Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Processos de biodegradação dos herbicidas paraguat e diquat por fungos Basideomicetos. Uma proposta par biorremediação de solos

Anderson Sena Barnabe

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Área de concentração: Saúde Ambiental
Orientador: Jain Lichtig

São Paulo
2003

FACULDADE de SAÚDE PÚBLICA
Biblioteca/CIR
UNIVERSIDADE de SÃO PAULO

Processos de biodegradação dos herbicidas paraguat e diquat por fungos Basideomicetos. Uma proposta par biorremediação de solos

Anderson Sena Barnabe

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Área de concentração: Saúde Ambiental
Orientador: Jain Lichtig

São Paulo
2003

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO 1
1.1 Dinâmica dos defensivos agrícolas no solo 2
1.2 Ações do Paraquat e do Diquat na comunidade vegetal 4
2. OBJETIVO 6
2.1 Objetivos Específicos 6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 7
3.1 Efeitos toxicológicos dos agrotóxicos estudados 7
3.2 Toxicidade crônica de Paraquat e Diquat 9
3.3 Efeitos sobre a reprodução em animais dos agrotóxicos estudados 9
3.4 Efeitos teratrogênicos de Paraquat e Diquat 9
3.5 Efeitos mutagênicos de Paraquat e Diquat 10
3.6 Efeitos carcinogênicos de Paraquat e Diquat 10
3.7 Efeitos ecológicos de Paraquat e Diquat 11
3.8 Biodegradação de xenobióticos 11
4. MATERIAL E MÉTODOS 20
4.1 Fungos 20
4.2 Cultivo dos fungos 21
4.3 Os herbicidas 21
4.4 Teste de tolerância em meio sólido 21
4.5 Biodegradação de Paraquat e Diquat - teste de biodegradabilidade 23
4.6 Fundamentos 23
4.7 Reagentes e soluções 23
4.8 Material 23
4.9 Procedimentos para a leitura 24
4.10 Reações 26
4.11 Cálculo do CO_2 gerado 26
4.12 Produção de CO_2 devido a degradação 27
4.13 Análise de espectro fotometria 27
4.14 Reagentes 27
4.15 Teste para verificação da não adsorsão/absorção 28

5. RESULTADOS 29
5.1 Teste de tolerância de fungos CCB 004, CCB 010, CCB 021 e CCB 650, junto ao herbicida Paraquat 29
5.2 Teste de tolerância dos fungos CCB 004, CCB 010, CCB 021 e CCB 650, junto ao herbicida Diquat 41
5.3 Resultado do teste de biodegrabilidade imediata 53
5.4 Resultado das análises espectrofotométricas 55
5.5 Resultado dos testes de verificação da adsorsão/absorção 58
6. DISCUSSÃO 61
7. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÃO 62
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA 64
ANEXO A Frasco de Gledhill
ANEXO B Fórmula do meio MEA 2%
ANEXO C Fórmula do meio BIII
ANEXO D Fórmula do meio BIII modificada
ANEXO E Água isenta de CO_2
ANEXO F Solução de hidróxido de potássio
ANEXO G Solução de ácido clorídrico
ANEXO H Solução de cloreto de bário
ANEXO I Solução indicadora de fenolftaleina
ANEXO J Solução de carbonato de sódio

INDICE DE TABELAS

Tabela 1- Relação de fungos basideomicetos capazes de degradar diferentes xenobióticos..... 16

Tabela 2- Linhagens de *Pleurotus ostreatus* a serem utilizados no estudo..... 20

Tabela 3- Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 004 nas concentrações de 0 a 1000 ppm (mg/L) de Paraquat..... 36

Tabela 4- Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 004 nas concentrações de 0 a 250 ppm (mg/L) de Paraquat..... 36

Tabela 5- Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 010 nas concentrações de 0 a 1000 ppm (mg/L) de Paraquat..... 37

Tabela 6- Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 010 nas concentrações de 0 a 250 ppm (mg/L) de Paraquat..... 37

Tabela 7- Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 021 nas concentrações de 0 a 1000 ppm (mg/L) de Paraquat..... 38

Tabela 8- Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 021 nas concentrações de 0 a 250 ppm (mg/L) de Paraquat..... 38

Tabela 9- Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 650 nas concentrações de 0 a 1000 ppm (mg/L) de Paraquat..... 39

Tabela 10- Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 650 nas concentrações de 0 a 250 ppm (mg/L) de Paraquat..... 39

Tabela 11- Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 004 nas concentrações de 0 a 1000 ppm (mg/L) de Diquat..... 49

Tabela 12- Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 004 nas concentrações de 0 a 100 ppm (mg/L) de Diquat..... 49

Tabela 13- Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 010 nas concentrações de 0 a 1000 ppm (mg/L) de Diquat..... 50

Tabela 14- Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 010 nas concentrações de 0 a 100 ppm (mg/L) de Diquat..... 50

Tabela 15- Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 021 nas concentrações de 0 a 100 ppm de Diquat..... 51

Tabela 16- Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 021 nas concentrações de 0 a 100 ppm de Diquat..... 51
Tabela 17- Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 650 nas concentrações de 0 a 1000 ppm de Diquat..... 52
Tabela 18- Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 650 nas concentrações de 0 a 100 ppm de Diquat 52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Vias de entrada dos pesticidas no ambiente aquático 3

Figura 2- Estrutura química do Paraquat 4

Figura 3- Estrutura química do Diquat 5

Figura 4- Estrutura química da lignina 14

Figura 5- Placa de Petri com inoculo de fungo 22

Figura 6- Taxa de extensão micelial acumulada de *P.ostreatus* CCB 004 em diferentes concentrações de Paraquat 29

Figura 7- Taxa de extensão micelial acumulada de *P. ostreatus* CCB 004 em diferentes concentrações de Paraquat de 250 ppm 30

Figura 8- Taxa de extensão micelial acumulada de *P. ostreatus* CCB 010 em diferentes concentrações de Paraquat 31

Figura 9- Taxa de extensão micelial acumulada de *P. ostreatus* CCB 010 em diferentes concentrações de Paraquat de 0250 ppm 32

Figura 10- Taxa de extensão micelial acumulada de *P. ostreatus* CCB 021 em diferentes concentrações de Paraquat 33

Figura 11- Taxa de extensão micelial acumulada de *P. ostreatus* CCB 021 em diferentes concentrações de Paraquat de 0250 ppm 34

Figura 12- Taxa de extensão micelial acumulada de *P. ostreatus* CCB 650 em diferentes concentrações de Paraquat 35

Figura 13- Taxa de extensão micelial acumulada de *P. ostreatus* CCB 650 em diferentes concentrações de Paraquat de 0250 ppm 35

Figura 14- Taxa de extensão micelial acumulada de *P. ostreatus* CCB 004 em diferentes concentrações de Diquat 41

Figura 15- Taxa de extensão micelial acumulada de *P. ostreatus* CCB 004 em diferentes concentrações de Diquat de 0 a 100 ppm 42

Figura 16- Taxa de extensão micelial acumulada de *P. ostreatus* CCB 010 em diferentes concentrações de Diquat 43

Figura 17- Taxa de extensão micelial acumulada de *P. ostreatus* CCB 010 em diferentes concentrações de Diquat de 0 a 100 ppm 44

Figura 18- Taxa de extensão micelial acumulada de *P. ostreatus* CCB 021 em diferentes concentrações de Diquat de 0 a 100 ppm 45

Figura 19- Taxa de extensão micelial acumulada de *P. ostreatus* CCB 021 em diferentes concentrações de Diquat **46**
Figura 20- Taxa de extensão micelial acumulada de *P. ostreatus* CCB 650 em diferentes concentrações de Diquat de 0 a 100 ppm **47**
Figura 21- Taxa de extensão micelial acumulada de *P. ostreatus* CCB 650 em diferentes concentrações de Diquat **48**
Figura 22- Quantidade de CO_2 produzido por CCB 004 no teste respirométrico **53**
Figura 23- Quantidade de CO_2 produzido por CCB 021 no teste respirométrico **54**
Figura 24- Variações nas concentrações de Paraquat após teste de Biodegradabilidade **55**
Figura 25- Variações nas concentrações de Paraquat após teste de Biodegradabilidade **56**
Figura 26- Resultado da concentração do herbicida Diquat em determinação espectrofotométrica, junto ao fungo CCB 021 ..... **59**
Figura 27- Resultado da concentração do herbicida Paraquat em determinação espectrofotométrica, junto ao fungo CCB 004 ..... **60**

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1- Índices de toxicidade de Paraquat 7

Quadro 3- Índices de toxicidade de Diquat 8

ANDERSON SENA BARNABE

PROCESSOS DE BIODEGRADAÇÃO DOS HERBICIDAS PARAQUAT E DIQUAT POR FUNGOS BASIDIOMICETOS. UMA PROPOSTA PARA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS.

SÃO PAULO

2003

ANDERSON SENA BARNABE

PROCESSOS DE BIODEGRADAÇÃO DOS HERBICIDAS PARAQUAT E DIQUAT POR FUNGOS BASIDIOMICETOS. UMA PROPOSTA PARA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS.

Dissertação apresentada a Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Saúde Pública- Área de Concentração: Saúde Ambiental.

Orientador: Dr. Jaim Lichtig

SÃO PAULO

2003

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Dr. Jaim Lichtig pela orientação e pela amizade e por me ajudar em tudo que foi necessário para a conclusão dessa dissertação.

Agradeço ao Dr. Dácio Roberto Matheus pela co-orientação e pela grande ajuda.

Aos biólogos Nara , Ricardo e Tatiana do departamento de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica de São Paulo.

Ao químico Carlos "muchacho" do Instituto de Química da USP pela ajuda nas análises espectofotométricas.

Aos meus grandes amigos, os biólogos Adriano Santana, Eldemar de Souza e Edenilson Jerônimo, pelo incentivo, a minha amiga bióloga Vânia C. da Silva pela ajuda na construção dos gráficos e apoio , ao amigo farmacêutico Daniel Gentil por sempre acreditar e apoiar. A minha estimável amiga Dra. Izabel Minuzzo pela ajuda nas horas difíceis e os conselhos nas horas de dúvidas.

Aos amigos André, Hélio e Moacir, que também nunca deixaram de acreditar que os sonhos são possíveis, que a vida é possível, que o mestrado era possível...

AGRADECIMENTOS ESPECIAS

Agradeço especialmente a minha mãe RITA por sempre estar do meu lado em todas as decisões da minha vida , inclusive nessa empreitada chamada pós graduação, pelo carinho e amor que ela tem dedicado a mim por toda vida.

A família Silva pela paciência e o carinho com os quais me acolheram.

A todos os meus professores que incentivaram o gosto pela pesquisa e a ciência.

A todos os pesquisadores do Instituto de Botânica de São Paulo (um lugar onde realmente há a PESQUISA CIENTIFICA, e onde tenho o orgulho e a sorte de poder ter trabalhado desde a época da graduação em 1997), em especial a Bióloga Dra. Cecília T. Teradaira, minha primeira orientadora (Iniciação Científica).

