisa a oxidação de metanol e formação de formaldeído |
| triA | Melamina deaminase | Desloca agrupamentos amina de melamina e aminoatrazina. |
| trzD | Amidohidrolase de ácido cianúrico | Cliva o anel s-triazina e ácido cianúrico, produzindo dióxido de carbono e biureto. |
| gatA | Biuretohidrolase e amidase (predita) | Mesma função de atzE |

Fonte: Adaptado: Banco de dados uniprot, 2018.

3.8 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A biodegradação é uma alternativa eficiente na remoção da atrazina dos ambientes naturais, que pode utilizar os microrganismos nativos do próprio ambiente contaminado para realizar este processo, que se dá por meio de reações bioquímicas sequenciais regidas por consórcios microbianos. A obtenção de informações sobre os processos de biodegradação da atrazina em diferentes condições de oxirredução pode ser utilizada para a tomada de decisão em projetos ambientais que visem a mineralização deste composto, ou, ao menos a sua degradação em intermediários metabólicos menos tóxicos, visando a proteção do solo, das águas superficiais e subterrâneas, bem como da saúde pública. Além disso, foi possível verificar

que a biodegradação da atrazina é favorecida em condições aeróbias, podendo ocorrer em anaerobiose, embora com menor eficiência.

O conhecimento de dados qualitativos e quantitativos da biodegradação da atrazina, que contempla os processos aeróbios, anaeróbios e enzimáticos, pode auxiliar na tomada de decisões regulatórias, no aumento da fiscalização do produto agrícola cujo uso está em alta e na autorização de estudos e pesquisas para registro de alternativas menos impactantes para lidar com problema. A análise de dados referentes a estas substâncias também permite um maior embasamento para estudos de contaminação nas águas superficiais e subterrâneas e de efeitos adversos à fauna e a flora (CHIARELLO et al., 2016).

Considerando as propriedades de solubilidade da atrazina e potencial de lixiviação para camadas mais profundas de solo, são necessários estudos que discorram sobre a degradação biológica da atrazina em ambiente anaeróbio, haja vista a escassez de trabalhos nessas condições, principalmente envolvendo condições metanogênicas e sulfetogênicas. Em função da complexidade molecular da atrazina, ela sofre degradação biológica apenas pela ação de consórcios microbianos e uma ampla diversidade enzimática, que deve ser mais explorada para a obtenção de informações relevantes para lidar com o problema de áreas contaminadas com atrazina.

É importante que mais estudos sobre as diferentes rotas de degradação da atrazina sejam realizados, para buscar métodos de tratamento biológico, visando manter a qualidade dos solos e das águas subterrâneas expostos a este herbicida. Desta forma, o procedimento experimental desenvolvido neste trabalho visa verificar a remoção de atrazina em condições anaeróbias distintas, desnitrificantes, sulfetogênicas e metanogênicas, usando como inóculo solo com histórico de aplicação de atrazina na região da Bacia Hidrográfica do Paraná III.

4 METODOLOGIA

4.1 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

A área de estudo corresponde a Bacia Hidrográfica Paraná 3 – Paraná (BP3), e foi escolhida em função da intensa utilização de pesticidas na região, com destaque para a atrazina devido à extensão do plantio de milho e soja na região, que apresenta uma taxa de ocupação agrícola de 80% a 90% (PBHP3,2014).

A BP3 está localizada na mesorregião Oeste do Paraná, entre as latitudes 24° 01' S e 25° 35' S e as longitudes 53° 26' O e 54° 37' O, com área de aproximadamente 8000 km² englobando 28 municípios, delimitada ao norte pela bacia do rio Piquiri e ao sul pela bacia do rio Iguazu (PBHP3,2014).

A BP3 apresenta intensa atividade agrícola, clima subtropical úmido, precipitação média anual de 1600 a 2000 mm e as taxas de evapotranspiração média anual encontram-se entre 1000 a 1200 mm, Floresta Estacional Semidecidual e geologia formada por rochas basálticas de origem vulcânica fissural definidas como formação serra geral. As águas dos basaltos mostram uma forte tendência ácida (pH entre 5,5 e 6,5) e mineralização total inferior a 300 mg/L, são tipicamente cálcicas e cálcio-magnesianas, sulfatadas ou cloretadas sódicas (PBHP3,2014).

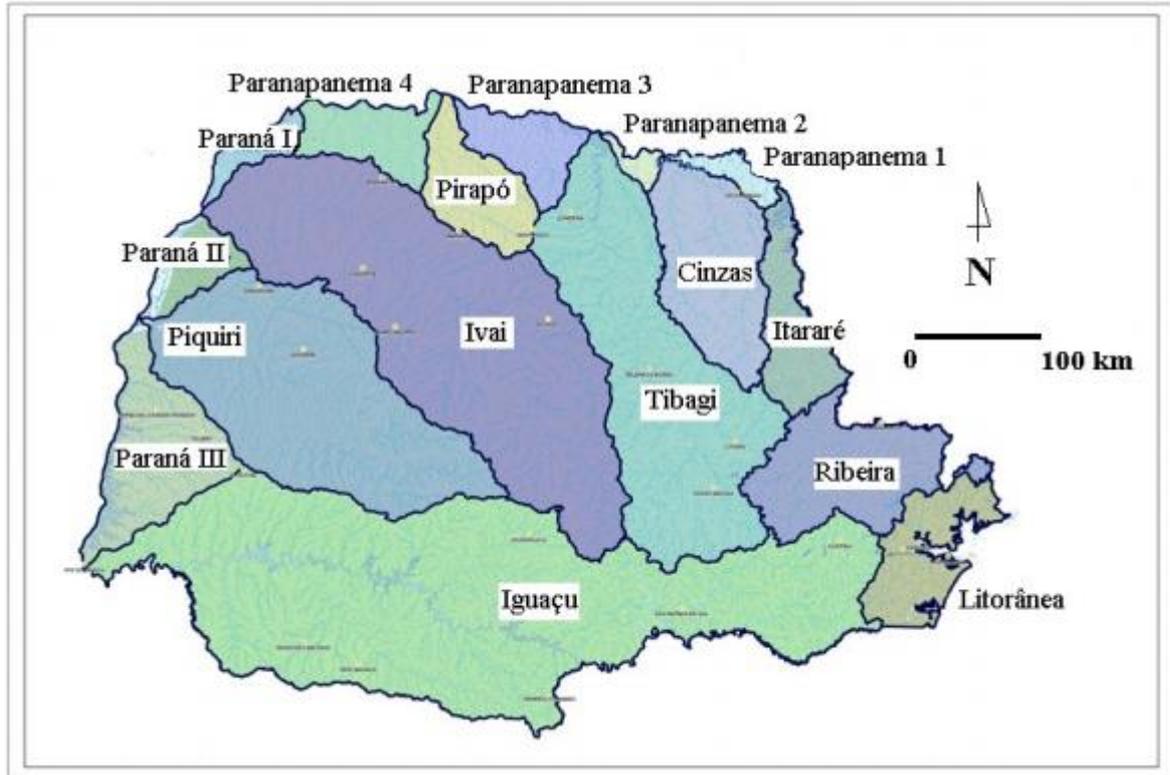
As amostras foram coletadas nas microbacias Esquina Sangas Memória I e II, localizadas na sub-bacia do rio São Francisco, apresentando uma área 102,79 e 71,69 ha, respectivamente (PBHP3,2014).

A microbacia Esquina Memória I é composta por 50,3% Latossolo Vermelho Distroférico típico e 49,7% Nitossolo Vermelho de Eutroférico típico, apresentando uso e ocupação do solo de 95,92% para agricultura, 0,14% de edificações, 1,12% por estradas, 0,30% de pastagem, 0,12% composto por capoeira rala e 2,40% protegido por floresta (PBHP3,2014).

A sanga Esquina Memória II possui 82,5% do solo tipo Latossolo Vermelho Distroférico típico e 17,6% Nitossolo Vermelho de Eutroférico típico. Com uso e ocupação do solo distribuídos em 95,14% para agricultura, 0,57% de estradas, 0,19% de edificações, 0,82% de pastagem, 0,51 coberto por capoeira rala e 2,85% de floresta (PBHP3,2014).

Devido a intensa atividade agrícola nessas duas microbacias e a detecção de atrazina, elas se destacam para o estudo da biodegradação deste pesticida. A Figura 3 mostra o mapa referente a localização desta bacia hidrográfica.

Figura 3 – Bacias do estado do Paraná

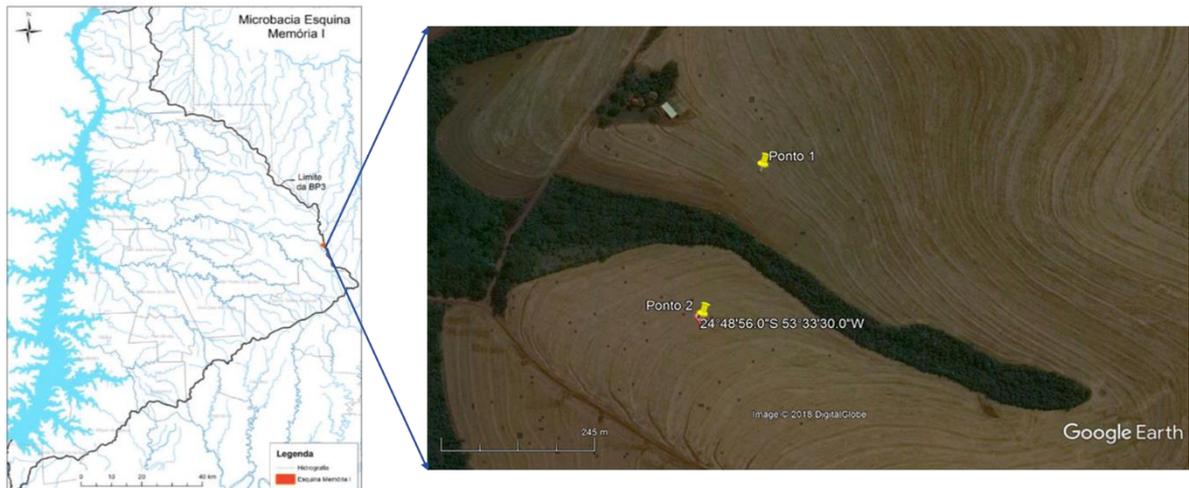


Fonte: (PBHP, 2014).

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de solo foram coletadas no dia 14/09/2018, em dois pontos (Figura 4) da sub Bacia Hidrográfica Sanga Memória em camadas de 1.65, 1.75, 1.85 e 1.95m de profundidade, armazenadas sobre refrigeração (caixa térmica com gelo) e transportadas até o laboratório da Universidade Federal de Alfenas – (UNIFAL-MG).

Figura 4 - Pontos de coleta na Sub Bacia Hidrográfica Sanga Memória



Fonte: Adaptado de Itaipu (2016) e Imagem: Google Earth.

As amostras foram coletadas sobre condições atmosféricas úmidas, em dia ensolarado, com temperaturas acima de 20°C. O solo apresentava aspecto argiloso nas camadas logo abaixo de 20 cm, e nas camadas superiores encontrava-se com aspecto mais seco com pequenos agregados, com pouca coesão.

Foram feitas perfurações no solo por meio de perfurador espiral do tipo parafuso, e a área foi limpa com o auxílio de inchadas e pás. A Figura 5 mostra as condições do terreno no dia da coleta, em que pode-se perceber uma ampla cobertura de palha residual. Para a retirada das amostras essas camadas de palhas secas foram retiradas, para evitar que caíssem na cova e fossem incorporadas às amostras.

Figura 5 - Áreas de coleta **(a)** corresponde ao ponto 1 e **(b)** ao ponto 2. **(c)** e **(d)** correspondem aos respectivos pontos 1 e 2 após a limpeza do local



Fonte: Do autor.

4.3 MEIOS DE CULTIVO

Com a finalidade de compor os meios de cultivo para o crescimento dos microrganismos específicos em cada condição de oxirredução, algumas soluções de macro e micronutrientes foram preparadas a partir do protocolo de Deursen (2016).

Inicialmente, as vidrarias que foram utilizadas para a montagem das diferentes soluções foram lavadas com Extran, aclimatadas com água destilada e colocadas para secar em estufa a 60 °C. A bancada foi esterilizada com álcool 70% e todo o material utilizado foi manipulado próximo ao bico de bunsen.

Os elementos que compunham cada solução foram pesados e diluídos em água anaeróbia preparada por aquecimento em chama sob fluxo de N₂ (por 20 minutos), e em seguida foram esterilizados por autoclave (por 20 minutos a 120°C), com exceção das soluções de vitaminas, que foram esterilizadas por filtração empregando membranas de 0,22 mm sob sistema de bombeamento a vácuo.

Para as soluções que apresentaram problemas de solubilização, utilizou-se um agitador magnético, e o pH foi corrigido quando necessário, aproximando-o do neutro.

Após a esterilização das soluções, as mesmas foram guardadas no refrigerador, e as soluções de vitaminas revestidas com papel alumínio, para evitar fotodegradação. Destaca-se que todo o material vinculado ao preparo das soluções de vitaminas foi esterilizado antes de entrar em contato com essas substâncias.

Para a determinação da massa a ser medida de cada substância utilizou-se a equação (1).

$$P(g) = vol(L) \cdot M \left(\frac{g}{mol} \right); \quad (1)$$

Em que: P é o peso em gramas que foi aferido na balança analítica; vol é o volume em litros, e M a massa molar.

