

Artigo Técnico

# Biodegradação do herbicida atrazina por *Saccharomyces cerevisiae*

*Biodegradation of the atrazine herbicide by Saccharomyces cerevisiae*

Nathalia Toller<sup>1\*</sup> , Elisete Guimarães<sup>1</sup> , Claudia Bravo<sup>1</sup> 

## RESUMO

Tendo em vista os vários problemas ambientais e de saúde que o uso crescente de agrotóxicos vem causando, é necessário a otimização de técnicas que visem a sua rápida degradação. A atrazina é um herbicida utilizado no controle de ervas daninhas, principalmente nas culturas de milho e cana-de-açúcar. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi verificar a eficiência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na degradação do herbicida atrazina em solo contaminado com diferentes concentrações do produto comercial. Foi igualmente testado o efeito da adição de palha de milho no experimento. A fim de determinar a quantidade de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) liberado durante os ensaios, o qual reflete a atividade da microbiota do solo responsável pela degradação de compostos orgânicos, foi utilizada a técnica da respiração basal do solo. E, paralelamente a isso, para verificar a concentração de atrazina ao longo do experimento (tempo inicial, aos 7, 14 e 63 dias), foi utilizada a análise de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS). Por meio da análise estatística dos dados de respiração basal do solo, o fator de bioaumento com a levedura foi o mais significativo, seguido da adição de palha de milho. Verificou-se o declínio da concentração de atrazina por intermédio das análises cromatográficas. Assim, sugere-se que a biorremediação com *S. cerevisiae* tem potencial para elevar as taxas de degradação do herbicida no solo.

**Palavras-chave:** bioaumento; agrotóxicos; respiração basal do solo; taxa de degradação.

## ABSTRACT

Considering the various environmental and health problems that the increasing use of pesticides has been causing, it is necessary to optimize techniques aimed at their rapid degradation. Atrazine is a herbicide used to control weeds, especially in maize and sugarcane crops. Thus, the objective of this study was to verify the efficiency of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast in the degradation of the herbicide atrazine in soil contaminated with different concentrations of the commercial product. The effect of addition of corn straw on the experiment was also tested. In order to determine the amount of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) released during the tests, which reflects the activity of the soil microorganism responsible for the degradation of organic compounds, the soil basal respiration technique was used. At the same time, the concentration of atrazine during the experiment (start time, at 7, 14, and 63 days) was analyzed by gas chromatography coupled to the mass spectrometer (CG-MS). Through the statistical analysis of the basal respiration data of the soil, the bioaugmentation factor with yeast was the most significant, followed by the addition of corn straw, and the decline in atrazine concentration was verified through chromatographic analyses. Thus, it is suggested that bioremediation with *S. cerevisiae* has the potential to increase the rates of degradation of the herbicide in the soil.

**Keywords:** bioaugmentation; pesticides; basal soil respiration; rate of degradation.

## INTRODUÇÃO

Atualmente, a busca pela maior produção de alimentos em espaços cada vez menores vem causando sérios impactos ambientais pela intensa utilização de agroquímicos no controle de pragas e doenças ou para fertilizar o solo. Em razão das características de solubilidade, adsorção, deslocamento, persistência e toxicidade, esses produtos químicos apresentam grande potencial em contaminar solos, águas superficiais e subterrâneas (BENEVIDES; MARINHO, 2015).

A atrazina (2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamina-s-triazina) é um dos herbicidas da classe das triazinas mais utilizados em função de seu amplo espectro

para o controle de ervas daninhas de folhas largas, baixo custo e por apresentar efeito residual no solo (MANDELBAUM; ALLAN; WACKETT, 1995). Esse herbicida é frequentemente utilizado nas culturas de milho, cana-de-açúcar, sorgo e em pastagens (BALCI *et al.*, 2009).

A elevada persistência da atrazina nos solos e sedimentos é devido à sua alta capacidade de adsorção em argilas e materiais carbonáceos. A atrazina é relativamente solúvel em água e o mecanismo de ação desse pesticida é bloquear a fotossíntese pela interrupção da reação de Hill da planta no estágio fotoquímico, causando clorose e necrose foliar (JAVARONI; LANDGRAF; REZENDE, 1999; BAIRD; CANN, 2011; MARCHESAN, 2016).

<sup>1</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Francisco Beltrão (PR), Brasil.

\*Autora correspondente: nathaliatoller@hotmail.com

Conflitos de interesse: os autores declaram não haver conflito de interesses.

Financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Recebido: 22/03/2019 - Aceito: 07/07/2020 - Reg. ABES: 20190089

Em seres humanos e animais, a atrazina atua no sistema endócrino, tendo uma toxicidade crônica relativamente alta. Vários estudos sugerem que a atrazina apresenta um potencial efeito carcinogênico, além de ser apontada como causadora de efeitos no sistema nervoso central, no sistema reprodutivo, no sistema imunológico e na função cardiovascular (SINGH; SINGH, 2016).

Sendo a atrazina um produto orgânico recalcitrante, a sua remoção e/ou degradação no ambiente não é um trabalho fácil. Uma alternativa para transformar contaminantes do solo em produtos menos tóxicos ou completamente convertidos em matéria inorgânica, água, dióxido de carbono e amônia é a biorremediação, na qual são utilizados microrganismos a fim de acelerar esse processo. Geralmente, os processos biológicos são menos onerosos, porém requerem a presença de organismos com efetivo potencial de biotransformação ou biossorção, além de condições que favoreçam esse processo (CARMO *et al.*, 2013; TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010).