E por fim a todos os meus alunos com os quais eu mais aprendo do que ensino.

Do que seria a vida de um homem sem um préstimo para a humanidade?

Sem o carinho da família e dos amigos?

Sem uma mulher que o acompanhe nas jornadas de sua vida?

Agradeço a Deus por ter colocado a mais maravilhosa de todas as mulheres em meu caminho.

Agradeço a ela pelos préstimos, pelo carinho e pelo companherismo, sem o qual eu provavelmente não teria chegado até aqui.

Essa pequena demonstração de amor é o mínimo que eu posso fazer a ela.

Dedico esse trabalho e toda a minha vida a Angelita R. Santiago e Silva, pelo amor que ela me tem, por sua ajuda e por acreditar em mim.

RESUMO

Para o controle da diversidade de organismos que prejudicam a produção agropecuária mundial o ser humano passou a utilizar controladores os quais convenciona-se chamar de agrotóxicos, pesticidas, entre outros.

Apesar da quantidade e variedade de produtos usados no campo para esse fim, durante muito tempo não houve preocupação com os problemas ambientais que os mesmos pudessem causar.

Um desses problemas é a poluição do solo pelos princípios ativos dos fitosanitários, já que a grande maioria destes agrega-se as partículas que compõe o solo, podendo causar contaminação do próprio solo, das águas subterrâneas e da flora, podendo incorpora-se no ciclo das cadeias alimentares.

Determinados grupos de microrganismos tem a propriedade de descontaminar áreas afetadas por grandes cargas de agrotóxicos, mediante processo de biorremediação destacando o grupo dos basideomicetos, fungos que tem capacidade de utilizar a lignina como fonte de subsistência, devido a essa característica presumi-se que eles também usam as formas dos princípios ativos agrotóxicos como fonte, já que assemelham-se em alguns casos quanto a composição da lignina.

O objetivo desse trabalho foi verificar a ação descontaminante do fungo *Pleurotus ostreatus* juntos aos herbicidas Paraquat e Diquat em teste laboratoriais.

Verificou-se a resistência dos fungos e a biodegradabilidade dos herbicidas usando o ensaio respirométrico de BARTHA e PRAMER em frasco de GLENDHILL, confirmando por espectrofotometria de absorção molecular.

Conclui-se que das 4 linhagens de *P. ostreatus* testadas, apenas CCB 004 e 021 foram eficazes na degradação dos herbicidas Paraquat e Diquat respectivamente.

1. INTRODUÇÃO

No ano de 1999, a população mundial alcançou a marca de 6 bilhões de seres humanos vivendo, gerando energia, consumindo e utilizando os recursos ambientais, muitas vezes, de forma altamente depredatória.

As atividades antropocêntricas sempre andaram em contradição aos ambientes naturais, quando coube ao homem modificá-lo conforme seus interesses.

Uma das mais importantes mudanças do meio natural são a devastação de áreas nativas para utilização agropecuária, que fornecem sustento; e fonte de energia para boa parte dos seres humanos, do planeta

Desde que o homem começou a modificar florestas e outros ecossistemas, teve que desenvolver também técnicas para eliminar ou controlar uma diversidade de seres nativos zoológicos ou botânicos indesejáveis às suas plantações e criações.

Para esse controle, desenvolveu-se ao longo dos anos, diversas classes de pesticidas, os quais tem argumentos a seu favor, tais como aumento na produção agrícola, aumento na produção de carne e leite na pecuária, diminuição nas perdas de alimentos armazenados e erradicação dos vetores de doenças entre outros (DORES e FREIRE, 1999).

Dentre as inúmeras conseqüências indesejáveis do uso dos agrotóxicos, pode-se citar a presença de resíduos no ar, solo, água, tecidos vegetais e animais e, como decorrência a destruição de microorganismos presentes no solo que são benéficos a esse. Como grande parte destes compostos não são seletivos eliminam também insetos não alvo, causando desequilíbrios ecológicos.

A eficiência biocida de um pesticida e a sua não seletividade causa uma difusão nas suas atividades; assim que é aplicado na lavoura, seja por via aérea ou misturado ao solo ou às sementes, parte dos agrotóxicos atingirá seu objetivo, enquanto o restante poderá atingir uma biota inofensiva, causando diversos danos como redução do número de espécies, alterações morfogenéticas e reprodutivas, biomagnificação e bioacumulação (WARE, in DORES e FREIRE, 1999).

Além dos desastres ecológicos, segundo ARAÚJO, NOGUEIRA e AUGUSTO (1991), os praguicidas são responsáveis por mais de vinte mil mortes não intencionais ao ano, sendo que a maioria ocorre nos países em desenvolvimento.

Em 1975, o Brasil já era o 4º consumidor mundial de defensivos agrícolas, antecedido pelos EUA, Japão e França. Paralelamente ao grande número de substâncias colocadas no mercado brasileiro, não houve preocupação em capacitar o homem do campo à utilização dos mesmos, ocasionando um caso de intoxicação aguda a cada oito trabalhadores rurais (RUEGG, in ARAUJO et al., 1991).

Após sua aplicação, estas substâncias podem penetrar nos tecidos das plantas diretamente ou podem ser absorvidas pela raiz. Uma vez na planta, o composto pode ser metabolizado ou acumulado em partes não vivas das células vegetais.

Em animais, que em geral absorvem os pesticidas especialmente pela dieta ou para controle de alguma doença, estas substâncias podem ser metabolizadas, distribuídas no organismo na sua forma original ou como metabólito, acumulando-se em órgãos ou tecidos específicos (ESSER, in ARAUJO et al., 1991). Podemos descrever essas bioacumulações como efeitos diretos à população, que ao consumir os produtos agropecuários se intoxicam indiretamente, o que pode acarretar um sério problema de saúde pública, uma vez que estes compostos são reconhecidos pela sua elevada toxicidade, principalmente pelo seu poder cancerígeno.

1.1 Dinâmica dos defensivos agrícolas no solo

A composição do solo, em termos de porcentagem de matéria orgânica, argila e areia afeta a quantidade de pesticidas absorvido ou dissolvido nele. Outras propriedades do solo como a capacidade de troca iônica e na área superficial também influenciam a quantidade de pesticidas que pode ser absorvido. Apesar da adsorsão de pesticidas ao solo depender não somente das características do mesmo, mas também das propriedades físico-químicas do princípio - ativo, de forma geral, pode-se dizer que solos com altos teores de matéria orgânica e de argila, que apresentam ingredientes capazes de sorver tanto pesticidas ionizados como não-ionizados, demonstram poderes de adsorsão.

A umidade do solo é outro fator importante que influi na adsorsão do pesticida às suas partículas, uma vez que, quando seus poros se preenchem com água, esta pode facilitar a migração da molécula do agrotóxico para fora do poro,

permitindo sua solubilização na água do solo, podendo então ser mais facilmente carreada (DORES e FREIRE, 1999).

Levando em consideração fatores como umidade do solo e a presença de matéria orgânica associados ao uso indiscriminado dos defensivos agrícola, pode-se inferir que uma grande parte dos solos agricultáveis possam estar contaminados com algum tipo de pesticida, que com o passar do tempo, chuvas, erosão e o carreamento de partículas através do solo, deixando-o contaminado como uma fonte secundária para contaminação também do ambiente aquático via lençóis freáticos ou diretamente como demonstrado na figura 1.

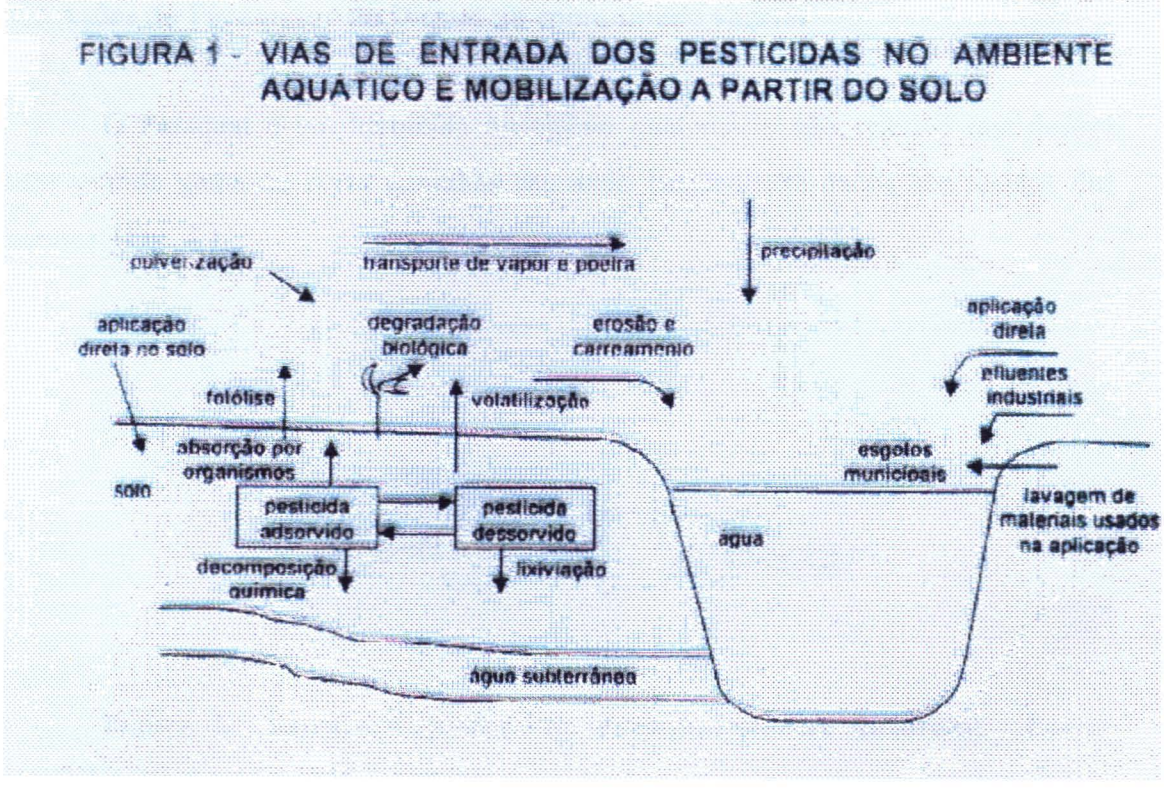


Figura 1 : Metodologia de entrada dos agrotóxicos no ambiente aquático. Extraído de DORES e FREIRE (1999).

A presente pesquisa direciona-se ao estudo da degradação de dois herbicidas específicos: PARAQUAT (1,1-dimethyl - 4,4 bipiridílio ion, diclorado) e o DIQUAT (1,1-etileno - 2,2 bipiridílio íon, dibrometo).

As substâncias em questão foram escolhidas devido ao fato de ambas serem parecidas quanto às estruturas químicas e devido aos seus efeitos tóxicos ao meio ambiente e a biota em geral, como será discutido a seguir.