As soluções estoque de macro e micronutrientes utilizadas para cada condição de oxirredução estão listadas nas Tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3 - Soluções para compor os meios utilizados nos reatores desnitrificantes

| | Soluções | Volume (L) | Peso (g) |
|-----|---|------------|----------|
| D1 | KH ₂ PO ₄ | 0,500 | 17,418 |
| D2 | Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O | 0,250 | 7,801 |
| D3 | Resazurin | 0,050 | 0,025 |
| | EDTA | | 0,063 |
| | FeSO ₄ .7H ₂ O | | 0,006 |
| | MnCl ₂ .6H ₂ O | | 0,006 |
| D4 | CoCl ₂ .4H ₂ O | 0,25 | 0,002 |
| | ZnSO ₄ | | 0,028 |
| | CuSO ₄ .6H ₂ O | | 0,002 |
| | Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | | 0,001 |
| | CaCl ₂ | | 0,001 |
| | pH=6 met KOH | | |
| | Vit A | | |
| | Biotin (Vit H) | | 0,005 |
| | p-aminobenzoate (Na-salt) | | 0,013 |
| D5 | Pantothenate (Na-salt) | | 0,013 |
| | Folic acid (Dihydrate) | 0,25 | 0,005 |
| | Lipoic acid (thioctic acid) | | 0,013 |
| | Pyridoxine (Vit b6) | | 0,025 |
| | Nicotinamide | | 0,013 |
| | Vit B | | |
| D6 | Thiamine HCL (Vit B1) | 0,1 | 0,010 |
| | Vit C | | |
| D7 | Riboflavine (Vit B2) | 0,1 | 0,005 |
| | Vit D | | |
| D8 | Cyanocobalamine (Vit B12) | 0,1 | 0,001 |
| D10 | Na ₂ S.9H ₂ O | 0,25 | 0,025 |
| D11 | NH ₄ Cl | 0,25 | 1,471 |
| D13 | MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,25 | 0,468 |
| | NaNO ₃ | 0,25 | 8,499 |

Fonte: Do autor, adaptado do protocolo de Deursen (2016).

Tabela 4 - Soluções para compor os meios utilizados nos reatores sulfetogênicos

| | Soluções | Volume (L) | Peso (g) |
|-----|---|-------------------|-----------------|
| S1 | KH ₂ PO ₄ | 0,50 | 13,610 |
| S3 | Resazurin | 0,25 | 7,801 |
| | Elementos traço | | |
| | FeCl ₂ .4H ₂ O | | 0,375 |
| | MnCl ₂ .4H ₂ O | | 0,025 |
| | CoCl ₂ .6H ₂ O | | 0,030 |
| S4a | ZnCl ₂ | 0,25 | 0,018 |
| | CuCl ₂ | | 0,004 |
| | H ₃ BO ₃ | | 0,015 |
| | NiCl ₂ .6H ₂ O | | 0,006 |
| | 1ml conc. HCl | | |
| | Elementos traço | | |
| | NaOH | | 0,100 |
| S4b | Na ₂ SeO ₃ | 0,25 | 0,005 |
| | Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O | | 0,008 |
| | Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | | 0,063 |
| | Vit A | | |
| | Biotin (Vit H) | | 0,001 |
| S5 | p-aminobenzoate (Na-salt) | | 0,003 |
| | Pantothenate (Na-salt) | 0,25 | 0,003 |
| | Pyridoxine (Vit b6) | | 0,013 |
| | Nicotinamide | | 0,005 |
| | Vit B | | |
| S6 | Thiamine HCL (Vit B1) | 0,10 | 0,060 |
| | Vit C | | |
| S7 | Riboflavine (Vit B2) | 0,10 | 0,005 |
| | Vit D | | |
| S8 | Cyanocobalamine (Vit B12) | 0,10 | 0,005 |
| | CaCl ₂ .2H ₂ O | | 1,103 |
| S11 | MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,25 | 1,232 |
| | NH ₄ Cl | | 1,204 |
| | NaCl | | 3,068 |
| S13 | Na ₂ SO ₄ | 0,25 | 10,650 |

Fonte: Do autor, adaptado do protocolo de Deursen (2016).

Tabela 5 - Soluções para compor os meios utilizados nos reatores metanogênicos

| | Soluções | Peso (g) | Volume (L) |
|---------------------------|---|-----------------|-------------------|
| M1 | K ₂ HPO ₄ | 17,418 | 0,500 |
| M2 | Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O | 7,801 | 0,250 |
| M3 | Resazurin | 0,025 | 0,050 |
| M4 | EDTA | 0,250 | 0,500 |
| | FeCl ₂ .4H ₂ O | 1,000 | |
| | MnCl ₂ .4H ₂ O | 0,050 | |
| | CoCl ₂ .6H ₂ O | 0,095 | |
| | ZnCl ₂ | 0,035 | |
| | CuCl ₂ | 0,001 | |
| | AlCl ₃ .6H ₂ O | 0,005 | |
| | H ₃ BO ₃ | 0,003 | |
| | Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0,018 | |
| | NiCl ₂ .6H ₂ O | 0,012 | |
| | 1ml conc. HCl | 0,5 mL | |
| M5 | Vit A | | 0,500 |
| | Biotin (Vit H) - GELADEIRA | 0,025 | |
| | p-aminobenzoate (Na-salt) | 0,125 | |
| | Pantothenate (Na-salt) | 0,025 | |
| | Folic acid (Dihydrate) | 0,010 | |
| | Lipoic acid (thioctic acid) | 0,025 | |
| | Pyridoxine (Vit b6) | 0,050 | |
| Nicotinamide | 0,275 | | |
| M6 | Vit B | | 0,100 |
| Thiamine HCL (Vit B1) | 0,010 | | |
| M7 | Vit C | | 0,100 |
| Riboflavine (Vit B2) | 0,005 | | |
| M8 | Vit D | | 0,100 |
| Cyanocobalamine (Vit B12) | 0,005 | | |
| M9 | NH ₄ HCO ₃ | 4,509 | 0,500 |
| | NaHCO ₃ | 38,057 | |
| M10 | Na ₂ S.9H ₂ O | 12,010 | 0,050 |
| M11 | CaCl ₂ .2H ₂ O | 2,205 | 0,500 |
| | MgCl ₂ .6H ₂ O | 2,035 | |

Fonte: Do autor, adaptado do protocolo de Deursen (2016).

As soluções específicas para cada condição de oxirredução foram formadas a partir da combinação das soluções estoque (soluções indicadas nas Tabelas 3, 4 e 5). O procedimento para o preparo dessas soluções está descrito a seguir (DEURSEN, 2016):

i. Meio para a condição desnitrificante

MEIO BASAL – 500 ml de água anaeróbia; 39,5 ml de D1; 107,5 ml de D2 e 0,65 ml de D3.

COLD A – 21,4 ml de água anaeróbia; 1 ml de D4, D5 e D7; 0,5 ml de D6 e 0,1 ml de D8.

COLD B – 49 ml de D13 e 1 ml de D10.

COLD C – 25 ml de D11.

ii. Meio para a condição sulfetogênica

MEIO BASAL – 500 ml de água anaeróbia; 8,5 ml de S1 e 0,5 ml de S3.

COLD A – 21,4 ml de água anaeróbia; 1 ml de S4a, S4b, S5 e 0,2 ml de S6, S7 e S8.

COLD C – 25 ml de S11.

iii. Meio para a condição metanogênica

MEIO BASAL – 500 ml de água anaeróbia, 10,5 ml de M1, 3,5 ml de M2 e 0,5 ml de M3.

COLD A – 20 ml de água anaeróbia e 1,0 ml de cada uma das seguintes soluções: M4, M5, M6, M7 e M8.

COLD B – 1 ml de M10 e 49,0 ml de M9.

COLD C – 25,0 ml de M11.

Para o meio basal feito nas 3 condições distintas as soluções foram dissolvidas na água anaeróbia sob fluxo de nitrogênio, por 20 minutos. Os frascos Duran[®] com os meios foram lacrados e esterilizados (20 minutos a 120°C). Ressalta-se ainda que a água anaeróbia utilizada para a composição de todas as soluções foi preparada no momento da utilização, feita a partir

de água destilada fervida que em seguida foi resfriada, numa bacia de gelo com água, sobre fluxo de nitrogênio durante 20 minutos.

Para a construção dos COLD's A, B e C foram utilizados frascos de antibióticos de 120 ml, que foram fechados com tampas de butila e selados com lacres de alumínio. Os reatores metanogênicos passaram por uma troca de atmosfera de 10 ciclos (N_2 , CO_2 ; 80%, 20%), enquanto que os reatores das demais condições tiveram o seu headspace preenchido por 100% de N_2 (10 ciclos).

Após a primeira troca de atmosfera, a fim de eliminar o oxigênio dos meios, os frascos foram esterilizados. Após a esterilização, o meio completo foi preparado a partir da adição dos colds, nas suas respectivas proporções, com seringas e agulhas esterilizadas.

Com as soluções já prontas, uma nova lavagem pelo distribuidor de gases foi realizada, com 10 ciclos nas mesmas condições de atmosferas descritas anteriormente.

Os COLDS foram embalados com papel alumínio e armazenados sob refrigeração ($4^\circ C$).

4.4 INÓCULO

O inóculo utilizado nos reatores foi composto por uma mistura homogênea dos solos nos diferentes pontos coletados (item 4.2). Esta mistura foi realizada em frasco Duran[®] (1L) sob fluxo de nitrogênio gasoso aplicado sobre o solo em processo de mistura, a fim de manter a anaerobiose. O frasco foi fechado, embalado com papel alumínio e armazenado sob refrigeração. Todo material empregado no preparo do inóculo foi previamente esterilizado.

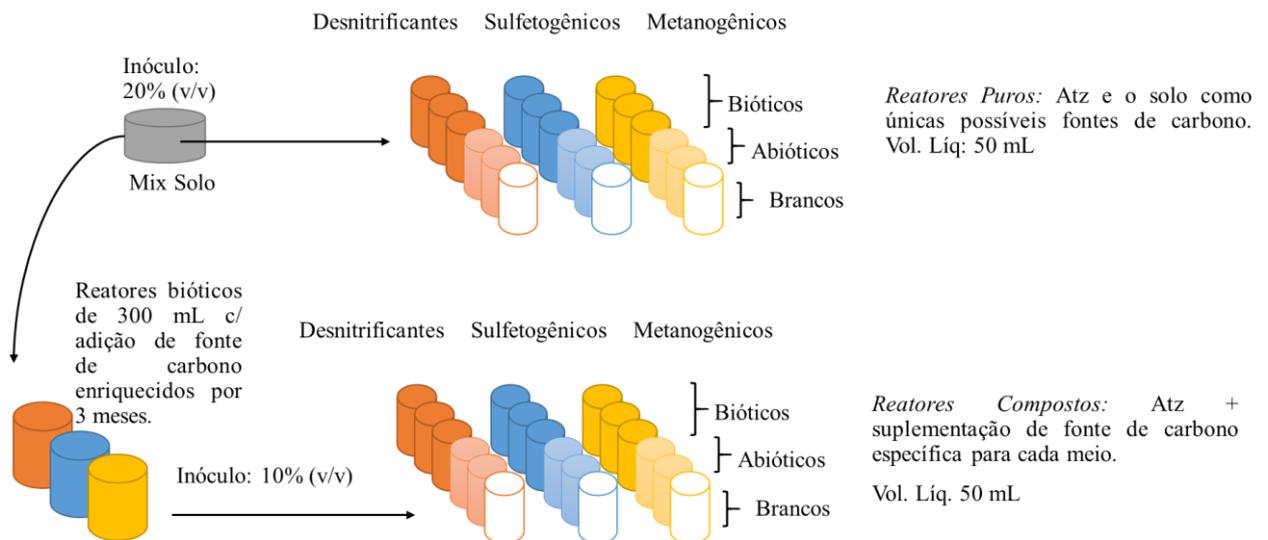
4.5 REATORES ANAERÓBIOS E ENRIQUECIMENTO

Para cada uma das 3 condições de oxirredução (desnitrificantes, sulfetogênicos e metanogênicos) foram feitos 7 reatores: 3 bióticos, sendo a atrazina e o conteúdo orgânico do solo as únicas fontes de carbono dos reatores; 2 abióticos, com adição de azida 1M (NaN_3) e cloreto de mercúrio 1M ($HgCl_2$) para inativação microbiana, e 1 “branco”, sem adição de

atrazina. A Figura 6 mostra o arranjo experimental dos reatores anaeróbios, que foram divididos em Reatores Puros Anaeróbios (RPA) e Reatores Compostos Anaeróbios (RCA).

Figura 6 - Procedimento experimental para a construção de todos os reatores anaeróbios

Arranjo Experimental do Enriquecimento dos Reatores Anaeróbios



Fonte: Do autor.

Os reatores bióticos foram preparados para avaliar a atividade microbiana (crescimento e degradação da atrazina), os abióticos para verificar a degradação da atrazina sem a participação microbiana, e o “branco” para observar se os microrganismos envolvidos no processo de degradação da atrazina estão se desenvolvendo (ou não) a partir de outras fontes de carbono (o que foi adicionado nos reatores de 300 mL, ou conteúdo orgânico do solo). A composição de substâncias em cada reator é mostrada nas Tabelas 6 e 7, com atrazina na concentração de 1 mg/L.

Sabe-se que os processos anaeróbios são mais lentos na partida de reatores do que os processos aeróbios, desta forma, foram feitos os 3 reatores bióticos de enriquecimento nas diferentes condições testadas, contendo Atrazina (1,0 mg/L) de volume maior (300mL), com as suas respectivas fontes de carbono, para serem utilizados como inóculo para os RCA.

Os RCA, foram replicados, em volume líquido de 50 mL, utilizando como inóculo (10% v/v) o volume líquido dos reatores de 300 mL, com 45 dias de enriquecimento.

Os RCA diferem-se dos RPA, pela suplementação com fonte de carbono (*acetato de sódio* p/ os desnitrificantes, *lactato de sódio* para os sulfetogênicos e *acetato de sódio + formiato* para os metanogênicos a 3,6 mM) e pelo uso do inóculo já enriquecido dos reatores biológicos maiores.

O objetivo deste ensaio com os RCA é verificar a degradação da atrazina sobre um potencial microbiano enriquecido e com outras fontes de carbono (as mesmas utilizadas nos reatores de 300 mL).