Algumas espécies microbianas isoladas de solo são capazes de metabolizar parcialmente os compostos triazínicos, tais como *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Rhodococcus* NI86/21, TE1 e B-30, *Aspergillus fumigatus* e *Rhizopus stolonifer* (BEHKI; KHAN, 1986; 1994).

Trabalhos mais recentes apresentam outras espécies e estirpes microbianas que também exibem potencial em metabolizar a atrazina: *Arthrobacter* sp. (WANG; XIE, 2012), *Arthrobacter* sp. C3 (WANG *et al.*, 2016), *Bacillus subtilis* estirpe HB-6 (WANG *et al.*, 2014), *E. cloacae* estirpe JS08 (SOLOMON; KUMAR; SANTHI, 2013; SOLOMON *et al.*, 2013), *Ensifer* sp. (MA *et al.*, 2017), *Pseudomonas* sp. ZXY-1 (ZHAO *et al.*, 2017) e *Xanthomonas* sp. ARB2 (SAWANGJIT, 2016).

A levedura *S. cerevisiae* é um microrganismo aeróbio facultativo, não patogênico e muito utilizado na produção de cerveja, vinho e na panificação, o qual apresenta boa tolerância ao estresse osmótico e ao etanol (BADOTTI *et al.*, 2010). Em razão de suas capacidades metabólicas, essa levedura apresenta papel importante na biorremediação ambiental, além de apresentar baixa toxicidade e a biomassa de *S. cerevisiae* ser um resíduo da indústria cervejeira (FERREIRA *et al.*, 2010; JOHNSON, 2013).

Alguns estudos apontam a *S. cerevisiae* com potencial em remover vários tipos de corantes têxteis diazo (AKSU, 2003). A biomassa de *S. cerevisiae* também foi utilizada como adsorvente na remoção de chumbo (Pb<sup>2+</sup>) (FERREIRA *et al.*, 2007), além de possuir capacidade de bioacumular diversos metais como prata, cádmio, cobalto, cobre, urânio, zinco e tório (LEMOS *et al.*, 2008). Também, em estudo recente, foi utilizado um bionanocompósito magnético de *S. cerevisiae* e óxido de ferro na remoção de atrazina em solução aquosa (ZHU *et al.*, 2018).

Nessa perspectiva, o uso de técnicas que visem otimizar o processo de biodegradação dos agrotóxicos no solo é de suma importância. Assim, o presente trabalho teve como objetivo verificar a degradação do herbicida atrazina, utilizando, para isso, a técnica de bioaumento com *S. cerevisiae*, proveniente do resíduo de levedura do processo de produção de cerveja, e adição de palha de milho. O solo utilizado apresentava histórico de utilização da atrazina e foi contaminado com várias concentrações do produto comercial Atrazina Atanor SC (dose recomendada — DR; triplo da DR e quádruplo da DR).

## METODOLOGIA

Para verificar a capacidade de degradação do herbicida atrazina pela levedura *S. cerevisiae*, preparou-se 50 mL de meio de cultura líquido para

leveduras (YW) e adicionou-se 5 mL da levedura residual de cervejaria (Fermentis S04). O meio de cultura foi incubado em agitador orbital a 28°C e 150 rpm, durante 12 h. Após o período de incubação, o inóculo a ser testado foi padronizado pela Escala de Mc Farland nº 0,5, com aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  células mL<sup>-1</sup>.

Após a padronização do inóculo, esse foi incubado durante 24 h a 25°C para que toda a reserva de glicogênio fosse consumida. Então, foram inoculadas alíquotas de 5,0 µL do inóculo padronizado em placas de Petri com o meio de cultura Yeast Nitrogen Base (YNB) com atrazina nas doses 5 e 25 g.L<sup>-1</sup> e YNB com glicose 0,5 mol.L<sup>-1</sup> (controle), e incubadas a 25°C por 48 h. Após o período de incubação, a capacidade de degradação da atrazina pela levedura foi avaliada observando-se a densidade celular por meio da comparação de crescimento entre as colônias nos meios de cultura com o herbicida atrazina e com glicose.

O solo utilizado no experimento foi coletado no município de Francisco Beltrão, em área agrícola com histórico de aplicações intensivas do herbicida atrazina para a cultura de milho (26°00'31" S; 52°56'36" O). As amostras foram coletadas com profundidade de 0 a 20 cm, totalizando 20 subamostras de solo que foram coletadas dentro de uma área aproximada de 2 ha. De cada subamostra, foram retiradas alíquotas de cerca de 200 g, que foram peneiradas em malha 2 mm e homogeneizadas, a fim de se obter uma amostra composta.

O planejamento experimental fatorial completo com duas repetições no ponto central foi aplicado para determinar a influência no efeito e interações de diferentes concentrações do herbicida atrazina, da levedura residual de cerveja e da palha de milho na biodegradação do herbicida atrazina no solo (Tabelas 1 e 2). O solo foi contaminado com atrazina formulada comercialmente,

**Tabela 1** - Variáveis independentes e seus respectivos níveis.

Variáveis	Nível (-1)	Nível (0)	Nível (+1)
Palha de milho (g)	0	0,5	1
Resíduo de levedura (mL)	0	5	10
Dose de atrazina (µL)	50	150	250

Fonte: Autoria própria (2018).