Pode-se encontrar o Paraquat pelos nomes comerciais de: Crisquat, Dexuron, Gramoxone (entre outros), fabricados por empresas como a Chevron Chemical Co. e Sygenta.

O Diquat apresenta-se sob os nomes de Aquacid, Aquakill, Reglox (entre outros), fabricado também pela Sygenta.

1.2 Ações do Paraquat e do Diquat na comunidade vegetal

O Paraquat é um herbicida nitrogênio quaternário não seletivo que destrói uma grande gama de ervas daninhas causando basicamente danos aos tecidos das plantas. (Fig. 2).

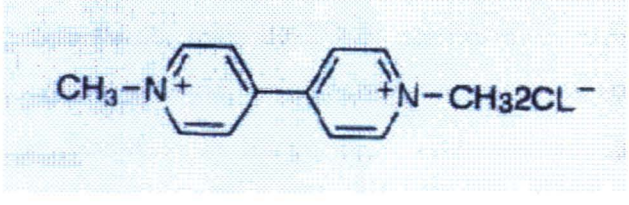


Figura 2: Estrutura química do Paraquat (forma dicloreto) . Fonte: RODRIGUES e ALMEIDA (1998).

Nos Estados Unidos ele tem seu uso restrito e só pode ser usado sob certificação das agência ambientais, porém é amplamente usado pelos governos americano e mexicano para destruir plantações de maconha. Foi banido em vários

países escandinavos (ECOBICHON, 1991). No Brasil o Paraquat é recomendado, através de receituário agronômico, para aplicação no controle de ervas daninhas em plantios de batata, milho, abacate, aspargo, banana, cacau, café, chá, citrus, maçã, pêssego, beterraba, cebola, couve, feijão, abacaxi, pastagem, soja e cana-de-açúcar (ANDREI, 1993).

O Diquat é um herbicida que regula o crescimento da planta e causa lesões nas partes em que é aplicado (Fig. 3). No Brasil o Diquat é recomendado, através de receituário agronômico, para aplicação no controle de ervas daninhas em plantios de beterraba, café, cebola, citrus, feijão e pêssego. Nas culturas de soja, batata e arroz, é usado na dessecação das plantas antes da colheita (ANDREI, 1993).

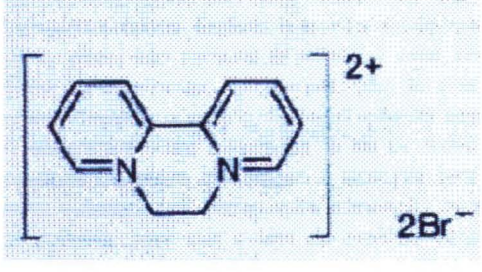


Figura 3: Estrutura química do Diquat. Fonte: RODRIGUES e ALMEIDA (1998).

No Estado de São Paulo, mais de 2/3 do território é ocupado por algumas destas culturas, sendo que a maioria, principalmente a cana-de-açúcar, que ocupa cerca de 2.484.790 de hectares do território, é renovada anualmente, exigindo aplicações continuadas (Instituto de Economia Agrícola).

2. OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo geral:

Avaliar a biodegradação dos herbicidas Paraquat e Diquat pelas linhagens de *Pleorotus ostreatus,* visando a proposição de uma metodologia de descontaminação de áreas com a utilização desses fungos.

2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Avaliar 04 linhagens de *Pleurotus ostreatus,* de diferentes origens, quanto a tolerância a diferentes concentrações de Paraquat e Diquat em meio sólido.

2. Avaliar a eficiência da degradação dos herbicidas pelos fungos mais tolerantes com os testes de boidegradabilidade e sua confirmação por espectofotometria.

3. Efetuar revisão bibliográfica dos problemas relacionados ao uso descontrolado de agrotóxicos e seus impactos no solo, na saúde humana e animal.

4. Incrementar o banco de dados do Instituto de Botânica de São Paulo – Secretaria do Meio Ambiente- sobre as potencialidades de degradação e biorremediação de *P. ostreatus* .

5. Observar se nos ensaios há a efetiva biodegradação ou a sorção/adsorsão dos herbicidas pelo micélio dos fungos, usando a técnica descrita pôr PEDROSA (1984) para detecção do herbicida em material biológico.

3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Efeitos toxicológicos dos agrotóxicos estudados:

O Paraquat é altamente tóxico para animais por todas as suas rotas de exposição, podendo levar a diversos distúrbios patológicos e à morte quando administrados oralmente. É altamente tóxico para o homem, sendo que já foram relatados vários casos de envenenamento e morte (BISMUTH e HALL, 1984). A ingestão letal é de 35mg/Kg sendo que a LD 50 de Paraquat em várias espécies de cobaias ficaram em torno de 20mg/Kg. A forma dicloreto da mesma substância apresentou toxicidade menor, com valores de 196mg/Kg em camundongos, 50mg/Kg em macacos e 48mg/Kg em gatos (HALL e BISMUTH, 1995).

O Diquat é menos tóxico que o Paraquat, mas também pode ser fatal se ingerido, inalado ou absorvido pela pele. Soluções concentradas causam irritações na pele, trato respiratório e estômago, seguindo-se de náuseas, vômitos e convulsões Weed Science Society of America (WSSA, 1989).

A dose letal de Diquat em ratos gira em torno de 120mg/Kg e em camundongos 233mg/Kg (RODRIGUES e ALMEIDA,1998).

Quadro: 1 Índices de Toxicidade de Paraquat

- Oral:	formulação 200 g/l – cães: DL_{50} = 0,5 mg/kg.
- Ingrediente ativo:	ratos: DL_{50} = 150 mg/kg
- Dérmica:	formulação 200 g/l – ratos: DL_{50} = 0,1 a 0,2 mg/kg.
- Ingrediente ativo:	coelhos: DL_{50} – 240-663 mg/kg.
- Inalatória:	ingrediente ativo – ratos: não tóxico (4h).
- Mamíferos: ingrediente ativo - valores entre 22 à 157mg/kg em uma variedade grande de mamíferos: DL_{50} > 34 mg/kg (27 meses).	
- Aves: ingrediente ativo – galinhas: DL_{50} = 362 mg/kg.	
- Peixes: ingrediente ativo–Rasbora heteromorfa: DL_{50}=32,5 mg/l água (24 horas)	

Fonte: BISMUTH e HALL, 1995

Quadro:2 Índices de toxicidade de Diquat

- Oral:	formulação 200 g/l – ratos: DL_{50} = 200 mg/kg.
ingrediente ativo:	ratos: DL_{50} = 231 mg/kg
- Dérmica:	formulação 200 g/l – ratos: DL_{50} = 800 mg/kg.
ingrediente ativo:	coelhos: DL_{50} > 750 mg/kg.
- Inalatória:	sem informação.

Fonte: RODRIGUES e ALMEIDA, 1998

3.2 Toxicidade crônica de paraquat e diquat:

Estudos em relação ao Paraquat (com animais) tentam correlacioná-lo com a doença de Parkinson e outras patologias irreversíveis do pulmão. Já o efeito crônico do Diquat está correlacionado à exposição longa do tóxico e à formação de catarata (BRIGGS, 1992).

O número de casos de catarata em animais de laboratório (cães e gatos) está diretamente associado aos casos em que se adicionava a substância às rações dos animais, no intuito de se verificar uma associação entre a catarata e a ingestão do Diquat e seus efeitos na cadeia alimentare (BISMUT e HALL, 1995).

Estudos posteriores relacionaram uma dose - dependência da formação da catarata com a ingestão de Diquat, sendo que as doses letais não resultaram efeitos e somente a exposição crônica levou à formação da patologia (HAYES, 1982).

3.3 Efeitos sobre a reprodução:

Globalmente existe uma pequena evidência de que o Paraquat causa efeitos adversos na reprodução de camundongos, quando administrado oral ou intradérmicamente, verificando-se que seus embriões eram quantitativamente prejudicados.

Administrando-se Paraquat na água de consumo de cobaias fêmeas por 14 dias aumentou-se a porcentagem de óvulos anormais (Paraquat in Hazardous Substances, Data Bank, National Library of Medicine, 1994).

De acordo com dados da U.S. Environmental Protection Agency (EPA), o Diquat não causa efeitos sobre a reprodução. Em testes feitos com animais não foi verificada a redução de fertilidade, formação de óvulos ou espermatozóides anormais.

3.4 Efeitos teratrogênicos:

Estudos não demostraram efeitos teratrogênicos em descendentes de cobaias tratadas com doses de Paraquat durante sua gestação, não sendo observadas anormalidades fisiológicas (Paraquat, in Hazardous Substances, Data Bank, National Library of Medicine, 1994).

Outros estudos usando coelhos expostos ao Paraquat não demonstraram efeitos teratrogênicos (HOWARD, 1991).

Semelhante ao Paraquat, o Diquat não é considerado teratrogênico (EPA, 1986). Entretanto esses resultados são questionáveis, pois algumas pesquisas demonstraram efeitos teratrogênicos em seis dias quando foram feitas injeções intravenosa de Diquat em ratas prenhas (SAX, 1984). Injeções intraperitoniais no período de organogênese desencadeou o retardamento do desenvolvimento das proles e defeitos na formação dos esqueletos de ratos (SHEPARD, 1986).

3.5 Efeitos mutagênicos de paraquat e diquat:

Paraquat tem se mostrado mutagênico em estudos com microrganismos e ratos (EPA, 1987a). A forma dicloreto não provocou mutação em células somáticas de ratos, porém verificou-se que o tempo de gestação ficou reduzido.

Quanto ao Diquat a Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (EPA) tem requerido mais testes quanto à mutagenicidade desse herbicida, já que se têm verificado informações contraditórias.

3.6 Efeitos Carcinogênicos de paraquat e diquat:

Camundongos alimentados com Paraquat por 99 semanas não desenvolveram câncer. Por sua vez, ratos alimentados com doses maiores do herbicida, por 113 semanas (machos) e 124 semanas (fêmeas), desenvolveram tumores no pulmão, tireóide, pele e na glândula supra-adrenal (EPA, 1987b).

O potencial carcinogênico do Paraquat não foi muito bem avaliado, entretanto a EPA tem classificado o pesticida como um possível carcinogênico.

Estudos semelhantes com o Diquat não o classificaram como carcinogênico (EPA, 1987). Em ensaios com doses de 36mg/Kg/dia, durante dois anos, HAYES & LAWS (1990) não verificaram tumores em ratos.

Apresentada esta breve revisão dos efeitos que estas substâncias podem causar na saúde populacional, passaremos a relatar os efeitos ambientais, que também são de extrema importância.

3.7. Efeitos Ecológicos

Paraquat é de moderadamente a altamente tóxico a várias espécies de peixes. Nas altas concentrações, Paraquat inibe a fotossíntese de algas.

De efeito bioacumulativo nos organismos aquáticos, preocupa-se quanto ao seu uso no controle de ervas aquáticas (WALKER e LAWRENCE, 1992).