Tabela 6 - Composição dos primeiros reatores anaeróbios de volume líquido de 50 ml (Reatores Puros)

| Desnit. | Composição | Volume (ml) | Sulfet. | Composição | Volume (ml) | Met. | Composição | Volume (ml) |
|------------------|-------------------|--------------|------------------|-------------------|-------------|------------------|-------------------|-------------|
| Biótico 1,2,3 | Meio Basal | 44,50 | Biótico 1,2,3 | Meio Basal | 43,40 | Biótico 1,2,3 | Meio Basal | 44,50 |
| | Cold A | 1,25 | | Cold A | 1,20 | | Cold A | 1,25 |
| | Cold B | 2,50 | | S13 | 3,60 | | Cold B | 2,50 |
| | Cold C | 1,25 | | Cold C | 1,20 | | Cold C | 1,25 |
| | Atz | 0,50 | | Atz | 0,50 | | Atz | 0,50 |
| | Inóculo | 12,67 | | Inóculo | 12,67 | | Inóculo | 12,67 |
| | Volume total | 62,67 | | Volume total | 62,57 | | Volume total | 62,67 |
| Abiótico 1,2 | Meio Basal | 42,50 | Abiótico 1,2 | Meio Basal | 40,90 | Abiótico 1,2 | Meio Basal | 42,50 |
| | Cold A | 1,18 | | Cold A | 1,14 | | Cold A | 1,18 |
| | Cold B | 2,36 | | S13 | 3,40 | | Cold B | 2,36 |
| | Cold C | 1,18 | | Cold C | 1,14 | | Cold C | 1,18 |
| | Atz | 0,50 | | Atz | 0,50 | | Atz | 0,50 |
| | Inóculo | 12,70 | | Inóculo | 12,67 | | Inóculo | 12,70 |
| | NaN ₃ | 1,00 | | NaN ₃ | 1,00 | | NaN ₃ | 1,00 |
| | HgCl ₂ | 1,00 | | HgCl ₂ | 1,00 | | HgCl ₂ | 1,00 |
| Volume total | 62,42 | Volume total | 61,75 | Volume total | 62,42 | | | |
| Branco | Meio Basal | 45,00 | Branco | Meio Basal | 43,90 | Branco | Meio Basal | 45,00 |
| | Cold A | 1,25 | | Cold A | 1,22 | | Cold A | 1,25 |
| | Cold B | 2,50 | | S13 | 3,66 | | Cold B | 2,50 |
| | Cold C | 1,25 | | Cold C | 1,22 | | Cold C | 1,25 |
| | Inóculo | 12,70 | | Inóculo | 12,67 | | Inóculo | 12,70 |
| | Volume total | 62,70 | | Volume total | 62,67 | | Volume total | 62,70 |

Fonte: Do autor. Valores calculados a partir do protocolo de Deursen (2016).

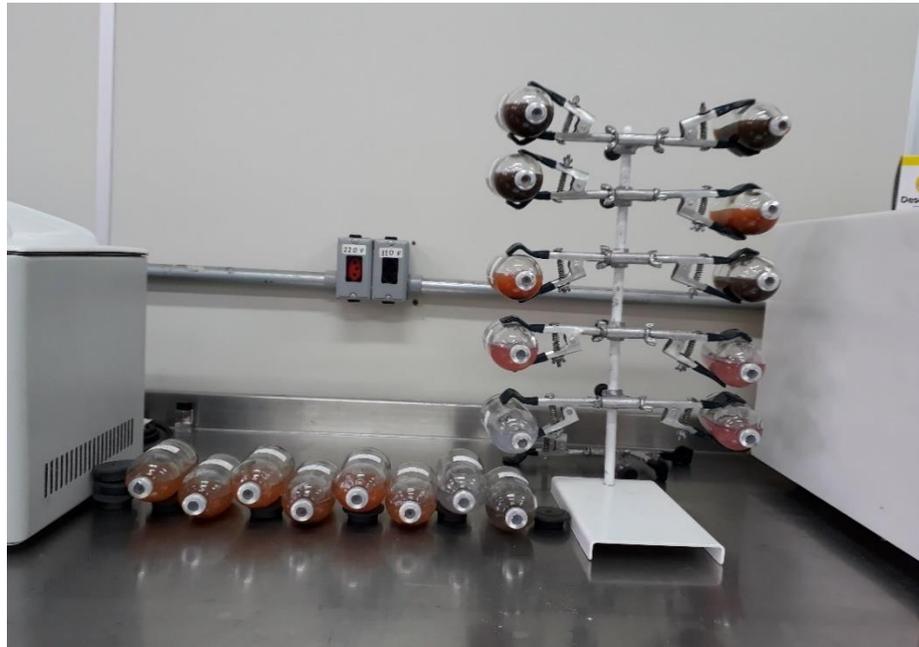
Tabela 7. Composição dos reatores de volume maior (300 ml) feitos com adição de fonte de carbono.

| Desnitrificante | | Sulfetogênico | | Metanogênico | |
|----------------------|-----------|----------------------|-----------|---------------------|-----------|
| Composição | | Composição | | Composição | |
| Meio Basal | 270,00 ml | Meio Basal | 270,00 ml | Meio Basal | 270,00 ml |
| Cold A | 7,50 ml | Cold A | 7,50 ml | Cold A | 7,50 ml |
| Cold B | 15,00 ml | S13 | 22,50 ml | Cold B | 15,00 ml |
| Cold C | 7,50 ml | Cold C | 7,50 ml | Cold C | 7,50 ml |
| Atz | 1 mg/L | Atz | 1 mg/L | Atz | 1 mg/L |
| Inóculo | 20,00 % | Inóculo | 20 % | Inóculo | 20 % |
| Volume líq. | 300,00 ml | Volume líq. | 300,00 ml | Volume líq. | 300,00 ml |
| Acetato de sódio 1 M | 3,60 ml | Lactato de Sódio 1 M | 3,6 ml | Acetato de sódio 1M | 3,6 ml |
| | | | | Formiato 1M | 3,53 ml |

Fonte: Do autor.

Os reatores foram mantidos sobre agitação 120 rpm, a 30°C. E para a coleta de amostras para detecção de atrazina e seus intermediários metabólicos, os reatores foram colocados em repouso, sob inclinação, para evitar a retirada de biomassa (Figura 7).

Figura 7 - Reatores em descanso antes das retiradas de amostras



Fonte: Do autor.

4.6 MONITORAMENTO DOS REATORES

Para o monitoramento dos reatores desnitrificantes foi avaliado o consumo de nitrato (NO_3^-), segundo a metodologia de Cataldo (1975). Foi retirado 0,2 mL de amostra de cada reator e diluídas em balão volumétrico de 10 mL (diluição 1:50). A leitura em espectrofotômetro (410 nm), os resultados foram registrados e calculados conforme a curva de calibração.

O monitoramento dos reatores sulfetogênicos consiste nas análises de sulfato e sulfeto. As quantificações de sulfato seguiram o método 4500-SO₄²⁻ E (turbidimétrico) e a determinação de sulfeto (S^{2-}) o método colorimétrico em espectrofotômetro por meio do kit hach utilizado para esse tipo de análise.

Os reatores metanogênicos foram mantidos em processo de enriquecimento, e ao final do período de análise avaliou-se a degradação da atrazina e a atividade microbiana dos reatores. O monitoramento destes reatores ocorreu por meio da quantificação da produção de metano no último ensaio, utilizando o equipamento Cromatógrafo Gasoso Shimadzu GC-2014 com Detector de Condutividade Técnica (TCD) e coluna HP-PLOT/Q (30 m x 0,53 mm x 40 µm de espessura de filme).

4.7 DETECÇÃO DA ATRAZINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC/UV)

Para a análise de detecção de atrazina e para os intermediários metabólicos, desisopropilatrazina (DIA) e adesetilatrazina (DEA), foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC/UV), conforme o método cromatográfico expresso na Tabela 8.

Os limites de detecção da atrazina foram de 0,05 a 1,0 mg/L e para os seus intermediários metabólicos DIA e DEA foram de 0,025 a 1,0 mg/L. As equações utilizadas para a curva de ATZ, DIA e DEA, são representadas pelas equações (2), (3) e (4), respectivamente.

$$y = 3,446x - 0,0043; R2 = 0,9999 \quad (2)$$

$$y = 2,655x - 0,0037; R2 = 0,9996 \quad (3)$$

$$y = 2,617x - 0,0089; R2 = R2 = 0,9998 \quad (4)$$

Tabela 8 - Informações cromatográficas

| Informações cromatográficas | |
|------------------------------------|----------------------|
| HPLC | Thermo Ultimate 3000 |
| Fase móvel | ACN:H2O 60:40 |
| Modo eluição | isocrático |
| Tempo de corrida | 8 min |
| Tempo de retenção | DIA 3,03 |
| | DEA 3,38 |
| | ATZ 5,38 |
| Detecção | DAD |
| Comprimento de onda | 220 nm |

Fonte: ITAIPU BINACIONAL (2019).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo discutir-se-á sobre os resultados encontrados nos estudos sobre os Reatores Puros (RPA) e Compostos (RCA).

5.1 REATORES PUROS ANAERÓBIOS (RPA)

5.1.1 Reatores Puros Desnitrificantes (RPD)

Os RPD estão demonstrados na Figura 8. Em condições de agitação a coloração dos reatores biológicos manteve-se similar num tom de laranja conforme a cor natural do solo argiloso utilizado como inóculo (20%). Entretanto, após 24h de decantação os reatores desnitrificantes eram os únicos que apresentavam a fração clarificada num tom de laranja (Figura 9).

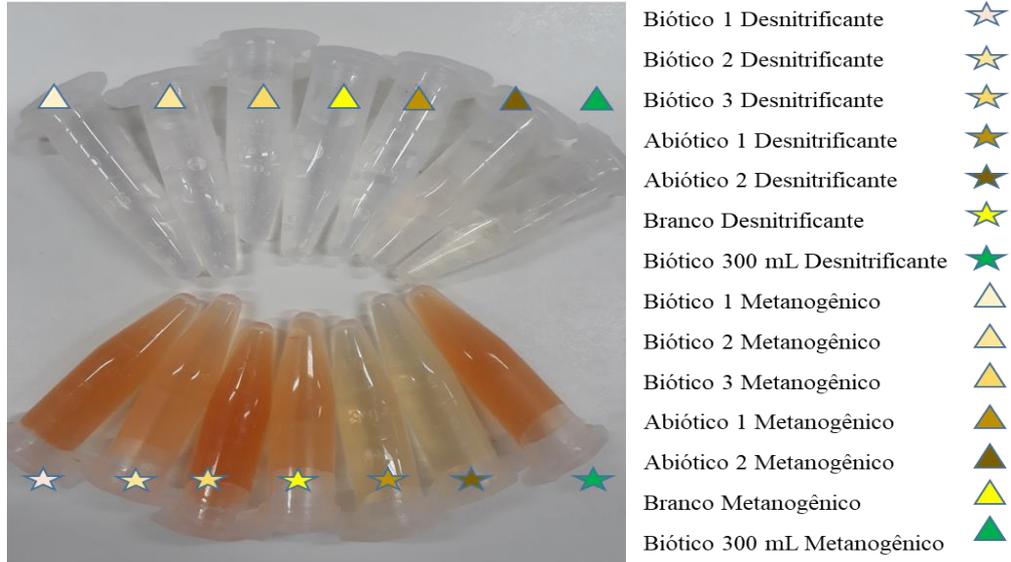
Este fenômeno ocorreu apenas nos reatores desnitrificantes, e pode estar associado às características específicas deste meio ou à subprodutos liberados pelo metabolismo microbiano (SCHLEDER, 2016).

Figura 8 - Aspecto dos Reatores Puros Desnitrificantes (RPD)



Fonte: Do autor.

Figura 9 - Fração clarificada dos RPD (abaixo)

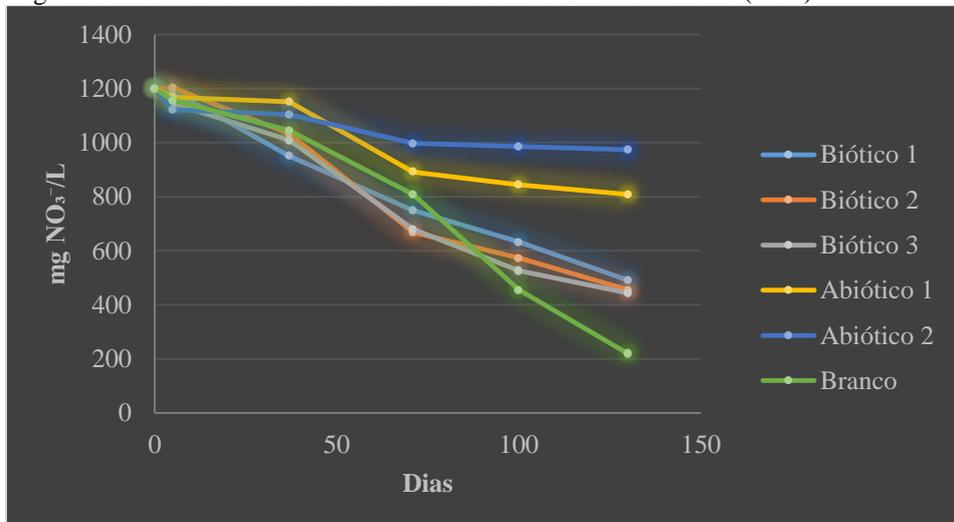


Fonte: Do autor.

Pode-se perceber que as duas únicas amostras abióticas apresentam coloração menos intensa do que as amostras dos reatores biológicos. O escurecimento da fração clarificada dos reatores biológicos, retiradas para amostras para detecção de atrazina, pode estar associada à ação microbiana nestes reatores que ao consumir a matéria orgânica presente nos reatores deixam os meios com coloração compatível ao conteúdo mineralógico do solo (DUARTE, 2018).

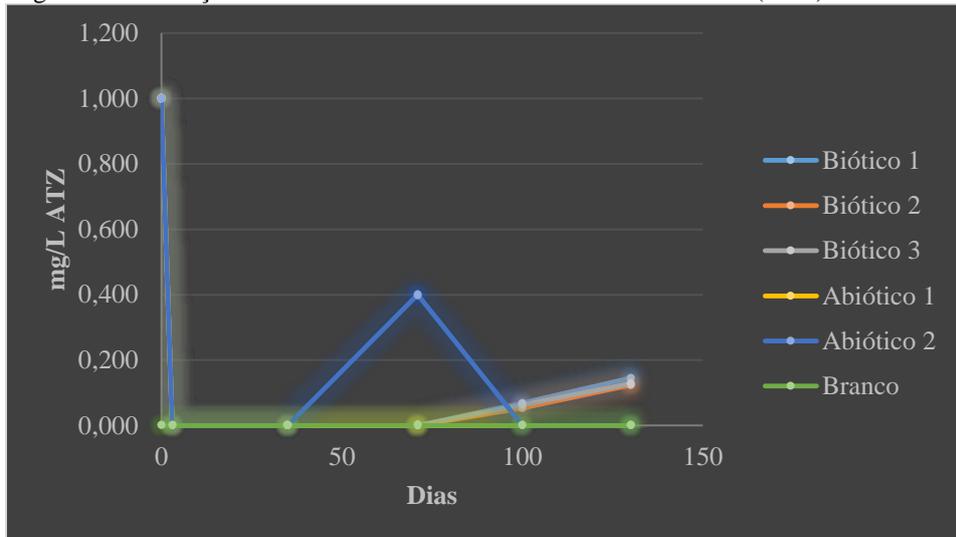
A atividade dos reatores desnitrificantes foi monitorada por meio da análise da redução de nitrato, e estão expressos na Figura 10. A presença da atrazina (ATZ) nos reatores ao longo da operação está demonstrada na Figura 11.