**Tabela 2** - Matriz do planejamento experimental 2<sup>3</sup> (3 fatores e 2 níveis de variação com duas repetições no ponto central).

Ensaio	Palha de milho	Levedura	Dose de atrazina
1	0	0	50
2	0	0	250
3	0	10	50
4	0	10	250
5	1	0	50
6	1	0	250
7	1	10	50
8	1	10	250
9	0,5	5	150
10	0,5	5	150

Fonte: Autoria própria (2018).

Atrazina Atanor 50 SC, conforme a DR em campo, o triplo da DR e o quádruplo da DR, para um volume de 100 g de solo.

A levedura utilizada foi proveniente do processo de produção de cerveja, sendo utilizada a levedura residual do fermento comercial Fermentis S04. A palha de milho foi coletada na mesma área de coleta de solo, foi seca em torno de 70°C em estufa e triturada.

Para a determinação indireta da biodegradação da atrazina foi utilizado o método da respiração microbiana do solo descrito por Alef (1995); o experimento foi conduzido no Laboratório de Físico-Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – Campus Francisco Beltrão. Para o método respirométrico, utilizaram-se frascos hermeticamente fechados com 100 g de solo úmido, com capacidade de campo corrigida para 60%, um frasco contendo 15 mL de NaOH 0,5 mol.L<sup>-1</sup> padronizado e outro frasco contendo 10 mL de água destilada para manter a umidade. Cada ensaio foi preparado com os níveis de palha de milho, resíduo de levedura e dose de atrazina de acordo com os tratamentos definidos no delineamento experimental. Também foi preparada uma prova em branco sem adição de solo. Os frascos ficaram incubados à temperatura ambiente durante 63 dias. Após 24 h de incubação, foram retirados os frascos contendo NaOH e transferido todo o volume para um erlenmeyer contendo 1 mL de BaCl<sub>2</sub> (50%) e duas gotas de fenolftaleína; em seguida, esse foi titulado com HCl 0,5 mol.L<sup>-1</sup> até o ponto de viragem (rosa para branco). Imediatamente após a titulação, o NaOH era repostado para os demais dias. O procedimento foi repetido diariamente nos oito primeiros dias; após esse período, a cada três dias; e finalmente, a cada sete dias, totalizando 63 dias de incubação das unidades experimentais, a fim de determinar a evolução de CO<sub>2</sub> durante todo esse período.

Já para a determinação direta da concentração de atrazina presente em cada ensaio e ao longo do experimento, foi utilizada a análise de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS). As amostras foram injetadas no modo sem divisão de fluxo (1 min), com temperatura do injetor de 250°C, gás de arraste hélio 5.0 com fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, temperatura da coluna 1 min a 70°C e 16 min a 220°C (isoterma), e espectro de massa com 70 eV.

Para tanto, foram retiradas alíquotas de 10 g de solo de cada unidade experimental no primeiro dia de incubação (tempo inicial), no sétimo, no 14º e no 63º dia. Todas as alíquotas retiradas das dez unidades experimentais foram acondicionadas em tubos tipo Falcon e mantidas congeladas até a extração.

Para a extração das amostras para a realização da cromatografia gasosa, todos os materiais foram ambientados com metanol grau HPLC. Retiraram-se as amostras de solo do freezer 24 h antes da extração, cada amostra foi pesada e para cada grama de solo adicionou-se metanol HPLC na proporção 2:1. As amostras então foram agitadas manualmente para completa homogeneização e depois centrifugadas por 10 min a 3.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado com auxílio de funil com o papel filtro e proveta para armazenagem do conteúdo filtrado. Após, as amostras foram concentradas até um volume aproximado de 10 mL, utilizando-se rotaevaporador. Em seguida, as amostras foram filtradas novamente, e as paredes internas do balão foram “lavadas” com aproximadamente 2 mL de metanol HPLC para remover os resíduos da amostra, volume também empregado para completar 10 mL na proveta após a filtração. O conteúdo resultante foi transferido para tubos tipo Falcon com capacidade para 15 mL e armazenados na geladeira em embalagem livre de luminosidade. A cromatografia gasosa foi realizada

na Central de Análises da UTFPR – Campus Pato Branco, em equipamento da marca Varian 210 MS.

A fim de definir qual tratamento foi o mais eficiente, os resultados da respiração basal do solo foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de médias de Tukey ao nível de 5% de significância, utilizando o *software* Statistica 7.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O potencial de assimilação da atrazina pela levedura *S. cerevisiae* foi avaliado pelo teste de degradação em meio de cultura YNB, o qual é isento de fonte de carbono e, por isso, determina a capacidade das leveduras de assimilar carboidratos. Nesse caso, utilizou-se como fonte de carbono a atrazina e a glicose (controle).

Na Figura 1, é demonstrado o crescimento da levedura nos três meios de cultura. Na placa A, tem-se o crescimento da levedura utilizando como fonte de carbono glicose 0,5 mol.L<sup>-1</sup>; na placa B, a fonte de carbono utilizada foi a atrazina 5,0 g.L<sup>-1</sup>; e, por fim, na placa C, atrazina na dose de 25,0 g.L<sup>-1</sup>.