Pode causar efeitos adversos em peixes e macrófitas, larvas de crustáceos e girinos (BISMUTH e HALL, 1995).

Porém, por ser um herbicida não seletivo, pode destruir um grande número de espécies vegetais, causando sérios impactos na flora nativa e dificuldades para possíveis trabalhos de recuperação ambiental (EPA, 1987).

Diquat mostrou-se menos problemático ecologicamente que o Paraquat, porém vacas são particularmente sensíveis aos efeitos tóxicos dessas substância, (HARTLEY e KIDD, 1983).

A substância também apresenta problemas em relação a persistência no solo, principalmente quando em contato com partículas de argila ou material orgânico resultando em acumulação, podendo ser carreado pela água (TUCKER e CRABTREE, 1970).

3.8 Biodegradação

No solo, o pesticida também pode ser degradado, sendo que, embora parte desse processo seja ocasionado por reações químicas como oxidação, redução, hidrólise ou fotólise, o metabolismo e o catabolismo microbiológico são geralmente os primeiros meios de transformação.

Segundo YONG e CERNIGLIA (1995), aliado a fatores ambientais a carga e o tipo do poluente podem afetar a biodegradação, levando assim a uma mortandade da microbiota. Eucariontes em geral não degradam hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, mas tem seu metabolismo afetado pela ação dos mesmos. Entretanto, graças a um complexo enzimático singular a alguns tipos de fungos basidiomicetos, verificou-se a ação biodegradante de determinados complexos aromáticos hidrocarbonados.

Estudos elaborados por SOCCOL et al.1995, afirmam que a degradação do 2, 4, 5 – triclofenol (2, 4, 5 - TCP) foi elucidada pela ação do fungo *Phanerochaete chrysosporium.*

A mineralização de 2, 4, 5 - TCP por culturas de *P. chrysosporium,* após incubação de 36 dias, foi de aproximadamente 61% de substrato, enquanto que apenas 8% do mesmo substrato foi mineralizado em condições suficientes de nitrogênio (GOLD, 1993).

Para que ocorra a ação degradante dos pesticidas, é necessária uma certa adaptação dos microorganismos. Algumas comunidades microbianas do solo são tão flexíveis em seus requerimentos nutricionais que podem explorar uma extensa variedade de fontes de carbono que são adicionados ao meio ambiente, desenvolvendo assim, a habilidade para degradar compostos que eram inicialmente tóxicos ou não degradáveis (RACKE, 1990).

Nos últimos anos, os estudos de degradação por fungos (especialmente os basidiomicetos) têm se intensificado. Verificaram que a maioria das espécies de basideomicetos utiliza os componentes de madeira para o seu crescimento. Dentre os degradadores de madeira, pode-se destacar dois grandes grupos: os fungos causadores de podridão branca e os fungos causadores de podridão parda.

Segundo MATHEUS e OKINO (1998), os causadores da podridão branca (os quais incluem-se os *Pleurotus*) são providos de um sistema enzimático que os tornam capazes de utilizar fontes complexas de carbono, sendo assim responsáveis pela decomposição da celulose, hemicelulose e lignina (daí a denominação de fungos lignocelulolíticos). Fungos de podridão parda degradam principalmente celulose e hemicelulose.

Ainda citando MATHEUS e OKINO (1998), os fungos de podridão branca parecem ser os únicos a converterem lignina a CO2.

Foi a partir do entendimento do mecanismo básico da degradação da lignina por fungos de podridão branca que se propôs que estes fungos poderiam ser utilizados na remediação de poluentes ambientais.

HAQUE e FREED, em 1975, estudaram 48 dos principais gêneros de microorganismos, os quais apresentaram capacidade de degradar pesticidas. Dentre esses microorganismos encontram-se espécies de bactérias e fungos. Entretanto, as vantagens de se utilizar fungos lignocelulolíticos foram evidenciadas por AUST em 1990, quando afirma que:

a) o sistema enzimático, sendo extracelular, pode atuar em substratos insolúveis ou complexados aos solos e, portanto, pouco acessível à ação bacteriana;
b) o sistema, não sendo específico, pode ser usado para uma ampla variedade de poluentes orgânicos ou mesmo para misturas deles;
c) os fungos basidiomicetos possuem vantagens competitivas em relação aos outros microorganismos, quando cultivados em substratos lignocelulósicos.

A preferência pelo estudo dos basidiomicetos deve-se ao fato de que as moléculas de lignina (usadas por esses fungos como fonte de carbono) são semelhantes às moléculas de alguns compostos orgânicos sintéticos, principalmente os compostos aromáticos conforme observado na fig. 4.

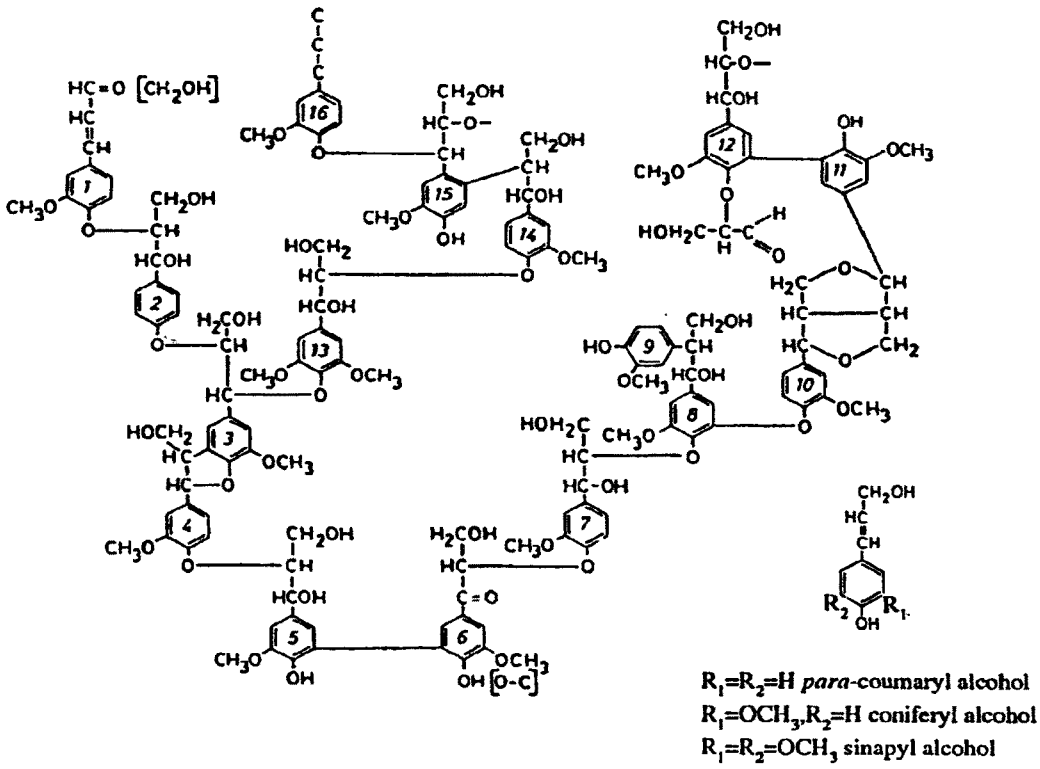


Figura 4: Estrutura química da lignina. Fonte: ADLER (1997).

Embora o *P. chrysosporium* seja a espécie de basidiomicetos mais estudada nesta área, tem-se desenvolvido esforços para conhecer a capacidade de degradação de outras espécies.

Com o intuito de aprofundar as pesquisas em relação aos basideomicetos foi estudada a ação do fungo *Pleurotus ostreatus* como biodegradante dos herbicidas citados.

P. ostreatus é um cogumelo que pode ser encontrado praticamente no mundo todo, sendo freqüente nas matas brasileiras. Conhecido também como cogumelo gigante ou caetetuba (BONONI et al., 1995), tem sabor bem acentuado e alta disponibilidade no mercado, hoje em dia, ele ocupa o quarto lugar na produção mundial de cogumelos comestíveis.

No gênero *Pleurotus* são encontradas várias espécies, entre elas *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju*, *P. eous*, etc.

As características morfológicas diferem para cada uma dessas espécies por exemplo *P. ostreatus* possui coloração cinza e a temperatura para reprodução varia entre 15 e 18 °C.

P. sajor-caju possui coloração cinza, puxando para o marron e sua temperatura para frutificação está entre 22 e 25 °C.

A maioria das espécies e linhagens utilizadas para o cultivo aqui no Brasil foram introduzidas da Europa e da Ásia.

Foi estudado um fungo comercializável devido à suas tecnologias de cultivo, o que será muito útil para produção em grande escala, necessária para os usos em biorremediação, uma vez que para tratar os solos contaminados os fungos tem que ser inoculados em avançado estágio de crescimento (atividades enzimáticas, que quebram as moléculas da lignina ou dos xenobióticos).

Na tabela 1 observa-se estudos efetuados sobre diferentes tipos de basideomicetos e seus potencias de degradação para diferentes xenobióticos.

Tabela 1 – Relação de fungos basidiomicetos capazes de degradar diferentes xenobióticos

Fungos basidiomicetos	Xenobióticos	Referências
Agaricus bitorquis	fenilureia	Khadrani e col. (1999)
Agaricus edulis	pentaclorofenol	Steiman e col. (1994)
Agrocybe aegerita	fenilureia	Khadrani e col. (1999)
Aphyllophorale sp	fenilureia	Khadrani e col. (1999)
Athelia decipiens	fenilureia	Khadrani e col. (1999)
Basidiomycete	fenilureia	Khadrani e col. (1999)
Basidiomycete sp	pentaclorofenol	Steiman e col. (1994)
Bjerkandera adusta	antraceno	Field e col. (1992)
Bjerkandera sp.	pentaclorofenol	Boyle (1995)
Ceratobasidium sp	Fenilureia	Khadrani e col. (1999)
Ceriporiopsis subvermispora	Pentaclorofenol	Lamar e Dietrich (1992)
Chondrostereum purpureum	fenilureia	Khadrani e col. (1999)
Chrysosporium lignorium	3,4-dicloro anilina dieldrin, fenantreno	Morgan e col. (1991)
Collvbia maculata	fenilureia	Khadrani e col. (1999)
Ciophora arida	pentaclorofenol	Steiman e col. (1994)
Coniophora puteana	fenilureia	Khadrani e col. (1999)
Coprinus cinereus	fenilureia	Khadrani e col. (1999)
Coprinus micaceus	fenilureia	Khadrani e col. (1999)
Coprinas sp	fenilureia	Khadrani e col. (1999)
Daedalea quercina	fenilureia	Khadrani e col. (1999)
Dichomitus squalens	fenilureia	Khadrani e col. (1999)
Fibroporia vaillantii	fenilureia	Khadrani e col. (1999)
Filoboletus spp.	3,4-dicloroanilina	Kremer e Sterner (1996)
Fomitpsis pinicola	fenilureia	Khadrani e col. (1999)
Gleophyllum sepiarium	fenilureia	Khadrani e col. (1999)
Gleophyççum trabeum	fenilureia	Khadrani e col. (1999)
Gleoophyllum velutipes	fenilureia	Khadrani e col. (1999)
Heterbasidion annosum	fenilureia	Khadrani e col. (1999)