Figura 10 - Consumo de nitrato nos Reatores Puros Desnitrificantes (RPD).



Fonte: Do autor.

Figura 11 - Detecção de atrazina nos Reatores Puros Desnitricantes (RPD).



Fonte: Do autor.

Neste estudo, observou-se ao longo de 130 dias de operação, consumo médio de nitrato ($61\pm 2\%$) nos reatores bióticos, maior que nos reatores abióticos ($25\pm 9\%$), pode-se perceber, portanto, que houve atividade microbiana nos reatores biológicos.

O consumo de nitrato nos reatores abióticos pode ocorrer por fatores físico-químicos, como “stripping” de amônia em pH elevado, troca iônica, adsorção, osmose reversa, oxidação com cloro, diálise elétrica e precipitação química (DUARTE, 2018). Estudos mais aprofundados sobre a degradação da atrazina em condições abióticas podem promover uma explanação mais completa sobre o assunto.

No branco, que difere-se dos demais reatores bióticos apenas pelo fato de não ter sido adicionada atrazina neste reator, o consumo de nitrato foi maior (81%), o que pode ser um indicador de que a ausência de atrazina neste reator biológico foi favorável ao desenvolvimento dos microrganismos desnitrificantes.

Pode-se observar que não foi possível detectar atrazina até o trigésimo quinto dia, entretanto após 71 dias houve detecção apenas nos reatores abióticos e no branco, pois as três amostras referentes aos reatores biológicos 1, 2 e 3 foram comprometidas durante o processo de análise. Estas três amostras chegaram no laboratório abertas, com volume reduzido, impossibilitando a quantificação de atrazina pelo método de detecção.

5.1.2 Reatores Puros Sulfetogênicos (RPS)

Quanto ao aspecto colorimétrico dos RPS, não houve variação notável entre os reatores durante o ensaio (Figura 12). Permanecendo a cor dominante do solo em todos os reatores. Após decantação, foi possível retirar amostras totalmente clarificadas para as análises. A produção de sulfetos deixa os meios mais escuro (CALLADO; DAMIANOVIC; FORESTI, 2016). Entretanto, não houve escurecimento notável nos reatores, pois a coloração do solo foi dominante em todos os reatores.

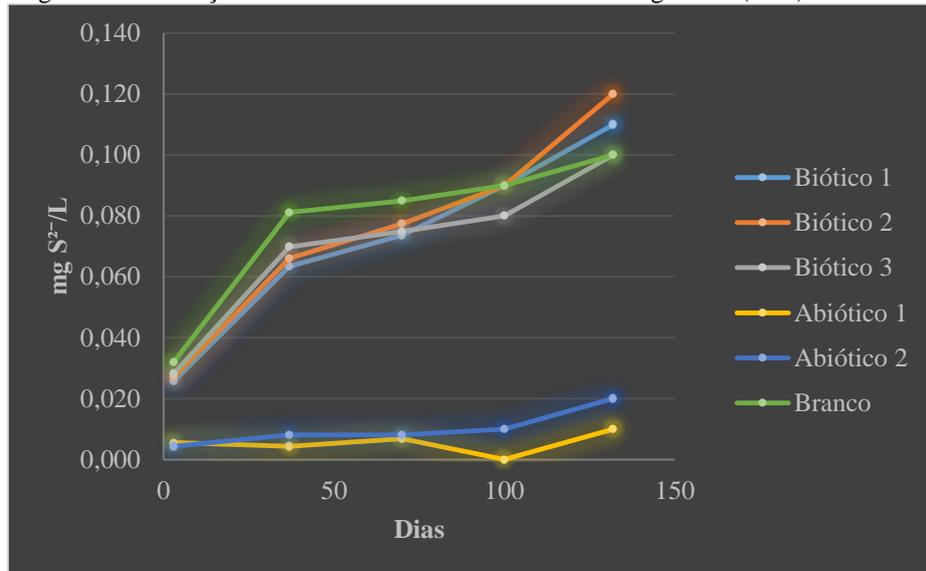
Figura 12 - Aspecto dos Reatores Puros Sulfetogênicos



Fonte: Do autor.

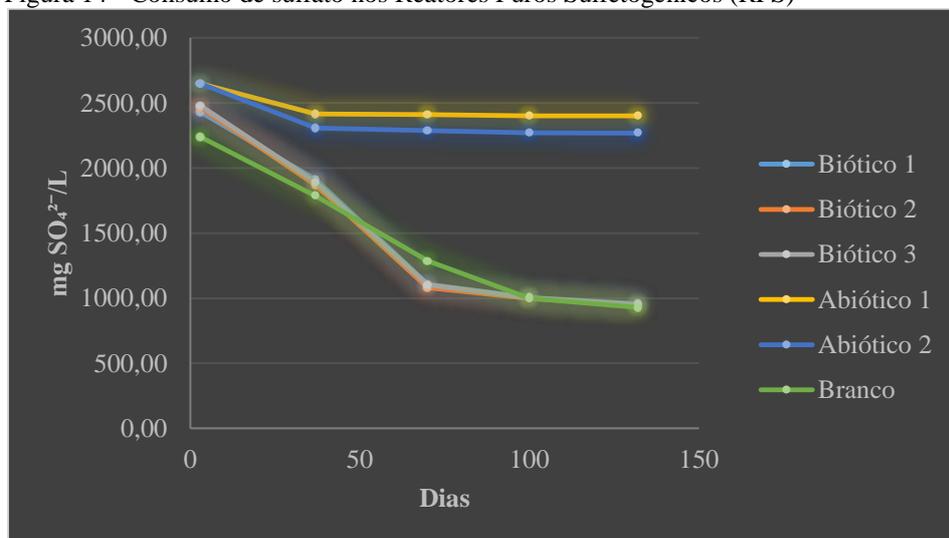
Por meio das análises de produção de sulfeto e consumo de sulfato pôde-se avaliar a atividade microbiana nos reatores sulfetogênicos. As Figuras 13 e 14 mostram a produção de sulfeto e o consumo de sulfato nos RPS, enquanto que a presença da atrazina está demonstrada na Figura 15.

Figura 13 - Produção de sulfeto nos Reactores Puros Sulfetogênicos (RPS)



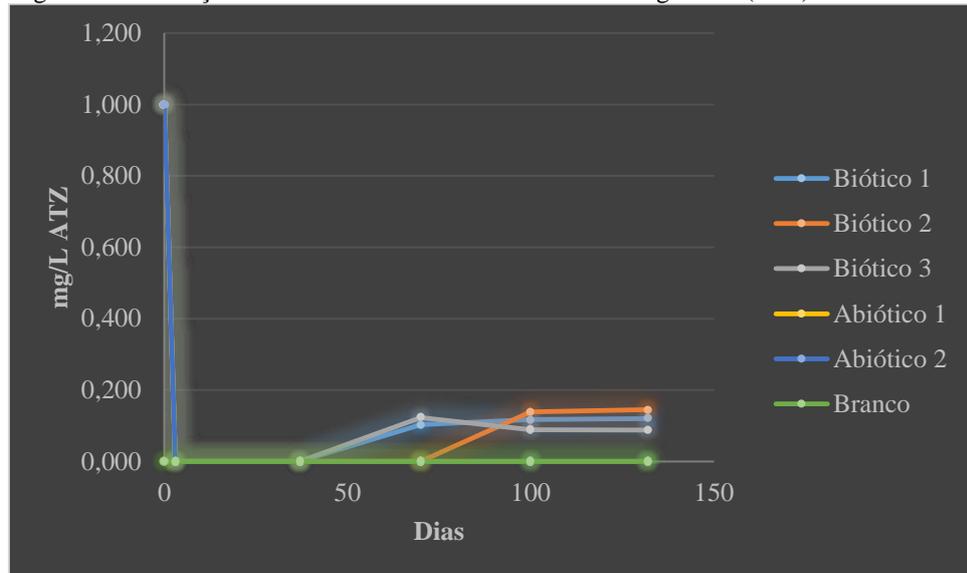
Fonte: Do autor.

Figura 14 - Consumo de sulfato nos Reactores Puros Sulfetogênicos (RPS)



Fonte: Do autor.

Figura 15 - Detecção de atrazina nos Reatores Puros Sulfetogênicos (RPS)



Fonte: Do autor.

Por meio da análise da produção de sulfeto ($0,110 \pm 0,016$ mg/L) e do consumo de sulfato ($61 \pm 1\%$) nos reatores bióticos, pôde-se inferir a ocorrência de atividade microbiana sulfetogênica, uma vez que nos reatores abióticos estes valores foram muito inferiores tanto para a produção de sulfeto ($0,015 \pm 0,002$ mg/L) como para o consumo de sulfato ($12 \pm 3\%$).

O reator branco apresentou os mesmos valores dos reatores bióticos, o que mostra que a atividade microbiana nos reatores bióticos não foi comprometida com a presença de 1,0 mg/L de atrazina. O oposto foi observado nos RPD, maior consumo de nitrato no reator branco. Este resultado sugere que as bactérias redutoras de sulfato (BRS) são menos sensíveis à atrazina do que as desnitrificantes. Bactérias desnitrificantes e sulfetogênicas podem ser mais ou menos sensíveis à certas substâncias, podendo haver um domínio de uma população sobre a outra, conforme as condições ambientais em que são submetidas (BARBOSA, 2017).

Analisando o gráfico de detecção da atrazina durante 140 dias de análise, pode-se observar que só ocorreu detecção do herbicida após 72 dias nos reatores bióticos 1 e 3 (0,103 e 0,123 mg/L, respectivamente). Todavia, após este período, foi detectado um aumento sutil de atrazina em todo os reatores bióticos, enquanto que no reator branco nada foi observado, o que era esperado, uma vez que não foi adicionada atrazina neste reator. Nos reatores abióticos não detectou-se atrazina.

5.1.3 Reatores Puros Metanogênicos (RPM)

Como pode ser observado na Figura 16, os reatores metanogênicos apresentaram coloração próxima do natural do solo e entre si, embora os reatores biológicos tenham demonstrado coloração mais escura do que o tom de solo original (alaranjado). Os reatores abióticos mantiveram com coloração próxima a do solo, sem sofrer variações durante o ensaio. A variação na coloração dos meios pode estar relacionada a atividade biológica, uma vez que apenas os reatores biológicos sofreram variação colorimétrica. A atividade metanogênica pode alterar a coloração dos meios pelo consumo do conteúdo orgânico dos reatores, liberação de monômeros ou pela formação de biomassa (ALTMANN et al., 2016; BILLEMONT; COASNE; DE WEIRELD, 2014).

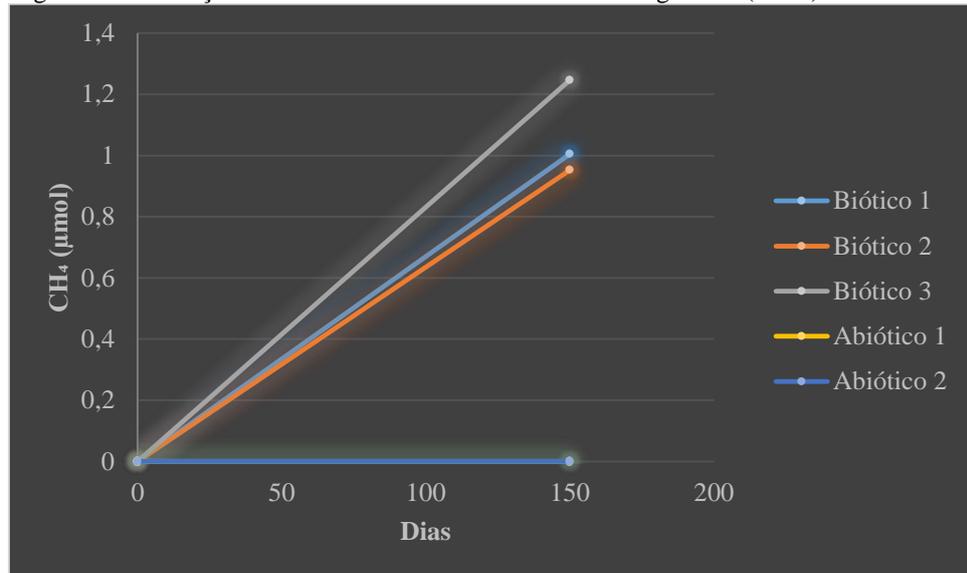
Figura 16 - Aspecto dos Reatores Puros Metanogênicos (RPM)



Fonte: Do autor.

A produção de metano nos RPM é evidenciada na Figura 17, em que pode-se perceber aumento apenas nos reatores bióticos. A produção média destes reatores foi de $1 \pm 0,16 \mu\text{mol}$ ao final do ensaio, o que indica a atividade metanogênica nestes reatores. O reator utilizado como branco, devido perda de gás durante a análise, não foi quantificado.