A partir do teste realizado, foi possível verificar que a presença da atrazina não prejudicou o crescimento da levedura, e que ela assimilou atrazina, nas duas doses testadas, tanto quanto a glicose. Assim, a levedura residual do processo de produção de cerveja pode ser utilizada como potencial degradadora do herbicida atrazina.

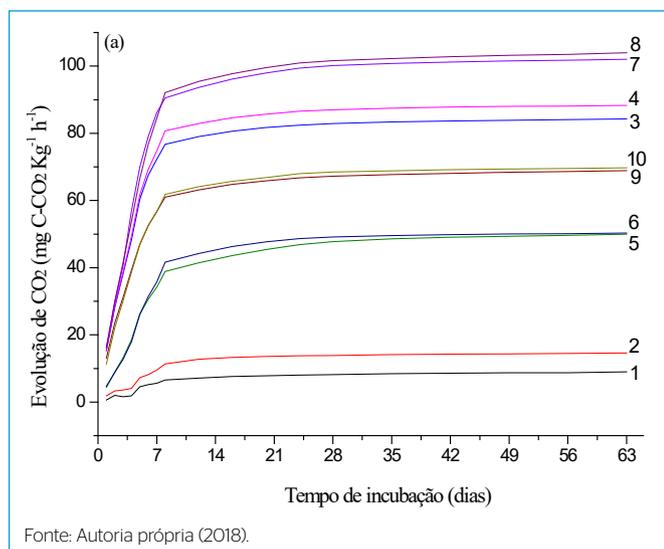
Ao longo do experimento de respiração basal do solo, efetuaram-se leituras de evolução de CO<sub>2</sub> em diferentes intervalos de tempo, iniciando a cada 24 h durante oito dias até chegar a intervalos de sete dias, totalizando 63 dias de incubação.

Os ensaios 8 e 7 obtiveram os maiores valores de liberação de CO<sub>2</sub> acumulada ao final do experimento (99,52 e 97,93 mgC-CO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, respectivamente), e os dois foram os que utilizaram os maiores níveis de palha de milho e levedura. E os menores valores de taxa respiratória foram para os ensaios 1 e 2 (7,85 e 13,60 mgC-CO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, respectivamente), os quais não tinham adição de palha, nem de levedura (Figura 2).



Fonte: Autoria própria (2018).

**Figura 1** - Comparação do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*: (A) meio YNB com glicose; (B) YNB com atrazina na dose recomendada em campo; (C) YNB com cinco vezes a dose de campo de atrazina.



**Figura 2** - Perfis da evolução de CO<sub>2</sub> nos ensaios de respiração basal do solo.

Os ensaios com adição da palhada (ensaios 5 e 6) foram melhores que os ensaios 1 e 2 (sem palha e sem levedura) e inferiores em relação aos tratamentos só com resíduo de levedura (ensaios 3 e 4). De acordo com Moorman *et al.* (2001), a adição de vários compostos orgânicos, como talos de milho, esterco e turfa, melhorou a remoção de atrazina em solos contaminados.

Houot, Barriuso e Bergheaud (1998) utilizaram um composto de resíduos sólidos urbanos e uma palha compostada na biorremediação de solo contaminado com atrazina. Ao final das incubações, na presença dos dois tipos de aditivos orgânicos, apresentou menor desempenho na mineralização da atrazina, o que aumentou a formação de resíduos não extraíveis da atrazina. O composto de resíduos sólidos urbanos acelerou a sorção de atrazina, reduzindo sua biodisponibilidade para os microrganismos degradantes, enquanto a palha compostada foi correlacionada com a formação de hidroxiatrazina.

Por conseguinte, os pontos centrais, ensaios 9 e 10 (0,5 g de palha, 5 mL de levedura, triplo da DR de atrazina), obtiveram valores intermediários e muito próximos, ambos localizados no centro do gráfico. Dessa forma, pelos resultados parciais até o presente momento, os ensaios com adição de palha e resíduo de levedura apresentaram maior atividade microbiana, sugerindo assim maior degradação do herbicida atrazina.

Neste estudo, houve um ligeiro aumento da liberação de CO<sub>2</sub> para os tratamentos com a maior dose do herbicida, quando os fatores biomassa de levedura e palha de milho não variaram. Da mesma forma, Sam, Asuming-Brempong e Nartey (2017), em estudo sobre a influência do biocarvão sobre a comunidade microbiana de dois diferentes solos contaminados com atrazina e paraquat, notaram um aumento significativo na taxa de respiração do experimento tratado com 10 vezes a dose de atrazina recomendada.

Nota-se também que a partir do oitavo dia de incubação (192 h), os resultados tendem para a estabilização, sugerindo um período estacionário, em que a liberação de CO<sub>2</sub> é mais lenta.

Por meio da análise de variância (ANOVA), nota-se que dois dos fatores (palha de milho e levedura) apresentaram valor p menores que o nível de significância considerado ( $\alpha = 0,05$ ) para o tempo de 24 h (Tabela 3). Dessa forma,

**Tabela 3** - Análise de variância (ANOVA) para os ensaios de respiração basal do solo em 24 h de experimento.

Fonte de variação (FV)	Graus de liberdade (GL)	Soma dos quadrados (SQ)	Quadrados médios (QM)	F calculado	Valor p	
Palha de milho (g)	1	8,3252	8,3252	8,2877	0,034635	*
Biomassa de levedura (mL)	1	330,7446	330,7446	329,2542	0,000009	*
Dose de atrazina ( $\mu$ L)	1	0,3746	0,3746	0,3729	0,568114	
Erro	5	5,0226	1,0045		0,034635	

\*Resultados significativos ao nível de confiança de 95%.