Inonotus dryophilus	pentaclorofenol	Alleman e col. (1995)
Imonotus hsipidus	fenilureia	Khadrani e col. (1999)
Lentinula edades	pentaclorofenol	Okeke e col. (1996)
Lentinus zeyheri	hexaclorobenzeno	Matheus (1998)
Phanerochaete sordida	pentaclorofenol, creasoto, dibenzo p-dioxina, dibenzofuranos policlorados	Lamar e col. (1994); Lamar e Evans (1993); Davis e col. (1993); Takada e col. (1992)
Pehlinus badius	pentaclorofenol	Alleman e col. (1992)
Peniophora cenerea	pentaclorofenol	Machado (1998)
Pleurotus ostreatos	pireno, antraceno fluoreno, dibenzotiofeno	Bezaiel e col. (1996)
Polyporus pinsitus	antraceno	Field e col. (1992)
Psilocybe costanella	pentaclorofenol, hexaclorobenzeno	Machado (1998) Matheus (1998)
Ramaria sp.	antraceno	Field e col. (1992)
Stereum hirsutum	3, 4-dicloro anilina, dieldrin, fenantreno	Morgan e col. (1991)
Trametes hirsuta	pentaclorofenol	Lamar e Evans (1995)
Trametes versicolor	pentaclorofenol 3,4-dicloro anilina, dieldrin, fenatreno antraceno, pireno	Boyle (1995); Morgan e col. (1991); Field e col. (1992); Alleman e col. (1995)
Trametes villosa	pentaclorofenol	Machado (1998)

Fonte: MATHEUS e OKINO (1998), acrescentado de STEIMAN (1994) e KHADRANI (1999).

Por ser um fungo essencialmente lignícola, o *Pleurotus* possui a capacidade de se desenvolver em qualquer resíduo que contenha celulose, hemicelulose e lignina (BONONI, 1995).

É possível verificar que há uma enorme variedade de xenobióticos até pouco tempo considerados recalcitrantes à degradação biológica e que hoje são degradados por diferentes espécies de fungos basidiomicetos. Conforme exposto, na verdade é a natureza inespecífica do sistema enzimático que permite a estes microrganismos

degradarem compostos xenobióticos, sendo que tais observações se intensificaram a partir do contato dos fungos com os poluentes. Este contato, no entanto, geralmente não ocorre em ambientes contaminados, uma vez que estes fungos estão presentes principalmente em madeira e com menor freqüência no solo e na água.

As condições para que a degradação do xenobiótico aconteça são extremamente variáveis e existem vários resultados controversos na literatura. Em alguns trabalhos a deficiência de nitrogênio é citada como sendo uma condição necessária ou, pelo menos, importante para a degradação de xenobióticos pelos fungos de podridão branca, uma vez que esta é uma condição favorável para a atividade ligninolítica.

MATHEUS e OKINO (1998) associam o poder degradante em parte à capacidade dos fungos lignolíticos de secretarem peróxido de hidrogênio e uma família de enzimas peroxidases (lignina peroxidase- LiP e manganês peroxidase-MnP). No processo de degradação da lignina a LiP é oxidada pelo peróxido de hidrogênio e oxida núcleos aromáticos (fenólicos e não fenólicos) gerando radicais catiônicos. Estes reagem com nucleófilos (H_2O e O_2), resultando numa combustão enzimática, onde ligações C-C e C-O são quebradas despolimerizando a molécula de lignina e abrindo os anéis aromáticos.

A função da Mnp é de catalisar a oxidação de Mn II a Mn III que aparentemente oxida a lignina. No entanto, a sua participação ainda não está bem definida.

Outros estudos, por sua vez, têm evidenciado a degradação de xenobióticos tanto em condições ligninolíticas quanto em condições não ligninolíticas. *Lentinula edodes* metaboliza mais pentaclorofenol na presença de nitrogênio que em condições de deficiência deste nutriente, sendo que o inverso foi observado com *Phanrochaete chrysosporium.* A correlação entre atividade ligninolítica e degradação do xenobiótico, portanto, parece variar muito em função da espécie de fungo testada.

Da mesma maneira que as condições de atividade enzimática se correlacionam de forma diferente com a degradação dos xenobióticos, em função da espécie de fungo aplicada, observa-se que os parâmetros físicos e físico-químicos do meio afetam enormemente as condições de degradação dos xenobióticos, havendo também grandes variações entre espécies, ou mesmo intraespecíficas.

Em 1998, MATHEUS e colaboradores, sugeriram um protocolo para a seleção de fungos basidiomicetos com potencial de aplicação em sistemas de biorremediação de solos. A seleção é baseada em três pontos:

1) Capacidade de formação de halo de descoloração de corante polimérico "remazol brilliant blue-R"(RBBR), em meio sólido:

A observação do halo de descoloração do corante no meio de cultura é uma forma rápida e prática de constatar a presença de um complexo enzimático inespecífico que atua na descoloração do corante e pode também atuar na degradação de outros xenobióticos. Estudos realizados demonstraram haver correlação entre a descoloração do corante Poli-478 e a capacidade de degradação de benzo (a) pireno e antraceno, a índices de 76 e 91%, respectivamente, para vários fungos Basidiomicetos.

2) Velocidade de crescimento em meio sólido:

Velocidade de crescimento elevada é uma das características desejáveis na aplicação de basidiomicetos em processos de biorremediação de solos, uma vez que este fator pode contribuir para a redução da competição entre o basidiomiceto e a microbiota autóctone do solo, além de facilitar o manuseio em laboratório e a produção de inóculos para aplicação em maiores escalas.

3) Tolerância dos fungos aos xenobióticos presentes no solo:

A tolerância do fungo aos xenobióticos a serem degradados é um dos fatores importantes na avaliação do seu potencial de aplicação na biorremediação. Embora a tolerância do fungo ao xenobiótico não seja garantia de sua capacidade de degradação, ela é uma das condições necessárias para que o fungo possa atuar na presença do composto a ser degradado. Esta tolerância pode ser avaliada pela capacidade de crescimento na presença do xenobiótico.

No presente trabalho sugere-se o protocolo citado por MATHEUS, 1998, exceto para os testes de capacidade de formação de halo, pois *P. ostreatus*, já teve sua capacidade degradante de xenobióticos verificada por BEZALEL em 1996. Os testes agora são para testar sua capacidade frente a dois herbicidas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Fungos

Serão estudadas quatro linhagens do fungo basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*, de diferentes origens, que estão depositados na Coleção de Cultura de Basidiomicetos (CCB) da Seção de Micologia e Liquenologia do Instituto de Botânica, da Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo.

Escolhemos *P. ostreatus* devido aos resultados obtidos em outros trabalhos quanto a sua eficiência para degradar pireno e antraceno verificado por BEZALEL e col. (1996).

Quanto ao número de linhagens, definimos por apenas quatro devido a complexidade dos testes e extensão dos mesmos, uma vez que o uso de mais linhagens poderia comprometer o tempo da pesquisa.

Tabela 2 - Linhagens de Pleurotus ostreatus a serem utilizadas no estudo

Número na Coleção	Origem
CCB 004	Arujá – Brasil
CCB 010	México
CCB 021	São Paulo – Brasil
CCB 650	China

4.2. Cultivo dos fungos

Cada linhagem de fungo será cultivada, em triplicata, em placas de Petri contendo meio sólido extraio de malte-ágar (MEA-2%). Disco de crescimento micelial de 0,5cm será inoculado no centro de cada placa, que será incubada em estufa à 28 ± 2°C, até o crescimento total na placa. Após o período de incubação, as culturas serão mantidas em geladeira, à 4°C, até sua aplicação nos testes seguintes.

4.3. Os herbicidas

Para todos os testes serão utilizadas as substâncias puras do herbicidas estudados: Paraquat adquirido da Sygenta com teor de 40% de princípio ativo e Diquat também adquirido da Sygenta, com teor de 40,2% de princípio ativo.

4.4. Teste de tolerância em meio sólido:

A taxa de extensão micelial será avaliada pelo crescimento do fungo em meio de cultura adicionado de herbicida paraquat nas concentrações de O (controle) a 1000 ppm (mg/L) da substância , diluídos em meio de extraio de malte-ágar (MEA-2%). O meio será vertido em placas de Petri, em triplicata, onde um disco de crescimento micelial do fungo será inoculado no centro da placa conforme demonstrado na figura 6.

No fundo da placa serão traçadas duas retas perpendiculares, passando pelo centro do inoculo, e o diâmetro da colônia será medido diariamente até o micélio alcançar as paredes laterais da placa de Petri (4,5cm) com isso verifica-se além da velocidade de crescimento, se os meios impregnados com os herbicidas não inibem o desenvolvimento dos fungos. As taxas de extensão micelial em cada concentração serão comparadas ao tratamento controle O ppm, sem herbicida.

O mesmo procedimento será efetuado com o herbicida diquat, testando todas as linhagens.

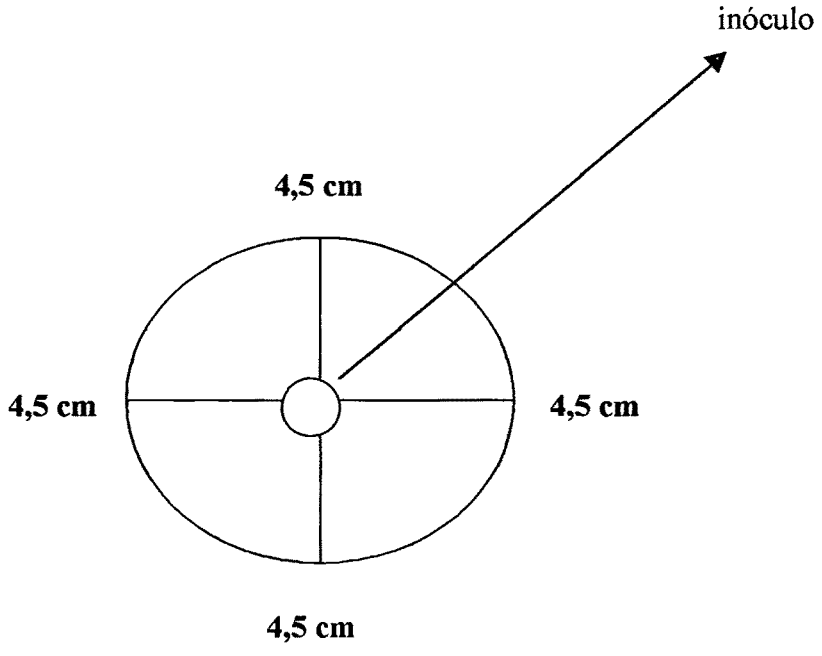


Figura 5: Placa de Petri com inóculo de fungo, serão tracejadas retas e medido o crescimento da extensão micelial até o valor de 4,5 cm em todas as direções.