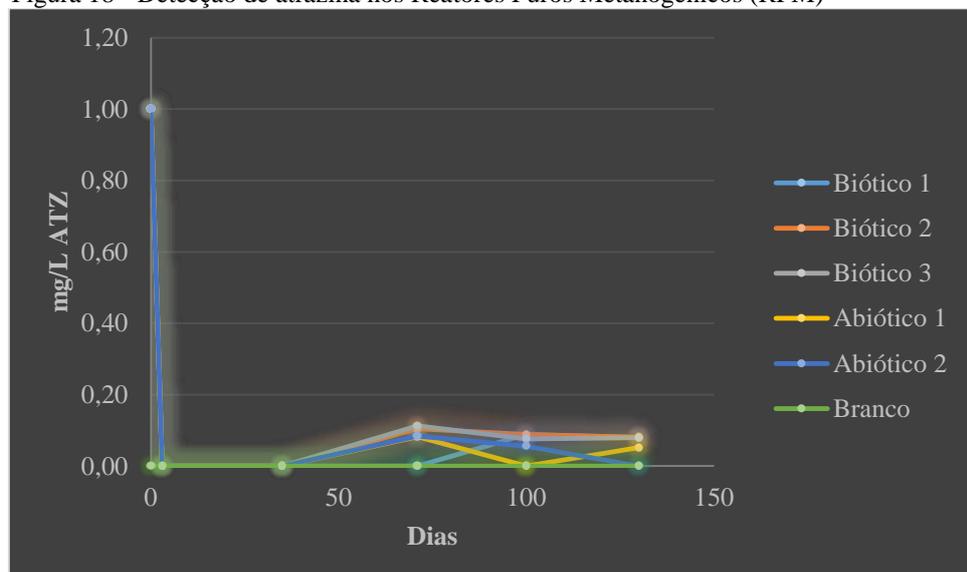
Figura 17 - Produção de metano nos Reatores Puros Metanogênicos (RPM)



Fonte: Do autor.

A detecção de atrazina nos RPM está expressa na Figura 18. Observa-se um rápido decaimento na concentração de atrazina em todas as condições logo no início do ensaio com exceção do branco. Assim como observado nas condições anteriores (desnitrificante e sulfetogênica), nos RPM, observou-se a detecção de atrazina após 71 dias de operação, e o sua dinâmica no gráfico sugere que após ser detectada, a atrazina sofreu poucas variações em sua concentração, podendo estar relacionadas à processos simultâneos de degradação, adsorção e dessorção (MAURO; CAMPOS; LANGENBACH, 2007; YUE et al., 2016).

Figura 18 - Detecção de atrazina nos Reatores Puros Metanogênicos (RPM)



Fonte: Do autor.

5.1.4 Considerações Gerais sobre os Reatores Puros Anaeróbios (Desnitrificantes, Sulfetogênicos e Metanogênicos)

Inicialmente abordar-se-á sobre a remoção de atrazina nos diferentes meios de oxirredução aqui estudados, expressos na Tabela 9.

Tabela 9 - Remoção da ATZ nos Reatores Puros Anaeróbios (RPA)

| Condição | Reator | Remoção ATZ (%) | | |
|----------|-----------|-----------------|---|-----|
| RPD | Bióticos | 87 | % | 7 |
| | Abióticos | 100 | % | 7 |
| RPS | Bióticos | 88 | % | 7 ± |
| | Abióticos | 100 | % | 7 |
| RPM | Bióticos | 92 | % | 7 |
| | Abióticos | 100 | % | 7 |

Fonte: Do autor.

Quanto à concentração inicial de atrazina (1 mg/L) adicionada aos RPA pôde-se observar alta remoção de atrazina nos reatores bióticos, e total remoção nos reatores abióticos. Entretanto, em todos os RPA, pôde-se observar detecção da atrazina somente após 70 dias. Provavelmente, a atrazina aplicada nos reatores foi inicialmente adsorvida no solo, sofreu hidrólise química ou outros tipos de reações químicas ou volatilização rápida.

Correia et al. (2007) observou que a adsorção da atrazina em solo argiloso aumentou em função do tempo de contato em solos de plantio direto e mata nativa, e também destaca que a qualidade da matéria orgânica presente no solo pode aumentar a capacidade de adsorção do herbicida no solo. Os mesmos autores calcularam um coeficiente de adsorção da atrazina no solo argiloso testado, chegando no valor de $K_f = 11,28$, sendo um valor considerado alto pelo IBAMA, o que indica um maior potencial de adsorção do micropoluente nesse tipo de solo. Outros autores buscando avaliar a adsorção da atrazina em solos argilosos e ricos em matéria orgânica verificaram adsorção de atrazina de 22,8% em 24 horas (YUE et al., 2016)

O fato da atrazina ser detectada após um longo período nos reatores anaeróbios testados pode sinalizar a permanência deste composto no solo, levando mais tempo para ser carregada à solução do solo, onde ela estaria de fato suscetível aos processos de biodegradação. Neste sentido, em função das características do solo, temperatura, pH, agitação, e propriedades físico-químicas da atrazina pode-se esperar que a mobilidade da atrazina nos reatores (adsorção e

dessorção) tenham influenciado na presença de atrazina na fração líquida coletada para as análises.

Outro fato importante a ser destacado é sobre a produção de biossurfactantes, que são compostos produzidos por microrganismos extracelularmente ou como parte da membrana das células. Esses subprodutos são capazes de melhorar a solubilidade e biodegradação de contaminantes, como é o caso da atrazina (COLLA, 2015).

O fato da detecção da atrazina ter sido mais notável nos reatores bióticos pode ter relação com a produção de biossurfactantes. Os microrganismos após um longo tempo de exposição, podem ter desenvolvido a capacidade de produzir estas substâncias para levar a atrazina até a solução do solo, local ao qual o micropoluinte orgânico estaria de fato suscetível aos processos de biodegradação.

Esta linha de raciocínio é coerente e já foi estudada por outros autores (ABBASI, 2018; JADEJA; MOHARIR; KAPLEY, 2018; MAURO; CAMPOS; LANGENBACH, 2007). Após a atrazina ter sido dessorvida do solo pela ação de biossurfactantes, dificilmente ela seria novamente adsorvida, fenômeno que não foi observado nos reatores abióticos, em que a atrazina parece sofrer ciclos de adsorção e dessorção, o que fortalece a teoria de produção de biossurfactantes nos reatores biológicos.

Embora a atrazina apresente baixa pressão de vapor, o que lhe atribui um baixo potencial volátil, este potencial não é exclusivamente avaliado pelas propriedades intrínsecas do composto, pois também depende das condições ambientais ao qual o composto está inserido, como temperatura e pressão. Neste sentido a atrazina pode sofrer volatilização. (PARENTE, 2018). A atmosfera dos reatores pressurizados com nitrogênio gasoso e submetidos à agitação e temperaturas mais elevadas podem ter promovido fenômenos de difusão e mistura líquido-gás, e considerando que apenas a fração líquida dos reatores foi analisada, a fração gasosa também pode conter atrazina.

Em condições abióticas a atrazina também pode sofrer hidrólise química, que ocorre pela descloração da molécula e substituição por uma hidroxila, podendo dar origem à deisopropilatrazina (DIA). A hidrólise química é acelerada em baixos valores de pH, pela presença de substâncias húmicas, e temperaturas acima de 30°C (OLIVEIRA, 2015). Os reatores foram operados à 30°C, e o único intermediário metabólico encontrado nos RPA foi a deisopropilatrazina (DIA). Estes resultados podem indicar a ocorrência de hidrólise química nestes reatores, o que justificaria a formação deste intermediário metabólico nos reatores abióticos. A Tabela 10 mostra os resultados de detecção deste intermediário metabólico.

Tabela 10 - Presença de deisopropilatrizona (DIA) nos RPA

| Reatores | | DIA (mg/L) nos RPD \pm 3% | | | |
|-----------------|------|---|-------|-------|-------|
| Biótico 1 | n.d. | n.d. | n.d. | 0,065 | 0,053 |
| Biótico 2 | n.d. | n.d. | n.d. | 0,045 | 0,044 |
| Biótico 3 | n.d. | n.d. | n.d. | 0,076 | 0,038 |
| Abiótico 1 | n.d. | n.d. | 0,038 | 0,030 | 0,024 |
| Abiótico 2 | n.d. | n.d. | 0,061 | 0,059 | 0,038 |
| Branco | n.d. | n.d. | 0,025 | 0,052 | 0,057 |
| Tempo (Dias) | 3 | 35 | 71 | 100 | 130 |
| Reatores | | DIA (mg/L) nos RPS \pm 3% | | | |
| Biótico 1 | n.d. | n.d. | n.d. | 0,053 | n.d. |
| Biótico 2 | n.d. | n.d. | n.d. | 0,046 | n.d. |
| Biótico 3 | n.d. | n.d. | 0,027 | 0,050 | n.d. |
| Abiótico 1 | n.d. | n.d. | n.d. | 0,033 | n.d. |
| Abiótico 2 | n.d. | n.d. | 0,033 | 0,032 | n.d. |
| Branco | n.d. | n.d. | 0,026 | 0,044 | n.d. |
| Tempo (Dias) | 3 | 37 | 70 | 100 | 132 |
| Reatores | | DIA (mg/L) nos RPM \pm 3% | | | |
| Biótico 1 | n.d. | n.d. | n.d. | 0,038 | 0,030 |
| Biótico 2 | n.d. | n.d. | 0,063 | 0,062 | 0,049 |
| Biótico 3 | n.d. | n.d. | 0,095 | 0,045 | 0,073 |
| Abiótico 1 | n.d. | n.d. | 0,068 | 0,055 | n.d. |
| Abiótico 2 | n.d. | n.d. | 0,055 | 0,046 | n.d. |
| Branco | n.d. | n.d. | n.d. | 0,074 | n.d. |
| Tempo (Dias) | 3 | 35 | 71 | 100 | 130 |
| Legenda | n.d. | Abaixo da curva analítica (<0,025 mg/L) | | | |

Fonte: Do autor.

O fato de ter detectado DIA nos reatores abióticos não era esperado, uma vez que a atividade microbiana nestes reatores era inexistente. Todavia, sabe-se que fenômenos físico-químicos como a hidrólise química podem ocorrer, promovendo a degradação do composto (GOMES; SANTOS; SILVA, 2004). Além disso, como já apresentado na revisão bibliográfica do presente trabalho, a meia vida da atrazina é variável, e depende de fatores como: agitação, temperatura, pH, teor e qualidade de matéria orgânica no solo, tipo de solo, e outras características mais específicas ainda, como o tipo de colóides orgânicos e inorgânicos presentes no solo.

Este conjunto de fatores pode provocar alterações no processo de degradação da atrazina, o que abre uma lacuna para que novos estudos visando analisar o comportamento da atrazina em diferentes tipos de solos e condições abióticas distintas sejam feitos.

Desta forma, não foi possível observar a biodegradação da atrazina nos RPA. É possível que a atrazina tenha sido adsorvida pelo solo, uma vez que o solo utilizado como inóculo é argiloso e com potencial de alta capacidade de troca de cátions (CTC), características típicas dos latossolos e nitossolos vermelhos encontrados na região da coleta de amostras. Todavia a formação de DIA sugere a ocorrência de processos de degradação da atrazina, uma vez que este intermediário metabólico destaca-se entre os mais conhecidos subprodutos organoclorados da atrazina, juntamente com a desetilatrazina (DEA) (COELHO; BARNARDO, 2017).

Outro fator importante a ser destacado é que o tempo para a degradação da atrazina nas condições estudadas foi pequeno, havendo, portanto, necessidade de mais tempo para avaliar a ocorrência de degradação. Os resultados observados nos reatores bióticos indicam, que em condições sem suplementação de outras fontes de carbono e inóculo enriquecido, é necessário mais tempo para que a biodegradação da atrazina possa ocorrer.

5.2 REATORES COMPOSTOS ANAERÓBIOS (RCA)

5.2.1 Reatores Compostos Desnitrificantes (RCD)

Os RCD apresentaram diferença visual ao longo da operação (Figura 19). Os reatores biológicos ficaram mais escuros do que os reatores abióticos, que mantiveram a sua coloração inicial. Após período de decantação (24h), a fração líquida clarificada dos reatores biológicos era mais escura comparada aos reatores abióticos.

Figura 19 - Reatores Compostos Desnitrificantes no final do ensaio (RCD)



Fonte: Do autor.

As Figuras 20 e 21, demonstram o consumo de nitrato ao longo da operação nos RCD, bem como a remoção de atrazina, respectivamente.

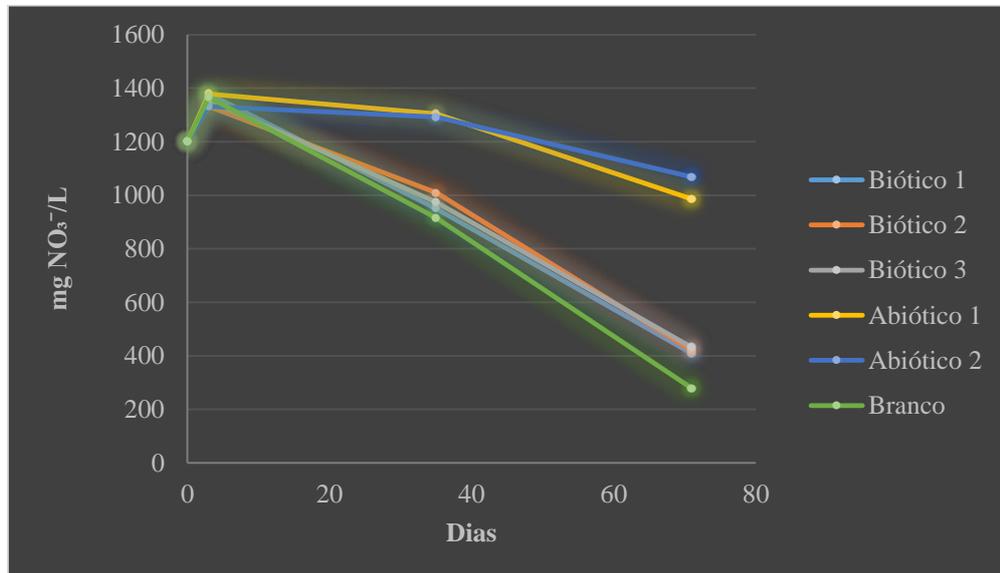
Observou-se após três dias de operação aumento médio de $12 \pm 1\%$ (161 mg/L) no nitrato presente em todos os RCD (Figura 20). Este aumento se deu pela fonte de inóculo empregada, que foi a partir do reator composto (300 mL) operado por 45 dias, este ainda apresentava 48% (620 mg/L) do nitrato total adicionado nos reatores.

Considerando esse aumento do nitrato, observou-se consumo médio de nitrato de $68 \pm 2\%$ (923,3 mg/L) para os reatores bióticos, $24 \pm 6\%$ (328 mg/L) para os abióticos e 80% (1088 mg/L) para o branco, ao final de 68 dias de operação. Esta discrepância nos resultados das diferentes condições de operação indica a ocorrência de atividade biológica nos reatores bióticos em detrimento dos abióticos.