Fonte: Autoria própria (2018).

essas duas variáveis são ditas significativas em relação ao comportamento da variável resposta (evolução de CO<sub>2</sub>). Portanto, pode-se dizer que diferentes níveis desses dois fatores promovem alteração no valor da variável resposta, ao nível de confiança de 95%.

Por meio do teste de Tukey, verificou-se quais os níveis dos fatores significativos apresentaram melhores resultados em relação à variável resposta, conforme Tabela 4. Assim, tem-se que para o fator biomassa de levedura, as maiores taxas de evolução de CO<sub>2</sub> foram obtidas quando utilizada a maior quantidade de levedura (10 mL). E para o fator palha de milho, as maiores taxas de evolução de CO<sub>2</sub> foram obtidas quando utilizado o nível intermediário (0,5 g) de palha de milho, para 24 h de experimento.

Após sete dias de incubação, os três fatores (palha de milho, levedura e dose de atrazina) foram significativos ao nível de 5% (Tabela 5). De acordo com a Tabela 6 do teste de Tukey, as médias dos fatores biomassa de levedura e palha de milho diferiram para os três níveis; já o fator dose de atrazina teve médias distintas apenas para DR em campo e quádruplo da DR. O resíduo de levedura foi melhor na maior dose (10 mL) e diminuiu a taxa de evolução de CO<sub>2</sub> quando não utilizado; assim como ocorreu com a palha de milho: melhores resultados na maior dose (1 g) e piores resultados quando não utilizada.

Com relação à dose de atrazina aplicada, os maiores resultados de evolução de CO<sub>2</sub> foram obtidos quando utilizada a maior dose de atrazina 2,5  $\mu$ L.g<sup>-1</sup> de solo (cinco vezes a DR em campo), e os piores resultados foram obtidos na DR em campo (0,5  $\mu$ L.g<sup>-1</sup> de solo). Isso pode estar relacionado à maior disponibilidade de carbono advindo da própria atrazina, o qual possivelmente está servindo de alimento à comunidade microbiana ali presente.

Em 16 dias de experimento, o fator biomassa de levedura seguido do fator palha de milho foram os mais significativos, conforme a Tabela 7. De acordo com o teste de Tukey (Tabela 8), as médias diferiram nos níveis extremos (sem adição e na dose máxima): no cenário do 7º dia de incubação, obtiveram-se os melhores resultados nos níveis máximos de adição de biomassa de levedura e palha de milho, e na dose zero, os resultados mais baixos. A partir dos 49 dias de incubação, nenhum dos fatores apresentou significância ao nível de 5%, mantendo-se esse padrão até o final do experimento (63 dias).

**Tabela 4** – Teste de Tukey para os fatores significativos em 24 h de experimento.

Biomassa de levedura (mL)	Média	Grupo Tukey
0	2,87489	a
5	12,11781	b
10	15,73460	c
Palha de milho (g)	Média	Grupo Tukey
0	8,28462	a
0,5	12,11781	b
1	10,32487	ab

Fonte: Autoria própria (2018).

**Tabela 5** – Análise de variância (ANOVA) para os ensaios de respiração basal do solo em sete dias de experimento.

Fonte de variação (FV)	Graus de liberdade (GL)	Soma dos quadrados (SQ)	Quadrados médios (QM)	F calculado	Valor p	
Palha de milho (g)	1	15,17003	15,17003	220,1190	0,000025	**
Biomassa de levedura (mL)	1	29,53603	29,53603	428,5714	0,000005	**
Dose de atrazina ( $\mu$ L)	1	1,18144	1,18144	17,1429	0,008994	**
Erro	5	0,34459	0,06892			

\*Resultados significativos ao nível de confiança de 95%.  
Fonte: Autoria própria (2018).

**Tabela 6** – Teste de Tukey para os ensaios de respiração basal do solo em sete dias de experimento.

Biomassa de levedura (mL)	Média	Grupo Tukey
0	2,465872	a
5	4,227209	b
10	6,308789	c
Palha de milho (g)	Média	Grupo Tukey
0	3,010285	a
0,5	4,227209	b
1	5,764376	c
Dose de atrazina ( $\mu$ L)	Média	Grupo Tukey
0,5	4,003039	a
1,5	4,227209	ab
2,5	4,771622	b

Fonte: Autoria própria (2018).

Assim, o fator biomassa de levedura, seguido do fator palha de milho, foram os fatores mais significativos ao longo de todo o experimento. E os níveis máximos de levedura produziram melhores resultados em relação à variável resposta, o que evidencia que maiores quantidades de biomassa de levedura produzem maiores incrementos na degradação da atrazina. Já o fator palha de milho atuou de maneira mais branda, indicando que adições maiores desse material podem produzir maiores efeitos nas características do solo e proporcionar

**Tabela 7** – Análise de variância (ANOVA) para os ensaios de respiração basal do solo em 16 dias de experimento.

Fonte de variação (FV)	Graus de liberdade (GL)	Soma dos quadrados (SQ)	Quadrados médios (QM)	F calculado	Valor p	
Palha de milho (g)	1	2,594817	2,594817	33,34291	0,002190	**
Biomassa de levedura (mL)	1	1,020484	1,020484	13,11303	0,015200	**
Dose de atrazina ( $\mu$ L)	1	0,000745	0,000745	0,00958	0,925838	
Erro	5	0,389111	0,077822			

\*Resultados significativos ao nível de confiança de 95%.  
Fonte: Autoria própria (2018).