4.5. Biodegradação de Paraquat e Diquat por linhagens de *Pleuortus ostreatus*, teste da Biodegradabilidade imediata pela medida de dióxido de carbono desprendido em sistema fechado ou método respirométrico de BARTHA e PRAMER:

Esse ensaio baseia-se na quantidade de $C0_2$ gerada pelos microrganismos no processo de degradação da matéria orgânica.

4.6. Fundamentos do teste de biodegradabilidade:

Uma determinada substância (no caso os herbicidas em teste) é submetida como única fonte de carbono e energia, à metabolização pelas linhagens de fungos mais tolerantes ao diquat e paraquat, numa solução nutriente mineral (Meio B III), em um frasco fechado mas com um volume de ar suficiente para a completa metabolização das substâncias em teste.

Esta técnica é usada para determinação da taxa de biodegradação de matéria orgânica contida em resíduos a serem tratados, porém usa-se para a medição da biodegradabilidade os frascos de ensaio em sistema fechado elaborado por GLEDHILL em 1975 (Fig. Em anexo).

4.7. Reagentes e soluções usados no teste de biodegradabilidade:

H_2O destilada e isenta de CO_2

Solução de KOH 0,2 mol/L

Solução indicadora de fenolftaleina

Solução de HCl 0,1 mol/L

Solução de Na_2C0_3 0,05 mol/L

Solução de $BaCl_2$ 0,5 mol/L

4.8. Material:

Respirômetro de GLEDHILL - três para cada amostragem.

Seringas de 10ml para transferir as soluções .

Bureta e erlenmeyer para titulação.

4.9. Procedimento para leitura:

1. Injetar com uma seringa 10 ml da solução de KOH no recipiente plástico do Respirômetro, já adicionado do Meio BIII impregnado com paraquat (a concentração somente será estipulada após os testes de tolerância) e cinco inocules do fungo mais tolerante, denominado PQ + Fungo

2. Injetar com uma seringa 10 ml da solução de KOH no recipiente plástico do Respirômetro, já adicionado do Meio BIII impregnado com 100 ppm de paraquat sem inocules de fungo (para verificar se há possibilidade de degradação abiótica), denominado por PQ + Gli. E por um meio modificado (que consta do Meio BIII sem glicose para verificar se não há interferência dos sais minerais) denominado por PQ.

3. Injetar com uma seringa 10 ml da solução de KOH no recipiente plástico do Respirômetro, já adicionado do Meio BIII com cinco inocules e impregnados com paraquat (concentração a ser definida de acordo com os resultados do teste de tolerância), para verificarmos o uso do herbicida como fonte auxiliar de fornecimento de carbono, denominado por PQ + Fungo + Gli.

4. Injetar com uma seringa 10 ml da solução de KOH no recipiente plástico do Respirômetro, já adicionado do Meio BIII, com cinco inocules do fungo mais tolerante com paraquat, para que seja estipulado o teste de retenção, uma vez que após os procedimentos, serão verificados em análise espectofotométrica com todos esses testes sendo passados por membrana filtrante antes da espectrofotometria.

5. Condicionar os respirômetros em estufa de incubação a mais ou menos 25 °C por 24 horas, vedando todas as saídas de ar.

6. Passadas as 24 horas, remover as vedações laterais e superior.

7. Por meio de seringa transferir a solução de KOH do recipiente plástico do Respirômetro para um erlenmeyer.

8. Encher a seringa com 10ml de água destilada isenta de CO_2, injetar no capilar de acesso ao recipiente para a lavagem do mesmo e, com a mesma seringa transferir essa água para o erlenmeyer com a solução de KOH.

9. Repetir esse processo por mais duas vezes completando 30ml de água e 10ml de solução de KOH.

10. Adicionar no erlenmeyer 1ml de $BaCl_2$.

11. Adicionar duas gotas de fenolftaleina.

12. Titular imediatamente com HCl.

13. Anotar o volume de HCl gasto.

14. Injetar com a seringa 10ml de uma nova solução de KOH no recipiente do Respirômetro.

15. Recolocar vedações nas saídas de ar do Respirômetro.

16. Retornar os respirômetros para estufa de incubação, até a próxima leitura.

Preparar uma amostra em branco para servir de cálculo nas próximas determinações, contendo: 10ml de KOH, 30ml de água destilada isenta de CO_2, duas gotas de fenolftaleina, 1ml de $BaCl_2$. Titular tudo isso com HCl e anotar o volume gasto.

Refazer todo o processo com os respirômetros contendo o herbicida diquat e o fungo(s) mais tolerante(s).

Todas as amostragens devem ser feitas em triplicata

4.10. Reações geradas no respirômetro:

Biodegradação da matéria orgânica:

MATÉRIA ORGÂNICA $+O_2 = H_2O + CO_2$

Absorção do CO_2 gerado:

$2\ KOH + CO_2 = K_2CO_3 + KOH$ (excesso)

Reação do Cloreto de Bário com Carbonato de Potássio:

$K_2CO_3 + BaCl_2 = BaCO_3 + 2\ KCL$

Titulação do excesso de KOH com HCL:

KOH (excesso) + HCL - KCL + H_2O

Substâncias resultantes no final das reações:

KCl (aquoso) + $BaCO_3$ + HC1 (gota excesso).

4.11. Cálculo do CO_2 gerado:

De acordo com o volume gasto de HC1 na titulação do KOH, calcula-se a quantidade de CO_2, em miligrama, gerado em cada Respiro metro segundo a fórmula: $GCO_2 = (A-B) \times (N\ HC1 / N\ KOH) \times 100 \times 0{,}044$

Sendo:

GCO_2: geração de gás carbônico

A: volume gasto na titulação do branco

B: volume gasto na titulação da amostra

N HC1: normalidade do HC1

N KOH: normalidade do KOH

0,044: fator de transformação de mmol para mg de CO_2.

4.12. Produção de CO_2 devido a degradação:

Subtrair a quantidade de CO_2 gerada no Respirômetro da quantidade gerada no Respirômetro controle. As técnicas descritas acima foram feitas de acordo com PONTES, 2001.

4.13. Análise de Espctrofotometria:

Para observar quantitativamente o valor degradado pêlos fungos em relação aos herbicidas, passaremos os meios inoculados com os fungos mais tolerantes e adicionados das concentrações de paraquat e diquat, após o ensaio respirométrico e seu período de análise (28 dias).

Todos os testes deverão ser filtrados em membrana Milipore® e verificadas a presença ou não dos herbicidas por Espectrofotometria de absorção molecular.

4.14. Reagentes:

Para espectro de absorção molecular:

.Diotionito de Sódio a 0,05%

. Tampão Bórax pH 8,0

Para a curva de calibração:

.Diotionito de Sódio a 0,1%

. Tampão Bórax pH 8,0

Condições:

.Comprimento de onda de excitação 428 nm.

.Comprimento de onda de emissão 497 nm.

Aparelhos:

Espectrofotometro modelo MICRONAL B 382

Aparelho de Automação modelo FIALAB 3500.

4.15- Teste para verificação da não adsorsão/absorção:

Um dos fatos que podem ocorrer nos ensaios de respirometria é a adsorsão ou absorção dos herbicidas pêlos micélios do fungo e não efetivamente a degradação dos poluentes. Se ocorrer esse fenómeno as análises espectrofotométricas não poderiam definir a adsorção ou a absorção , uma vez que uma parte do herbicida poderia estar aderido ao fungo e não propriamente degradado. Baseado nesse problema resolvemos aplicar as mesmas metodologias usadas para detectar paraquat em materiais biológicos.

A técnica de separação dos herbicidas supostamente agregados ao fungo foi proposta pôr PEDROSA em 1984, porém modificada devido a natureza dessa pesquisa:

1) Paralelo aos testes de respirometria, três frascos respirômetros foram inoculados com 50 ml de Meio BUI e doses concentradas de 100ppm (mg/l) de paraquat e outros três com a mesma dosagem de diquat, acrescidos de cinco inocules dos fungos mais tolerantes pôr vinte e oito dias, nas mesmas condições de incubação.
2) Após esse período adicionou-se ao conteúdo do respirômetro:

   167ml de água deionizada

   83 ml de H_2S0_4 18mol/L

   Refluxo de 5 horas em sistema fechado

   Esfriar

   Diluir p/ 300ml com água destilada

   Filtragem em membrana Milipore®

   Ajuste de pH para ensaio de espectro, para verificação da biodegradação.

Caso haja algum tipo de agregação dos herbicidas pelo micélio do fungo após esse procedimento, a substância seria desprendida e se apresentaria na análise espectrofométrica. Assim poderíamos verificar, comparando com os outros ensaios se houve a real biodegradação.

5. RESULTADOS

5.1 Teste de tolerância dos fungos CCB 004, CCB 010, CCB 021 e CCB 650 junto ao herbicida Paraquat.

De acordo com os testes de tolerância realizados com *P. ostreatus* CCB004, CCB010, CCB021 e CCB650 por Paraquat com concentrações de 0, 250, 500, 750 e 1000 ppm em MEA 2%, nota-se que houve crescimento dos fungos em concentrações somente de 250 ppm durante os seis dias de incubação da linhagem 004, sendo que houve inibição de crescimento em 100 para as doses de 500, 750 e 1000ppms (Figura 6).