O reator branco apresentou remoção de nitrato superior aos reatores bióticos (22% a mais), o que pode indicar que a comunidade microbiana se desenvolveu melhor na ausência de atrazina, uma vez que sabe-se que este herbicida pode ser utilizado pelos microrganismos após

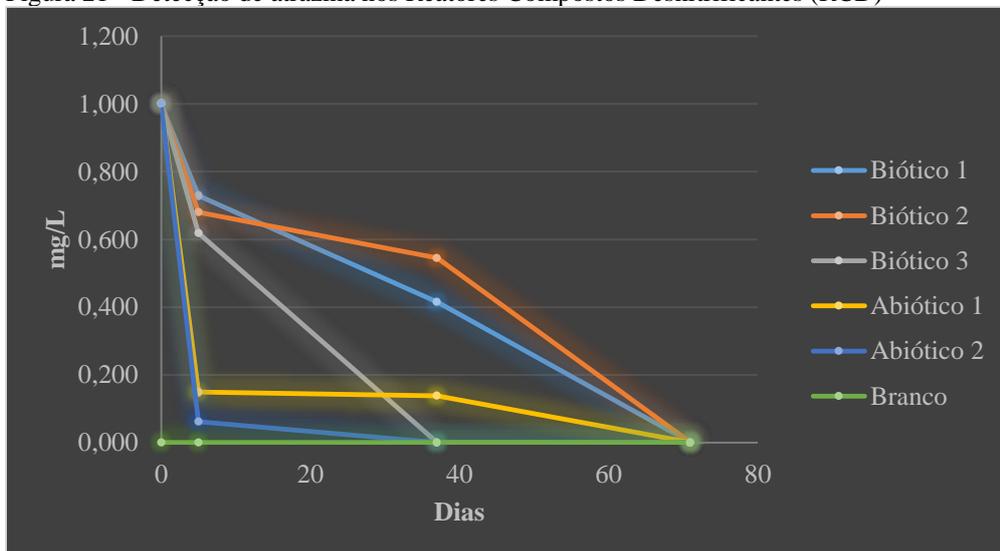
períodos específicos de exposição, havendo portanto, necessidade de adaptação microbiana ao composto (SCHLEDER, 2016).

Figura 20 - Consumo de Nitrato dos Reactores Compostos Desnitrificantes (RCD)



Fonte: Do autor.

Figura 21 - Detecção de atrazina nos Reactores Compostos Desnitrificantes (RCD)



Fonte: Do autor.

Quanto a detecção de atrazina, observou-se uma remoção de 100% de atrazina, tanto nos reatores bióticos quanto nos abióticos. Após 71 dias de análise não detectou-se mais a atrazina, o que sugere que em condições suplementadas a degradação biológica da atrazina é mais rápida.

Para os RCD, diferentemente dos RPA, que utilizaram solo como inóculo, o fenômeno de adsorção não pode ser utilizado como justificativa para a remoção de atrazina nos reatores abióticos. Entretanto, a possibilidade de volatilização e hidrólise química da atrazina são cabíveis nesta situação, da mesma forma como já foi discutida no item 5.1.4.

5.2.2. Reatores Compostos Sulfetogênicos (RCS)

A Figura 22 mostra o aspecto dos RCS no início do período experimental (primeiro dia) pois foi o período em que pode-se identificar maior variação na coloração dos reatores. Após este período os reatores biológicos passaram a apresentar as mesmas características visuais, isto é, coloração mais escura, associada à produção de sulfetos, enquanto que os reatores abióticos mantiveram o tom acinzentado inicial. Após 24h de decantação a fração líquida dos reatores apresentavam pouca coloração, sendo quase totalmente transparentes.

Figura 22 - Aspecto dos Reatores Compostos Sulfetogênicos (RCS)

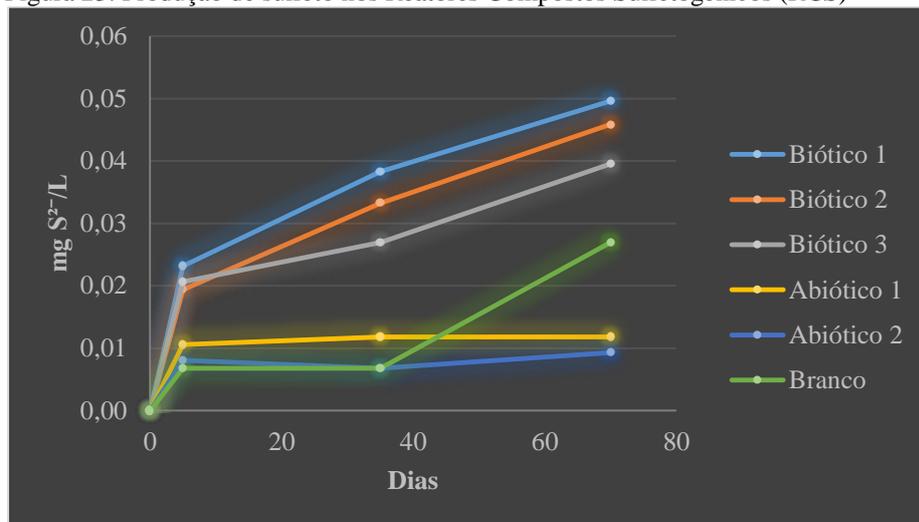


Fonte: Do autor.

Por meio das análises de produção de sulfeto (Figura 23) e consumo de sulfato (Figura 24) pôde-se observar atividade microbiana nos reatores biológicos. A detecção de atrazina nos RCS está demonstrada na Figura 25.

Observou-se produção média de sulfeto de $0,05 \pm 0,01$ mg/L nos reatores bióticos enquanto que nos abióticos não foi detectado produção de sulfeto, sendo encontrado $0,01 \pm 0,00$ mg/L de sulfeto após 3 dias, que se manteve até o final do ensaio. O valor encontrado provém do residual de sulfeto do inóculo utilizado. O reator branco apresentou produção de $0,03$ mg/L de sulfeto, menor do que a dos reatores bióticos.

Figura 23. Produção de sulfeto nos Reatores Compostos Sulfetogênicos (RCS)

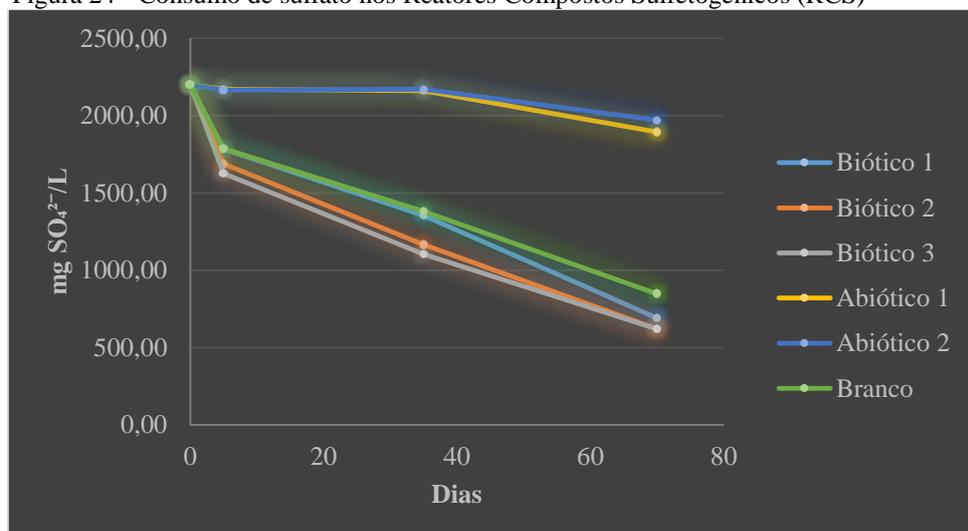


Fonte: Do autor.

Quanto ao consumo médio de sulfato, pôde-se perceber nos reatores bióticos valores mais elevados, $72 \pm 2\%$ (1580 ± 40 mg/L) comparados aos reatores abióticos, $10 \pm 3\%$ (268 ± 54 mg/L) e o branco (62%) ao longo dos 70 dias de operação.

Os resultados encontrados, tanto para a produção de sulfeto quanto para o consumo de sulfato, evidenciam acentuada atividade microbiana nos reatores bióticos. Este fenômeno foi favorecido pelo enriquecimento prévio e adaptação das bactérias nos reatores (300 mL) com 1 mg/L de atrazina. Como esperado, o branco apresentou valores inferiores comparado com os reatores bióticos com atrazina. Provavelmente pelo fato das BRS precisarem de um tempo maior de adaptação à uma nova condição, em que não há mais um dos recursos que elas estavam adaptadas no seu crescimento (DURRUTY; GONZALEZ, 2015).

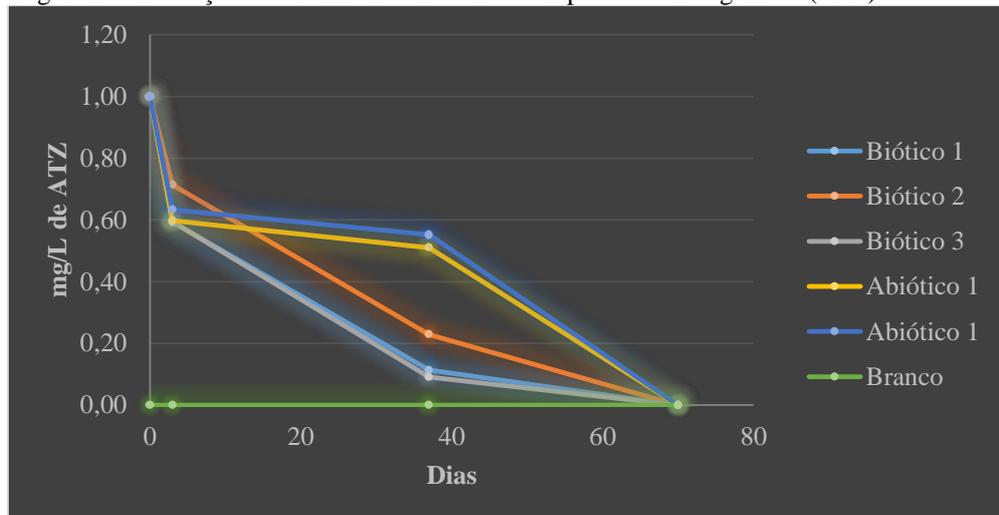
Figura 24 - Consumo de sulfato nos Reatores Compostos Sulfetogênicos (RCS)



Fonte: Do autor.

Após 70 dias de análise foi observada uma remoção de 100% de atrazina em todos os RCS, exceto no branco que em nenhum momento foi detectada atrazina. Observou-se que após 37 dias havia uma remoção média de $89\pm 7\%$ de atrazina nos reatores bióticos para $53\pm 3\%$ de remoção de atrazina nos abióticos. Destaca-se ainda que a remoção de atrazina nos reatores bióticos após 3 dias foi de $59\pm 6\%$ para $53\pm 3\%$ nos reatores abióticos no mesmo período, ou seja, do terceiro dia até o trigésimo sétimo dia, não houve remoção de atrazina nos reatores abióticos.

Figura 25 - Detecção de atrazina nos Reatores Compostos Sulfetogênicos (RCS)



Fonte: Do autor.

Se as bactérias redutoras de sulfato (BRS) estavam adaptadas aos reatores bióticos maiores (de 300 mL) com atrazina e lactato de sódio como fonte suplementar de carbono, ao serem inoculadas em reatores nas mesmas condições, variando apenas pelo volume dos reatores (50 mL) e pela ausência de solo, era esperado que as BRS tivessem um bom crescimento, como de fato foi verificado pelo monitoramento destes reatores. Ao serem inoculadas em um ambiente sem atrazina (reator branco) foram verificados valores de produção de sulfeto e consumo de sulfato menores do que os reatores bióticos, o que também era esperado, uma vez que faltava um recurso ao qual as bactérias já estavam adaptadas a metabolizar.

O processo de remoção de atrazina nos RCS mostra que a atividade microbiana dos reatores bióticos foi mais significativa em um espaço de tempo menor (37 dias) do que os processos não biológicos que podem ter ocorrido nos reatores abióticos.

5.2.3 Reatores Compostos Metanogênicos (RCM)

Comparado com os ensaios anteriores, nos RCM não foi observada alteração de coloração durante o período de operação. Estes reatores mantiveram o seu aspecto visual semelhante durante todo período experimental (Figura 26). Além disso, pode-se verificar na Figura 28 o monitoramento da atrazina no período amostral.

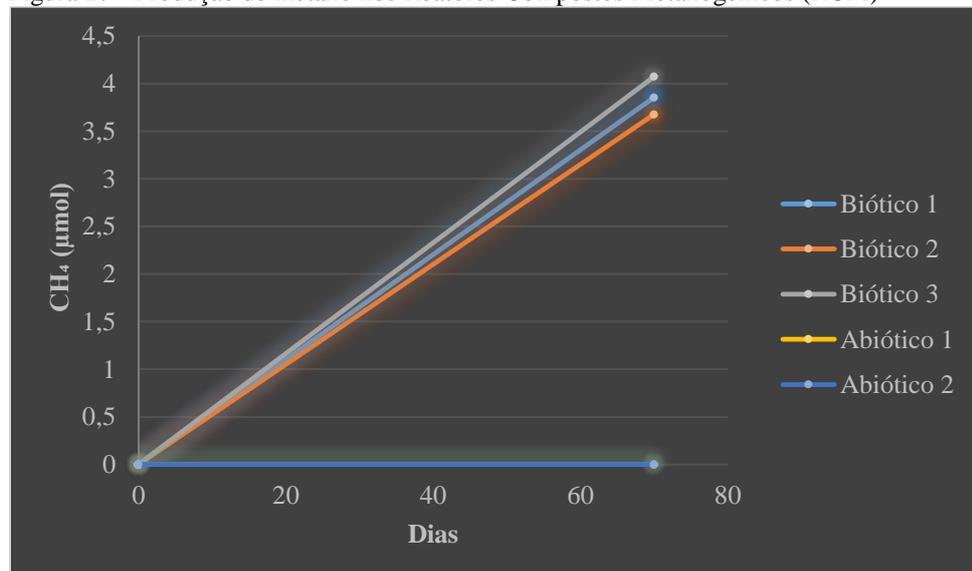
Figura 26 - Reatores Compostos Metanogênicos (RCM)



Fonte: Do autor.