**Tabela 8** – Teste de Tukey para os ensaios de respiração basal do solo em 16 dias de experimento.

Biomassa de levedura (mL)	Média	Grupo Tukey
0	1,322443	a
5	1,640988	ab
10	2,036755	b
Palha de milho (g)	Média	Grupo Tukey
0	1,110080	a
0,5	1,640988	ab
1	2,249118	b

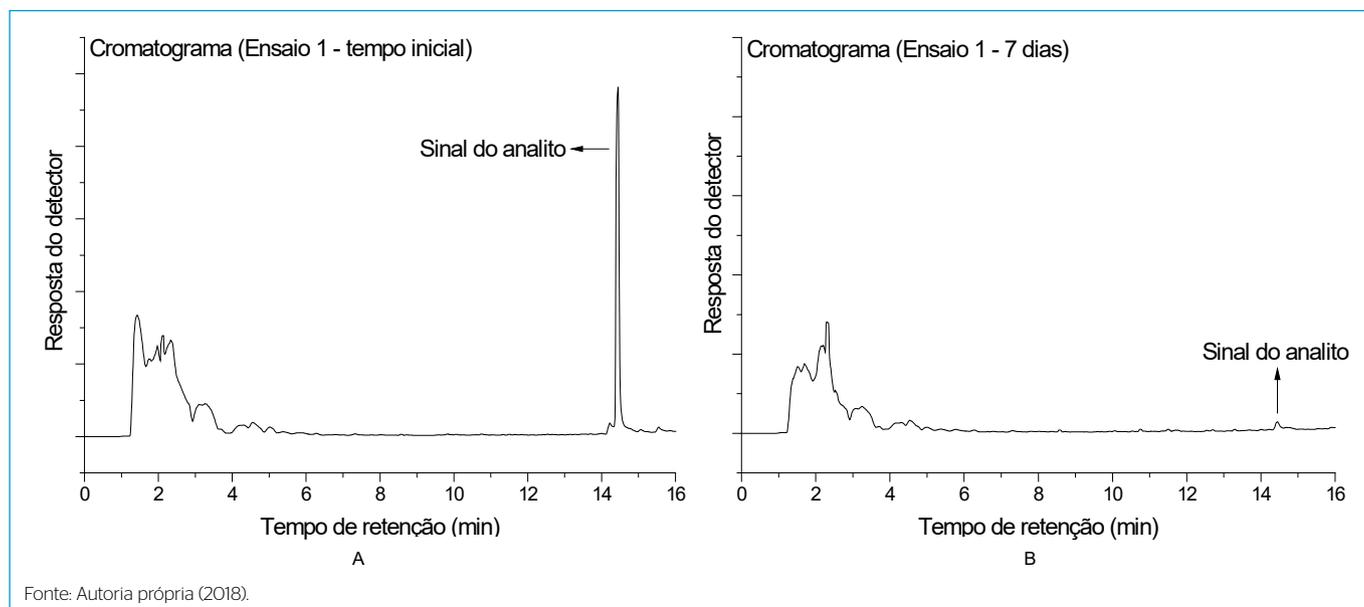
Fonte: Autoria própria (2018).

maior sorção da atrazina e, conseqüentemente, menor biodisponibilidade para os microrganismos degradantes.

Wu *et al.* (2018) também obtiveram bons resultados utilizando bionano-material magnético com *S. cerevisiae* para remover atrazina em solução aquosa. Esses autores verificaram que a atrazina foi consumida como única fonte de carbono, indicando assim um grande potencial para biorremediação.

A atrazina foi identificada por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST (*National Institute of Standards and Technology*), e a determinação da concentração da atrazina ocorreu por meio da relação da área do pico do analito com uma curva padrão de concentração conhecida. Na Figura 3, tem-se os cromatogramas do ensaio 1 (tempo inicial e 7 dias), que demonstra a diferença entre às áreas do pico do analito, as quais estão diretamente relacionadas às concentrações de atrazina presentes em cada amostra.

As análises de CG-MS do solo com histórico de utilização de atrazina revelam a diminuição da concentração do herbicida ao longo do experimento (Tabela 9). Em todos os ensaios, obteve-se redução de mais de 55% dos níveis de atrazina nos primeiros sete dias — em oito dos ensaios, essa redução chegou a mais de 72% (ensaio 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10). O ensaio 4 teve a redução mais baixa (55,51%), seguido do ensaio 5, com 67,07% nos primeiros sete dias de condução do experimento.



**Figura 3** - Cromatogramas para o ensaio 1 obtidos por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas: (A) ensaio 1 - tempo inicial e (B) ensaio 1 - 7 dias.