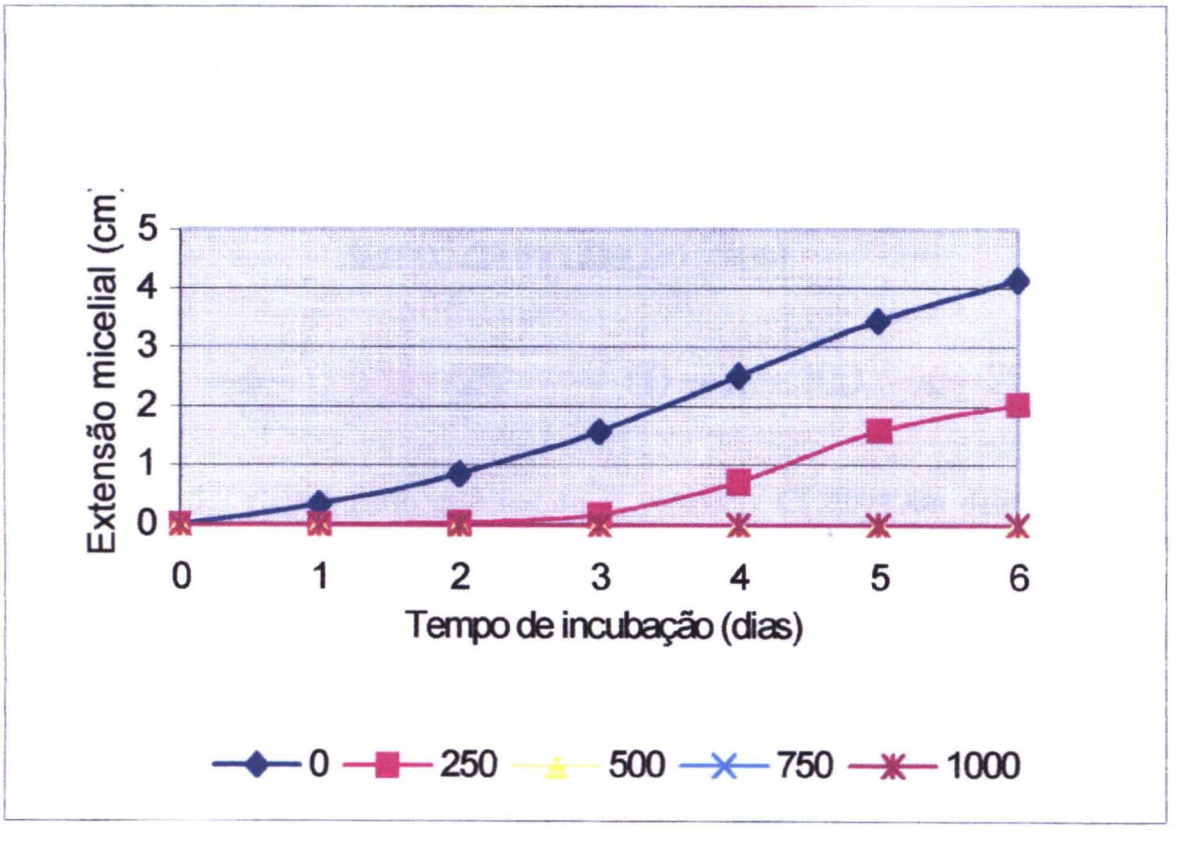


Figura 6: Crescimento micelial de P. ostreatus CCB004 em diferentes concentrações de paraquat (ppm)

De acordo com esses testes, baixamos as concentrações para 25, 50, 100 e 250 ppm (mg/L), para avaliar a(s) melhor(es) concentração(ões) de tolerância ao herbicida (Figura 7) , onde o fungo (CCB 004) conseguiu melhor sobrevida.

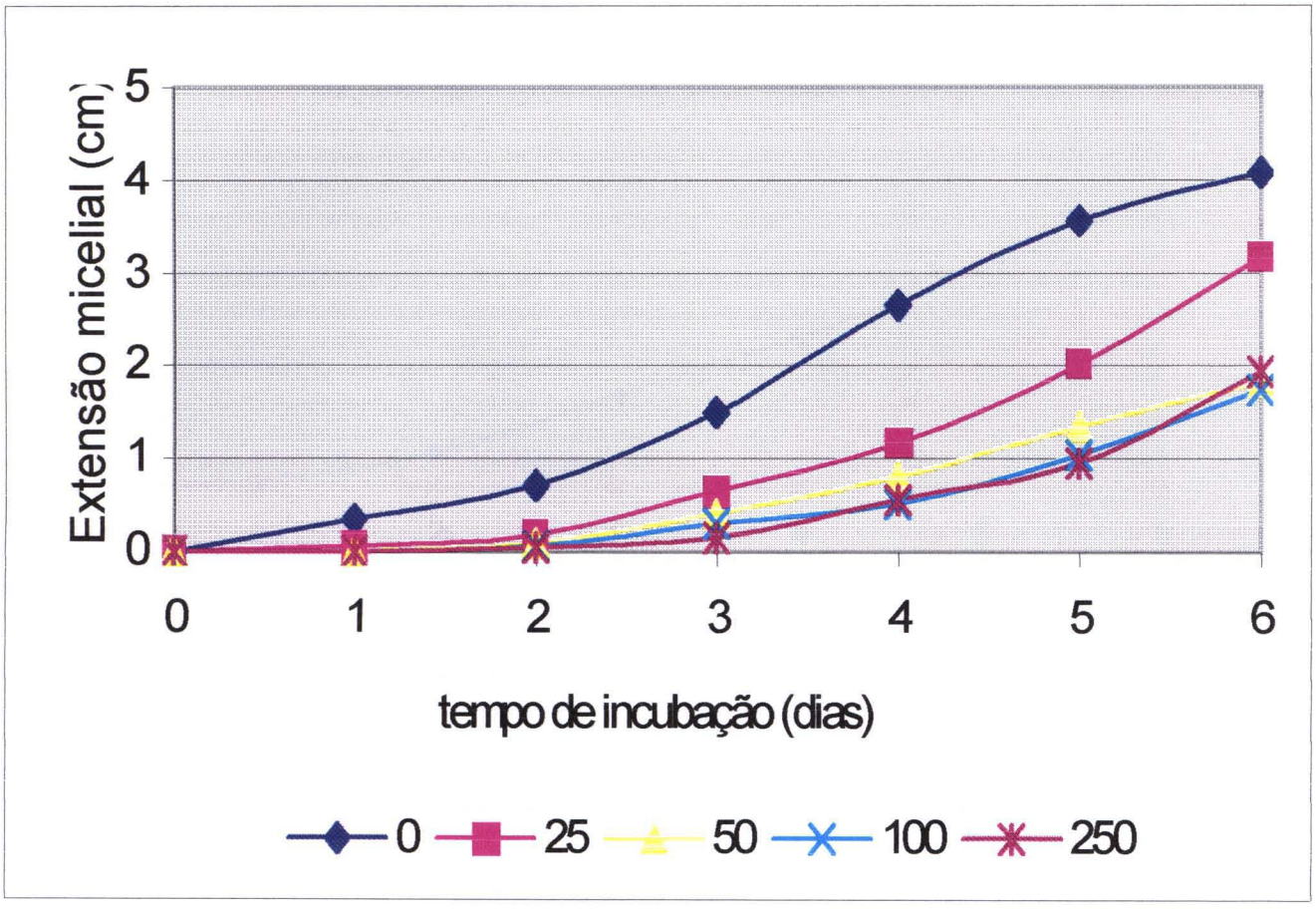


Figura 7 : Crescimento micelial de *P. ostreatus* CCB004 em diferentes concentrações de paraquat (ppm)

CCB 010 teve inibição de crescimento em todas as dosagens conforme demonstrado nas figuras 8 e 9.

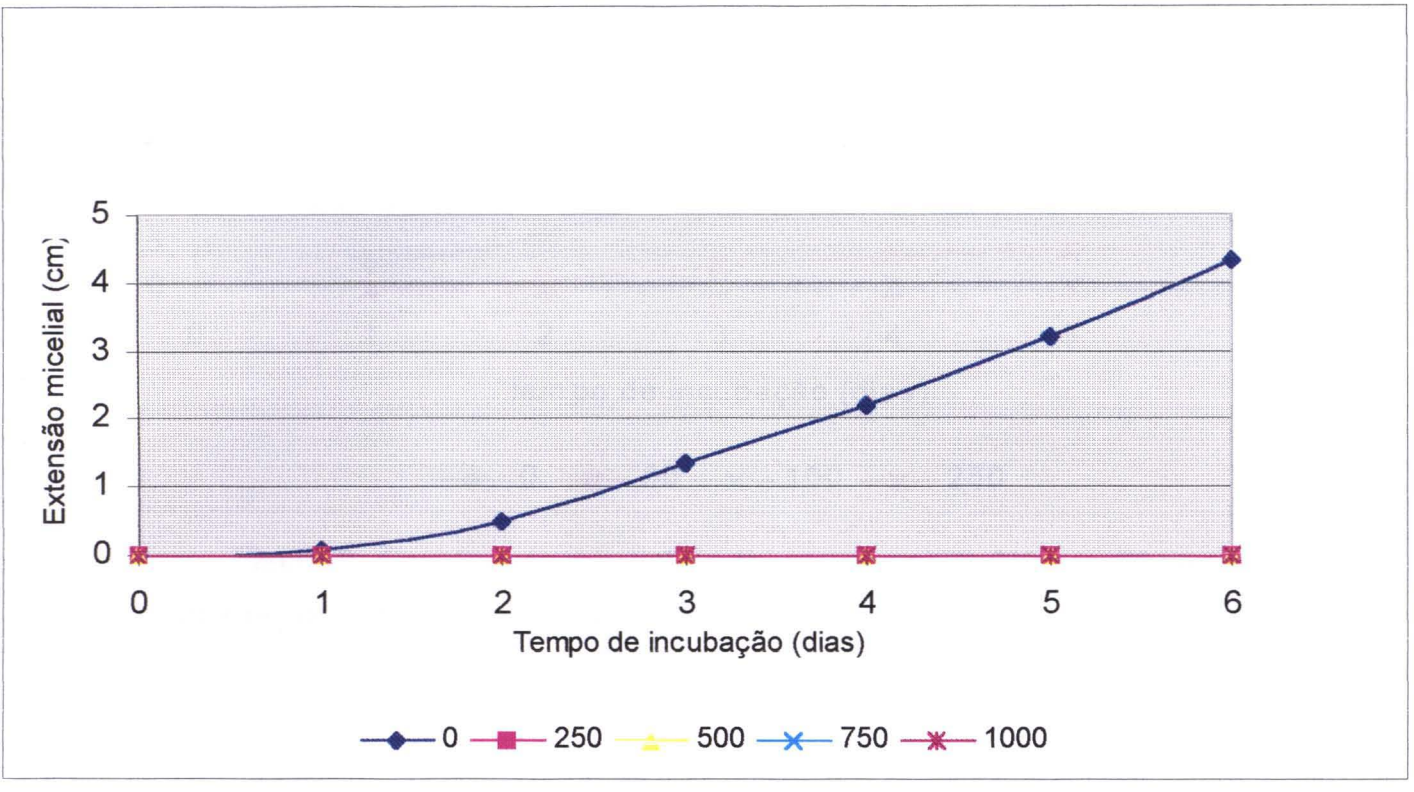


Figura 8: Crescimento micelial de *P. ostreatus* CCB 010 em diferentes concentrações de paraquat (ppm)