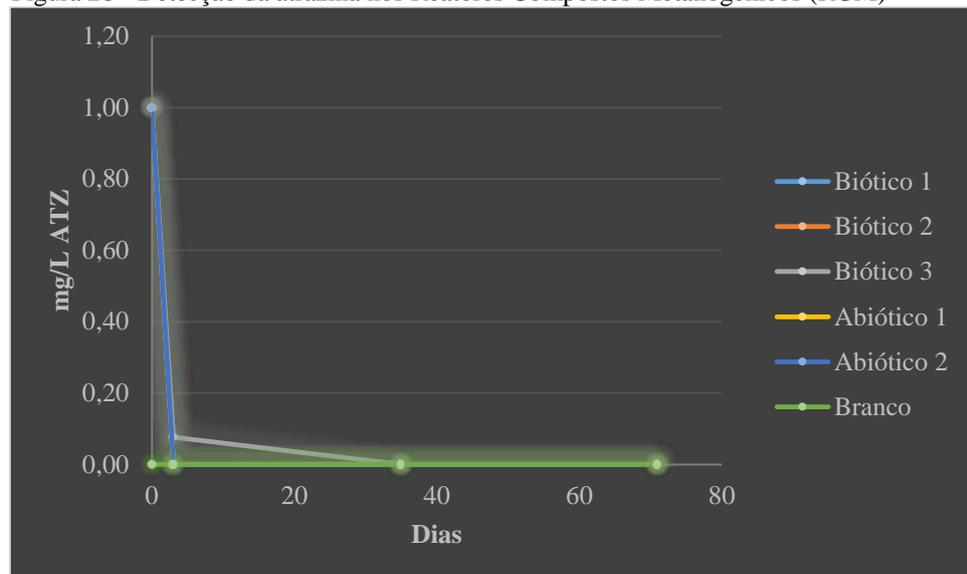
A Figura 27 mostra a produção de metano destes reatores, em que pode-se perceber uma produção média total de $3,9 \pm 0,2$ μmol de metano apenas nos reatores bióticos. Estes resultados mostram que houve atividade metanogênica nos reatores bióticos, enquanto que nos reatores abióticos esta atividade não foi verificada. O reator branco não foi quantificado devido às perdas de gás no headspace.

Figura 27 - Produção de metano nos Reatores Compostos Metanogênicos (RCM)



Fonte: Do autor

Figura 28 - Detecção da atrazina nos Reatores Compostos Metanogênicos (RCM)



Fonte: Do autor.

Nos RCM observou-se rápida remoção de atrazina após três dias de operação (100%). Este resultado sugere que, para condição metanogênica, é necessário monitoramento da remoção deste composto em intervalos de tempo menores.

5.2.4 Considerações Gerais sobre os Reatores Compostos Anaeróbios (Desnitrificantes, Sulfetogênicos e Metanogênicos)

Em todos os RCA pôde-se perceber rápida remoção de atrazina (RCM>RCD>RCS). Estes resultados revelam que estudos envolvendo a degradação desse composto em condições com bactérias enriquecidas/adaptadas e inoculadas em reatores suplementados com outras fontes de carbono deve ser estudado em intervalo de tempo menor do que o estudo de reatores sem enriquecimento prévio e suplementação. Uma vez que, no primeiro caso a concentração celular é muito superior e, provavelmente, o metabolismo mais acelerado.

Além disso, os resultados encontrados nos reatores abióticos mostram a necessidade de estudos mais específicos sobre os processos físico-químicos que podem acontecer dentro destes reatores. Outro fato importante a ser destacado é que não houve detecção de intermediários metabólicos da atrazina em nenhum dos RCA estudados, o que pode ser mais um indicador de que os processos de degradação foram tão rápidos que nem a detecção de intermediários metabólicos foi possível.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Tendo em vista os resultados encontrados nesta pesquisa, pode-se destacar a importância do desenvolvimento de alguns trabalhos específicos no ramo, dentre eles, destacam-se:

- a. Análises mais aprofundadas nos reatores abióticos, como a variação do conteúdo orgânico do solo e possíveis reações físico-químicas nestes reatores.
- b. Avaliação da adsorção do herbicida estudado no solo, tal como a avaliação da fração gasosa dos reatores, além da fração líquida.
- c. Variação de parâmetros operacionais dos reatores, como temperatura, fonte de carbono e rotação.
- d. Variação na concentração de atrazina utilizada nos reatores e/ou do volume líquido total.
- e. Redução do intervalo de monitoramento dos reatores.

Estas são algumas das principais sugestões que podem trazer esclarecimentos sobre os processos de degradação da atrazina.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa mostra que a atrazina é um composto que pode sofrer diferentes tipos de processos de degradação, e que estes processos dependem de condições ambientais específicas, como ação microbiana e condições físico-químicas do ambiente, além de características intrínsecas deste herbicida.

O presente estudo também mostrou que para os RPA a remoção de atrazina foi mais lenta, o que pode estar relacionada à processos de adsorção e lenta atividade biológica, uma vez que não houve enriquecimento prévio das populações microbianas presentes nestes reatores. Já para os RCA, observou-se que o processo de remoção de atrazina foi mais rápido, o que demanda menor intervalo de tempo para a realização do monitoramento da degradação do composto nessa condição operacional.

Tanto para os RPA quanto para os RCA não houve variação considerada relevante na remoção de atrazina, o que coloca os diferentes meios de oxirredução estudados em um patamar bem próximo.

A partir dos resultados obtidos neste estudo, sugere-se maior aprofundamento em pesquisas envolvendo reatores abióticos, contemplando análises da fração sedimentar, assim como da fração gasosa dos RPA bem como dos RCA, a fim de detectar atrazina nestas matrizes, uma vez que a atrazina é móvel e pode ser encontrada tanto na fração líquida, como também na fração sólida e/ou gasosa.

Estes resultados podem contribuir para análise mais completa sobre o comportamento deste composto no meio ambiente, assim como as principais variáveis que implicam no seu deslocamento e degradação. Desta forma, o presente trabalho abre luz sobre a amplitude de pesquisas que podem ser desenvolvidas nessa área, e ressalta a importância destas informações para a tomada de decisão pelos órgãos públicos e para projetos de biorremediação de áreas contaminadas com atrazina.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, S. Solid-phase extraction based on multi-walled carbon nanotube (MWCNT) sorbents combined with bio-coacervation extraction for the determination of atrazine from water samples followed by HPLC analysis. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 0, n. 0, p. 0, 2018.
- ABIGAIL, E. A.; LAKSHIMI, V.; DAS, N. Biodegradation of atrazine by *Cryptococcus laurentii* isolated from contaminated agricultural soil. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 2, n. 3, p. 450–457, 2012.
- ACCEPTS, A. E. M.; SOCIETY, A.; RESERVED, A. R. Growth of anaerobic methane oxidizing archaea and sulfate reducing bacteria in a high pressure membrane-capsule bioreactor. **Applied and Environmental Microbiology**, December, 2014.
- ADRIAN, N. R.; SUFLITA, J. M. Reductive Dehalogenation of a Nitrogen Heterocyclic Herbicide in Anoxic Aquifer Slurries. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 292–294, 1990.
- AHARON, P.; FU, B. Microbial sulfate reduction rates and sulfur and oxygen isotope fractionations at oil and gas seeps in deepwater Gulf of Mexico. **Geochimica et Cosmochimica**, v. 64, n. 2, p. 233–246, 2000.
- AISLABIE, J. et al. Characterization of *Arthrobacter nicotinovorans* HIM , an atrazine-degrading bacterium , from agricultural soil New Zealand. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 52, n. August, p. 279–286, 2018.
- ALMEIDA, L. DA S.; GUIMARÃES, E. C. Space distribution of the ctc and the relationship macronutrients in a red-yellow latosol cultivated with coffee. **Agronomic Culture**, p. 625–639, 2017.
- ALTMANN, J. et al. Combination of granular activated carbon adsorption and deep-bed filtration as a single advanced wastewater treatment step for organic micropollutant and phosphorus removal. **Water Research**, v. 92, p. 131–139, 2016.
- ARIOLE, C. N.; ABUBAKAR, A. Biodegradation of Atrazine by Bacteria Isolated from Lotic Water. **Journal of Applied Life Sciences International**, v. 2, n. 3, p. 119–125, 2015.
- BALESTEROS, M. R. **Development and optimization of methodology for the analysis of atrazine and its degradation products by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis**. Juiz de Fora, 2009.
- BARBOSA, R. DE A. **Sulfet removal and obtaining elemental sulfur in uasb reactors with oxidant addition.**, 2017.
- BATSTONE, D. J. et al. The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1). **Water Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 65–74, 2002.
- BATSTONE, D. J.; LU, Y.; JENSEN, P. D. Impact of dewatering technologies on specific methanogenic activity. **Water Research**, v. 82, n. October, p. 78–85, 2015.
- BEHKI, R. et al. Metabolism of the Herbicide Atrazine by *Rhodococcus* Strainst. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 1955–1959, 1993.
- BERTELKAMP, C. et al. The effect of redox conditions and adaptation time on organic micropollutant removal during river bank filtration : A laboratory-scale column study *Science of the Total Environment* The effect of redox conditions and adaptation time on organic micropollutant removal during river bank filtration : A laboratory-scale column study. **Science of the Total Environment**, v. 544, February 2016, p. 309–318, 2018.
- BERTICELLI, R. et al. Compostagem Como Alternativa De Biorremediação De Áreas Contaminadas. **Revista CIATEC – UPF**, v. 8, n. 1, p. 12–28, 2016.

- BILLEMONT, P.; COASNE, B.; DE WEIRELD, G. Adsorption of carbon dioxide-methane mixtures in porous carbons: Effect of surface chemistry. **Adsorption**, v. 20, n. 2–3, p. 453–463, 2014.
- BOE, K. et al. State indicators for monitoring the anaerobic digestion process. **Water Research**, v. 44, n. 20, p. 5973–5980, 2017.
- BONFLEUR, E. J. **Behavior of the association between the herbicides glyphosate and atrazine in a dark red Latosol of the Brazilian cerrado biome** Piracicaba, 2010.
- BOUALLAGUI, H. et al. Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 989–995, 2005.
- BOWLES, M. W. et al. Global Rates of Marine Sulfate Reduction and Implications for Sub – Sea-Floor Metabolic Activities. **Scienceexpress**, n. May, p. 1–7, 2014.
- BRAND, A. R. et al. Use of Microorganisms for Bioremediation of Impacted Environments. **Rev. Elet. em Gestão Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 6, n. 6, p. 975–1006, 2012.
- CALLADO, N. H.; DAMIANOVIC, M. H. Z.; FORESTI, E. Influence of COD/[SO₄²⁻] ratio and Na⁺ concentration on organic matter and sulfate removal in UASB reactor. **Sanitary and Environmental Engineering Journal**, 2016.
- CAMPANARI, M. F. Z. **Metagenomics of Atrazine Degradation in Soil Under Different Agricultural and Semidecidual Forest Management**, 2017.
- CAO, H. et al. Microbial Sulfur Cycle in Two Hydrothermal Chimneys on the. **mbio**, v. 5, n. 1, p. 1–11, 2014.
- CHEN, Y.; CHENG, J. J.; CREAMER, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4044–4064, 2008.
- CHEN, Z. et al. Denitrification nitrogen gas formation and gene expression in alpine grassland soil as affected by climate change conditions Soil Biology & Biochemistry Relationships between denitrification gene expression, dissimilatory nitrate reduction to ammonium and nitrous oxide and dinitrogen production in montane grassland soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 87, p. 67–77, 2016.
- CHIARELLO, M. et al. Determination of pesticides in water and sediments by HPLC-HRMS and their relation with the use and occupation of soil. **New Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 158–165, 20 out. 2016.
- COELHO, E. R. C.; BARNARDO, L. DI. The presence and the removal of atrazine, deethylatrazine, deisopropylatrazine and deethylhidroxiatrazine in a pilot plant consisted of ozonation and slow sand filtration. **Sanitary and Environmental Engineering**, p. 789–796, 2017.
- COLLA, L. M. Biosurfactants in Bioremediation Process. **Exact and Natural Sciences Journal**, n. August, 2015.
- CONAMA. Resolução n. 357 p. 58–63, 2005.
- DANG, H.; LOVELL, C. R. Microbial Surface Colonization and Biofilm Development in Marine Environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 91–138, 2016.
- DELAUNE, R. D. et al. The influence of soil redox conditions on atrazine degradation in wetlands. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 66, n. 1, p. 1–87, 1997.
- DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. **Brazilian Journal of Agricultural and Environmental Engineering**, 2015.
- DENNIS, K. E. Using the sulfur cycle to constrain changes in seawater chemistry during the paleogene. **Syracuse University Surface**, 2015.