**Tabela 9** - Resultados dos ensaios de cromatografia gasosa do solo.

Ensaio	Concentração de atrazina (mg.L <sup>-1</sup> )			
	Tempo inicial	7 dias	14 dias	63 dias
1	38,45758	2,971846	nd	nd
2	308,0726	82,8706	nd	nd
3	54,2264	14,80745	nd	nd
4	234,8937	104,5012	nd	nd
5	29,82405	9,820793	nd	nd
6	384,6226	92,98362	7,281062	1,540906
7	48,87961	10,39512	nd	nd
8	351,4275	79,40595	nd	nd
9	269,1188	61,56771	6,546	nd
10	252,3574	47,30647	nd	nd

nd: não detectado.

Fonte: Autoria própria (2018).

Após 14 dias de incubação, apenas nos ensaios 6 e 9 foi detectada a presença da atrazina em doses reduzidas (7,28 e 6,55 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente). Nos demais ensaios, esse agrotóxico não foi mais detectado, indicando assim a sua conversão em outros compostos. Ao final do experimento, a atrazina foi detectada apenas no ensaio 6 (1,54 mg.L<sup>-1</sup>), o que pode estar associado à ausência da levedura nesse ensaio e ao fato de que esse ensaio também exibiu a maior concentração inicial do herbicida detectada por cromatografia, o que se deve, possivelmente, a resíduos de atrazina presentes no solo utilizado.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos do planejamento experimental fatorial mostraram que a quantidade de CO<sub>2</sub> liberado foi influenciada pela quantidade de biomassa de

levedura utilizada, seguida da adição de palha de milho. Com relação às doses de atrazina utilizadas no experimento, não houve interferências significativas no processo de degradação, tendo em vista a boa tolerância da levedura e da comunidade microbiana nativa do solo. Dessa forma, a interação entre a liberação de CO<sub>2</sub> e a concentração de biomassa pode apresentar efeitos equivalentes. Com isso, observou-se que maiores quantidades de CO<sub>2</sub> foram liberadas com concentrações maiores de biomassa, indicando o consumo de carbono da atrazina e, conseqüentemente, a degradação dela.

Por meio das análises de cromatografia gasosa e da respiração basal do solo, verificou-se alta atividade metabólica da levedura até o sétimo dia do experimento. A atrazina foi totalmente consumida pelas leveduras e pela comunidade microbiana nativa do solo, não sendo mais detectada em oito ensaios a partir do 14º dia, restando apenas pequena concentração para os ensaios 6 e 9. Assim, sugere-se que a biorremediação com *S. cerevisiae* tem potencial para elevar as taxas de degradação desse herbicida no solo.

## AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil — CAPES (Código de Financiamento 001) o apoio para a realização do presente trabalho.

## CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Toller, N. M.: Conceituação, Curadoria de Dados, Análise Formal, Investigação, Metodologia, Escrita – Primeira Redação, Escrita – Revisão e Edição. Guimarães, E.: Administração do Projeto, Supervisão, Validação, Escrita – Revisão e Edição. Bravo, C. E. C.: Metodologia, Validação, Escrita – Revisão e Edição.