- DOUGLASS, J. F.; RADOSEVICH, M.; TUOVINEN, O. H. Mineralization of atrazine in the river water intake and sediments of a constructed flow-through wetland. **Ecological Engineering**, v. 72, n. August 2015, p. 35–39, 2014.
- DUARTE, N. C. **Effect of the concentration of organic matters in dinitrification in a reactor of packaged and UASB**. Campinas, 2018.
- DURRUTY, I.; GONZALEZ, J. F. Effect of Alternative Nutrient Sources During Anaerobic Degradation of Potato Wastewater. **Science, Technology and Development**, v. 34, n. 2, p. 94–100, 2015.
- FAZLURRAHMAN et al. Isolation and characterization of an atrazine-degrading *Rhodococcus* sp. strain MB-P1 from contaminated soil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, p. 721–729, 2009.
- FEIJOO, G. et al. Sodium inhibition in the anaerobic digestion process : Antagonism and adaptation phenomena. **Enzyme and Microbial Technology**, 2018.
- FERNADES, A. F. T. **Caracterização fenotípica e molecular de linhagens de *Pseudomonas* spp . envolvidas na biodegradação da atrazina** **Caracterização fenotípica e molecular de linhagens de *Pseudomonas* spp . envolvidas na biodegradação da atrazina**, 2014.
- FREEMAN, J.; THANKI, D. Water contaminated with the herbicide atrazine. **Journal of Purdue Undergraduate Research**, v. 1, p. 57–64, 2017.
- FURLAN, RG; MARTINS, JF; SANTOS, JI; ALVES, P. Simulation of the residual effect of atrazine on carrot. **Horticultura Brasileira**, v. 0, p. 584–587., 2016.
- GARGOURI, B. et al. Isolation and Characterization of Hydrocarbon-Degrading Yeast Strains from Petroleum Contaminated Industrial Wastewater. **BioMed Research International**, p. 1–11, 2015.
- GIARDI, M. T.; GIARDINA, M. C.; FILACCHIONI, G. Chemical and Biological Degradation of Primary Metabolites of Atrazine by a *Nocardia* Strain. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 1369, 2014.
- GOMES, P. S. P.; SANTOS, L. B. DE O. DOS; SILVA, L. M. C. **Study of herbicide atrazine recovery in natural waters using High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**, 2004.
- GU, J.; FAN, Y.; GU, J. Biodegradability of Atrazine , Cyanazine and Dicamba under methanogenic condition in three soils of China. **Chemosphere**, v. 52, p. 1515–1521, 2003.
- HARDISON, A. K. et al. ScienceDirect Influence of organic carbon and nitrate loading on partitioning between dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) and N₂ production. **GEOCHIMICA ET COSMOCHIMICA ACTA**, v. 164, p. 146–160, 2015.
- HUNTER, W. J.; SHANER, D. L. Nitrogen limited biobarriers remove atrazine from contaminated water : Laboratory studies. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 103, n. 1–2, p. 29–37, 2009.
- JADEJA, N. B.; MOHARIR, P.; KAPLEY, A. Genome Sequencing and Analysis of Strains *Bacillus* sp . AKBS9 and *Acinetobacter* sp . AKBS16 for Biosurfactant Production and Bioremediation Genome Sequencing and Analysis of Strains *Bacillus* sp . AKBS9 and *Acinetobacter* sp . AKBS16 for Biosurfactant. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. July, 2018.
- JAVARONI, R. D. C. A.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O. Behavior of the herbicides atrazine and alachlor applied to soil prepared for the cultivation of sugarcane. **New Chemistry**, n. February 1999, 2016.
- JENKINS, J. J. Atrazine degradation by bioaugmented sediment from constructed wetlands. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2015.
- KABRA, A. N. et al. Toxicity of atrazine and its bioaccumulation and biodegradation in a green microalga, *Chlamydomonas mexicana*. **Environmental Science and Pollution Research**, n. October,

p. 12270–12278, 2014.

KANISSERY, R. G.; SIMS, G. K. Biostimulation for the Enhanced Degradation of Herbicides in Soil. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2011, 2011.

KOLEKAR, P. D.; PHUGARE, S. S.; JADHAV, J. P. Biodegradation of atrazine by *Rhodococcus* sp. BCH2 to N-isopropylammelide with subsequent assessment of toxicity of biodegraded metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 3, p. 2334–2345, 2014.

KUMAR, P.; PHILIP, L. Atrazine degradation in anaerobic environment by a mixed microbial consortium. **Water Research**, v. 38, p. 2277–2284, 2004.

LA CECILIA, D.; MAGGI, F. Kinetics of atrazine, deisopropylatrazine, and deethylatrazine soil biodecomposers. **Journal of Environmental Management**, v. 183, n. September, p. 673–686, 2016.

LIN, Z. et al. Sulfur isotopic evidence for the origin of elemental sulfur in gas hydrate-bearing sediments of the northern South China Sea. **Geophysical Research Abstracts**, v. 19, n. 1993, p. 2502, 2017.

MA, L. et al. Rapid biodegradation of atrazine by *Ensifer* sp. strain and its degradation genes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 116, n. November 2016, p. 133–140, 2017.

MACHADO, C. S. et al. Atrazine in river water: human health risk assessment by recreational exposure. **Environmental Management and Sustainability Journal**, v. 7, n. 2, p. 36–46, 2018.

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

MARTINS, C. X. et al. Analysis of atrazine in water and soil samples by gas chromatography (GC-ECD). **Bioenergia em revista**, p. 128–138, 2014.

MAURO, T.; CAMPOS, P. D. E.; LANGENBACH, T. Atrazine adsorption in tropical soil under direct and conventional plantio. **Ecotoxicology and the Environment Journal**, p. 37–46, 2007.

NEIVERTH, C. A. Determination of atrazine in water using solid phase extraction and gas chromatography coupled to mass spectrometry. **Ambiência Guarapuava**, v. 1, p. 475–482, 2015.

OLIVEIRA, D. A. DO C. A. P. B. DO C. J. M. B. P. J. L. M. Comportamento ambiental e toxicidade dos herbicidas atrazina e simazina. **Revista Ambiente e Agua**, 2013.

OLIVEIRA, G. W. DE. **Aspects of atrazine behavior in soil and potential environmental effects**, 2015.

PACWA-PŁOCINICZAK, M. et al. Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 15, p. 9385–9395, 2014.

PARENTE, T. C. **Intensification of agricultural use in the sector sucroenergético, highlighting the transportation of atrazine and nutrients by superficial flow**, 2018.

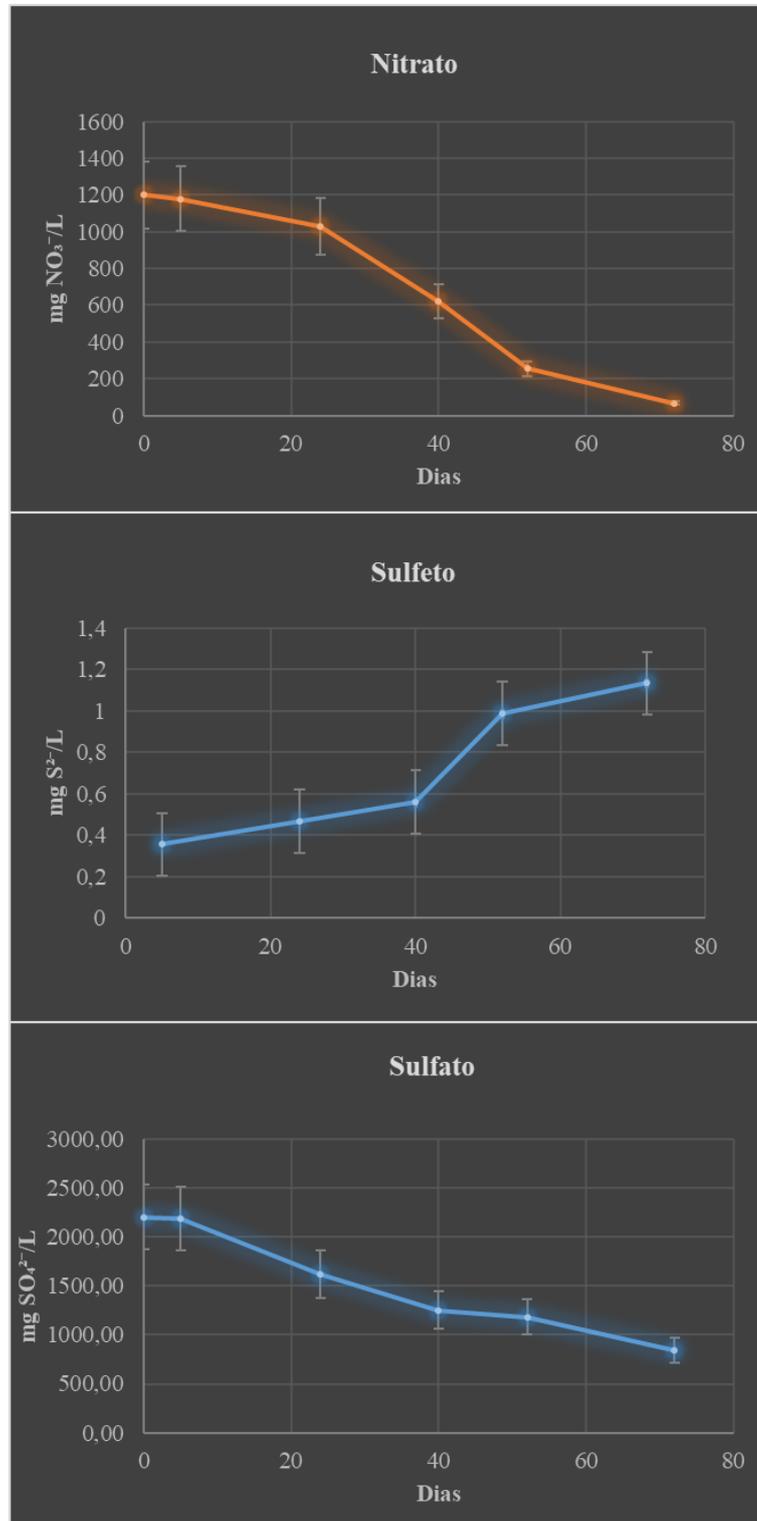
POLONIO, J. C. et al. Potencial biorremediador de microrganismos: Levantamento de resíduos industriais e urbanos tratáveis no município de Maringá-PR. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 3, n. 2, p. 31, 2014.

POUS, N. et al. Opportunities for groundwater microbial. **Microbial Biotechnology**, 2018.

QIAN, J. et al. Free sulfurous acid (FSA) inhibition of biological thiosulfate reduction (BTR) in the sulfur cycle-driven wastewater treatment process. **Chemosphere**, 2017.

- QUEIROZ, B. P. V.; MONTEIRO, R. T. R. Degradation of 14 c-atrazine in soil under semicontrolled conditions 1. **SciELO**, p. 849–856, 2000.
- RAJAGOPAL, R.; MASSÉ, D. I.; SINGH, G. A Critical Review on Inhibition of Anaerobic Digestion Process by Excess Ammonia Bioresource Technology A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. **Bioresource Technology**, v. 143, n. February 2018, p. 632–641, 2013.
- ROBERTSON, E. K. et al. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium coupled to Fe (II) oxidation in sediments of a periodically hypoxic estuary. **Limnology and Oceanography**, n. x, p. 365–381, 2016.
- RODR, D. M. Bioremediation of petroleum derivative using biosurfactant produced by serratia marcescens ucp / wfcc 1549 in low-cost medium. v. 4, p. 550–562, 2015.
- ROLAND, F. A. E. et al. Denitrification, anaerobic ammonium oxidation, and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in an East African Great Lake. **Limnology and Oceanography**, 2017.
- SHELLER, S. et al. Artificial electron acceptors decouple archaeal methane oxidation from sulfate reduction. **science**, v. 703, n. February, 2016.
- SCHLEDER, A. A. **Evaluation of the occurrence of NO₃ -, coliforms and atrazine in karst aquifer, Colombo, PR**, 2016.
- SENE, L. et al. New Aspects on Atrazine Biodegradation. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 53, n. April, p. 487–496, 2010.
- SILVA, A. A. DA. **Bioprospecting of bacteria with atrazine degradation potential in sugarcane plantations in the state of Mato Grosso do Sul**. [s.l: s.n.].
- SILVA, M. I. DA; BORTOLI, Á. L. DE. Modeling and simulation of the biogas formation process. **Proceeding Series of the Brazilian Society of Computational and Applied Mathematics**, v. 6, n. Xxxvii, p. 1–7, 2018.
- SOUZA, E. L. DE et al. Resíduos contaminantes no solo: possibilidades e consequências. **Journal of Environmental Management and Sustainability**, p. 484–509, 2018.
- SOUZA, M. L. D. E. et al. Cloning , Characterization , and Expression of a Gene Region from Pseudomonas sp . Strain ADP Involved in the Dechlorination of Atrazine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 9, p. 3373–3378, 1995.
- SOUZA, M. L. D. E. et al. Molecular Basis of a Bacterial Consortium : Interspecies Catabolism of Atrazine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 178–184, 1998.
- SWISSA, N. et al. Biofilter based on a biofilm immobilized on geo-textile sheets for rapid atrazine biodegradation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 105 p. 146–152, 2015.
- TOMASSONI, F. et al. Soil Bioremediation Technique. **ActaIguazu**, v. 3, n. 3, p. 46–56, 2014.
- TUOVINEN, O. H. et al. Kinetics of aerobic and anaerobic biomineralization of atrazine in surface and subsurface agricultural soils in Ohio. **Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes**, v. 50, n. 10, p. 718–726, 2015.
- VAIL, A. W. et al. Biodegradation of atrazine by three transgenic grasses and alfalfa expressing a modified bacterial atrazine chlorohydrolase gene. **Transgenic Research**, v. 24, n. 3, p. 475–488, 2014.
- VILCÁEZ, J. Numerical modeling and simulation of microbial methanogenesis in geological CO₂ storage sites **Journal of Petroleum Science and Engineering Numerical modeling and simulation of microbial methanogenesis in geological CO₂ storage sites. Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 135, n. November 2015, p. 583–595, 2017.

- WANG, D. T. et al. Nonequilibrium clumped isotope signals in microbial methane 3. **Science**, 2015.
- WILKIE, A. et al. Enhancement of Anaerobic Methanogenesis from Napiergrass by Addition of Micronutrients. **Biomass**, v. 11, n. 7557, p. 135–146, 1986.
- WJ, P. et al. The aerobic life paradox. **Journal of Amazon Health Science**, v. 6637, n. Km 04, p. 11–35, 2013.
- YAMADA, C. et al. Inhibitory Effects of Ferrihydrite on a Thermophilic Methanogenic Community. **Microbes and Environments**, v. 29, n. 2, p. 227–230, 2014a.
- YAMADA, C. et al. Conductive iron oxides accelerate thermophilic methanogenesis from acetate and propionate. **Jornal of Bioscience and Bioengineering**, p. 1–5, 2014b.
- YANZE-KONTCHOU, C.; GSCHWIND, N. Mineralization of the Herbicide Atrazine as by a Pseudomonas Strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4297–4302, 1994.
- YEN, H.; BRUNE, D. E. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 130–134, 2007.
- YUE, L. et al. Adsorption – desorption behavior of atrazine on agricultural soils in China. **Journal of Environmental Sciences**, v. 57, 2016.
- ZHANG, C. et al. Effects of carbon nanotubes on atrazine biodegradation by *Arthrobacter* sp. **Journal of Hazardous Materials**, v. 287, p. 1–6, 2015.

APÊNDICES**APÊNDICE A - Reatores de 300 mL utilizados como inóculo: monitoramento de nitrato, sulfeto, sulfato**

ANEXOS

ANEXO A - Bacia Hidrográfica Sangas Memória I e II