## REFERÊNCIAS

- AKSU, Z. Reactive dye bioaccumulation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 10, p. 1437-1444, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00034-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00034-7)
- ALEF, K. Estimation of soil respiration. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (org.). *Methods in soil microbiology and biochemistry*. Nova York: Academic, 1995. p. 464-470.
- BADOTTI, F.; DÁRIO, M.G.; ROSA, C.A.; STAMBUK, B.U. Caracterização bioquímica e molecular de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de fermentações artesanais de caldo de cana e melado para a produção de cachaça em Florianópolis-SC. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 13, n. 3, p. 205-213, 2010. <http://dx.doi.org/10.4260/BJFT2010130300027>
- BAIRD, C.; CANN, M. *Química ambiental*. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2011. 844 p.
- BALCI, B.; OTURAN, N.; CHERRIER, R.; OTURAN, M.A. Degradation of atrazine in aqueous medium by electrocatalytically generated hydroxyl radicals. A kinetic and mechanistic study. *Water Research*, v. 43, n. 7, p. 1924-1934, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.01.021>
- BEHKI, R.M.; KHAN, S.U. Degradation of atrazine by *Pseudomonas*: N-dealkylation and dehalogenation of atrazine and its metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 34, n. 4, p. 746-749, 1986. <https://doi.org/10.1021/jf00070a039>
- BEHKI, R.M.; KHAN, S.U. Degradation of atrazine, propazine and simazine by *Rhodococcus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 42, n. 5, p. 1237-1241, 1994. <https://doi.org/10.1021/jf00041a036>
- BENEVIDES, J.A.J.; MARINHO, G. Degradação de pesticidas por fungos: uma revisão. *Holos*, v. 2, p. 110-129, 2015. <https://doi.org/10.15628/holos.2015.1488>
- CARMO, D.A.; CARMO, A.P.B.; PIRES, J.M.B.; OLIVEIRA, J.L.M. Comportamento ambiental e toxicidade dos herbicidas atrazina e simazina. *Revista Ambiente & Água*, v. 8, n. 1, p. 133-143, 2013. <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.1073>
- FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; PINHO, O.; VIEIRA, E.; TAVARELA, J.G. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends in Food Science and Technology*, v. 21, n. 2, p. 77-84, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.10.008>
- FERREIRA, J.M.; SILVA, F.L.H.; ALSINA, O.L.S.; OLIVEIRA, L.S.C.; CAVALCANTI, E.B.; GOMES, W.C. Estudo do equilíbrio e cinética da biossorção do Pb<sup>2+</sup> por *Saccharomyces cerevisiae*. *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1188-1193, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000500026>
- HOUOT, S.; BARRIUSO, E.; BERGHEAUD, V. Modifications to atrazine degradation pathways in a loamy soil after addition of organic amendments. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 30, n. 14, p. 2147-2157, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(98\)00098-4](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(98)00098-4)
- JAVARONI, R.D.C.A.; LANDGRAF, M.D.; REZENDE, M.O.O. Comportamento dos herbicidas atrazina e alaclor aplicados em solo preparado para o cultivo de cana-de-açúcar. *Química Nova*, v. 22, n. 1, p. 58-64, 1999. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421999000100012>
- JOHNSON, E.A. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts - the ascomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 97, n. 17, p. 7563-7577, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5046-z>
- LEMOS, J.L.S.; CARLOS, M.C.; FARIAS, Y.P.M.M.; SANTOS, R.L.C. *Revisão acerca da utilização de microrganismos na biorremediação de rejeitos industriais contendo metais pesados*. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008. 65 p.
- MA, L.; CHEN, S.; YUAN, J.; YANG, P.; LIU, Y.; STEWART, K. Rapid biodegradation of atrazine by *Ensifer* sp. strain and its degradation genes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 116, p. 133-140, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.10.022>
- MANDELBAUM, R.T.; ALLAN, D.L.; WACKETT, L.P. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 4, p. 1451-1457, 1995. <https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1451-1457.1995>
- MARCHESAN, E.D. *Destino no ambiente e comportamento agrônomico de atrazina em resposta a doses e níveis de palha de espécies de cobertura de solo*. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2016.
- MOORMAN, T.B.; COWAN, J.K.; ARTHUR, E.L.; COATS, J.R. Organic amendments to enhance herbicide biodegradation in contaminated soils. *Biology and Fertility of Soils*, v. 33, n. 6, p. 541-545, 2001. <https://doi.org/10.1007/s003740100367>
- SAM, A.T.; ASUMING-BREMPONG, S.; NARTEY, E.K. Microbial activity and metabolic quotient of microbes in soils amended with biochar and contaminated with atrazine and paraquat. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science*, v. 67, n. 6, p. 492-509, 2017. <https://doi.org/10.1080/09064710.2017.1302504>
- SAWANGJIT, S. Isolation and characterization of atrazine-degrading *Xanthomonas* sp. ARB2 and its use in bioremediation of contaminated soils. *International Journal of Environmental Science and Development*, v. 7, n. 5, p. 351-354, 2016. <http://dx.doi.org/10.7763/IJESD.2016.V7.798>
- SINGH, B.; SINGH, K. Microbial degradation of herbicides. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 42, n. 2, p. 245-261, 2016. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.929564>
- SOLOMON, D.R.J.; KUMAR, A.; SANTHI, V.S. Atrazine biodegradation efficiency, metabolite detection, and trzD gene expression by enrichment bacterial cultures from agricultural soil. *Biomedicine and Biotechnology*, v. 14, n. 12, p. 1162-1172, 2013. <https://dx.doi.org/10.1631%2Fjzus.B1300001>
- SOLOMON, K.R.; GIESY, J.P.; LAPOINT, T.W.; GIDDINGS, J.M.; RICHARDS, R.P. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 32, n. 1, p. 10-11, 2013. <https://doi.org/10.1002/etc.2050>
- TONINI, R.M.C.W.; REZENDE, C.E.; GRATIVOL, A.D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: Revisão. *Oecologia Australis*, v. 14, n. 4, p. 1010-1020, 2010. <https://doi.org/10.4257/oeco.2010.140411>

WANG, H.; LIU, Y.; LI, J.; LIN, M.; HU, X. Biodegradation of atrazine by *Arthrobacter* sp. C3, isolated from the herbicide-contaminated corn field. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 13, n. 1, p. 257-262, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13762-015-0860-8>

WANG, J.; ZHU, L.; WANG, Q.; WANG, J.; XIE, H. Isolation and characterization of atrazine mineralizing *Bacillus subtilis* Strain HB-6. *Plos One*, v. 9, n. 9, e107270, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107270>

WANG, Q.; XIE, S. Isolation and characterization of a high-efficiency soil atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. strain. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 71, p. 61-66, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.04.005>

WU, X.; HE, H.; YANG, W. L.; YU, J.; YANG, C. Efficient removal of atrazine from aqueous solutions using magnetic *Saccharomyces cerevisiae*

bionanomaterial. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 102, n. 4, p. 7597-7610, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9143-x>

ZHAO, X.; WANG, L.; MA, F.; BAI, S.; YANG, J.; QI, S. *Pseudomonas* sp. ZXY-1, a newly isolated and highly efficient atrazine-degrading bacterium, and optimization of biodegradation using response surface methodology. *Journal of Environmental Sciences*, v. 54, p. 152-159, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.06.010>

ZHU, C.; YANG, W.L.; HE, H.; YANG, C.; YU, J.; WU, X.; ZENG, G.; TARRE, S.; GREEN, M. Preparation, performances and mechanisms of magnetic *Saccharomyces cerevisiae* bionanocomposites for atrazine removal. *Chemosphere*, v. 200, p. 380-387, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.020>