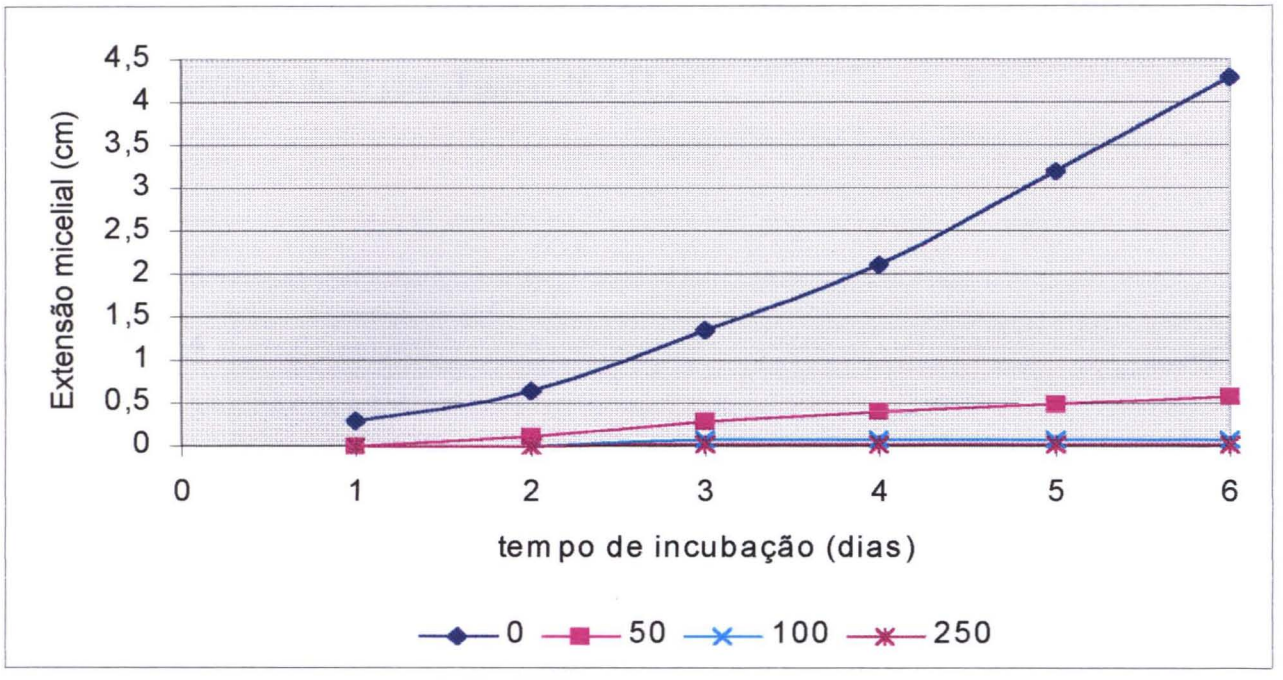


Figura 9: Crescimento micelial de *P. ostreatus* CCB 010 em diferentes concentrações de paraquat (ppm)

CCB021 foi o segundo melhor fungo a tolerar Paraquat, porém na concentração de 25 ppm (Figuras 10 e 11).

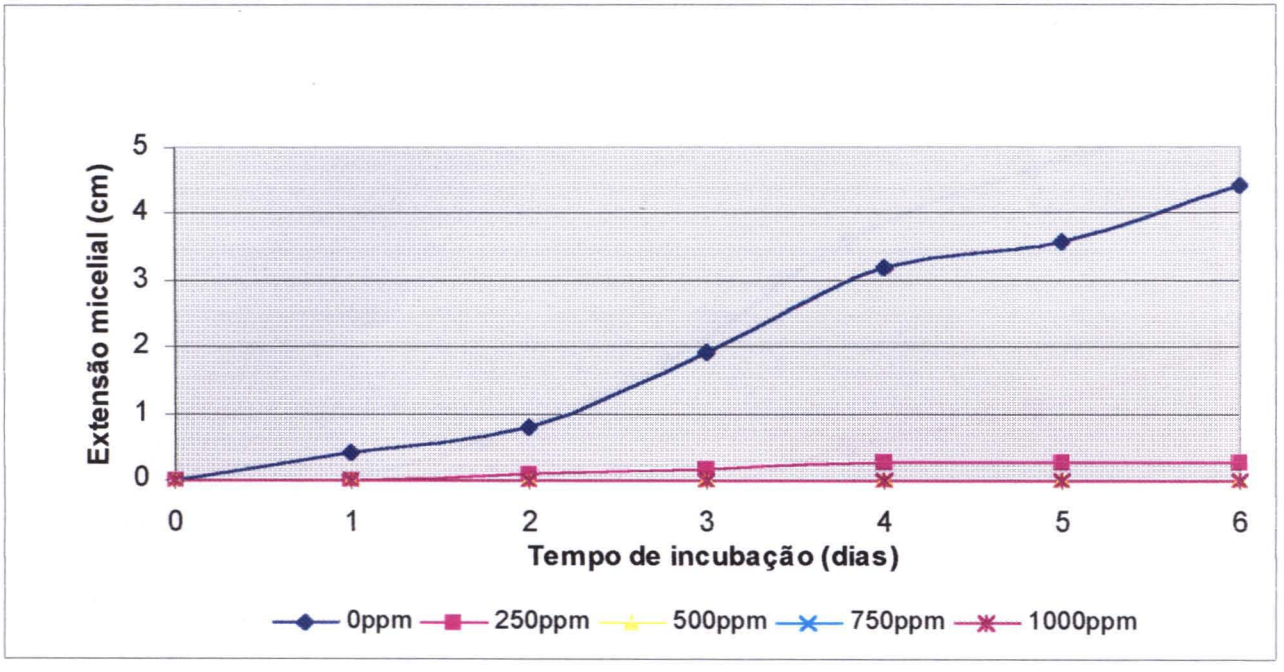


Figura 10: **Crescimento micelial de *P. ostreatus* CCB021 em diferentes concentrações de paraquat**

Observamos no figura 11 a segunda melhor tolerância ao herbicida paraquat, em relação aos testes efetuados com CCB 004, CCB 010 e CCB 021.

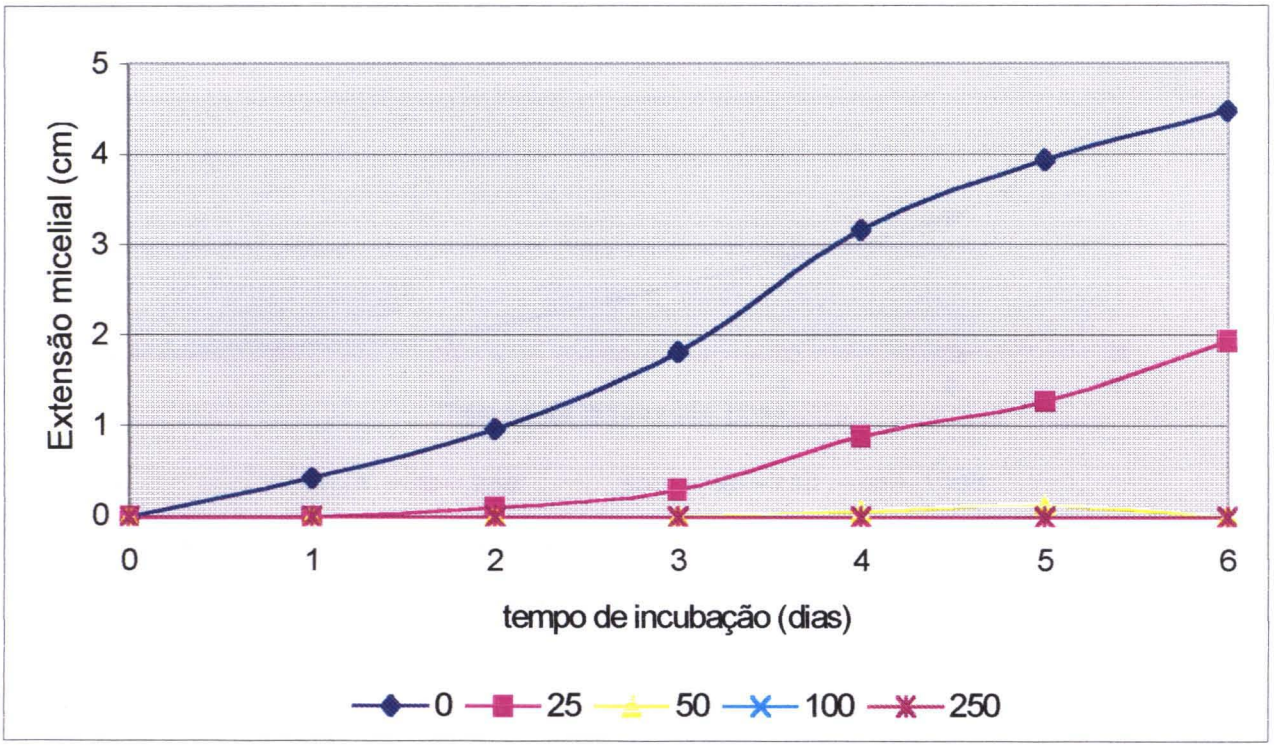


Figura 11: **Crescimento micelial de *P.ostreatus* CCB021 em diferentes concentrações de paraquat (ppm)**

CCB650 teve 100% de inibição assim como CCB010 (Figuras 12 e 13).

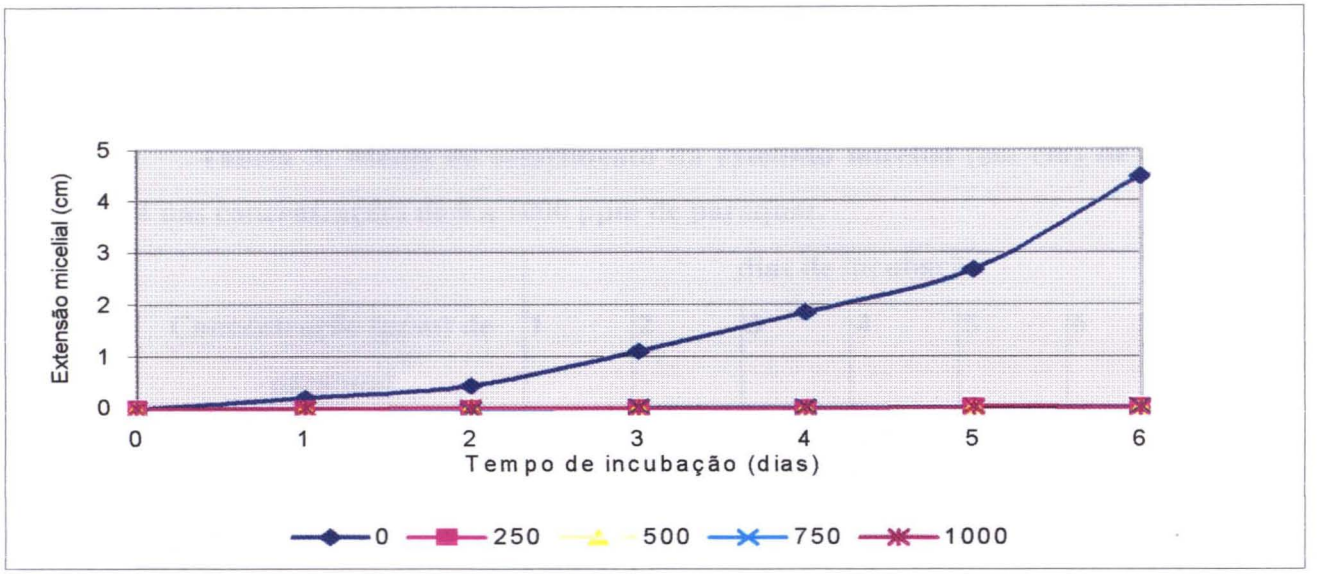


Figura 12: Crescimento micelial de *P. ostreatus* CCB650 em diferentes concentrações de paraquat (ppm)

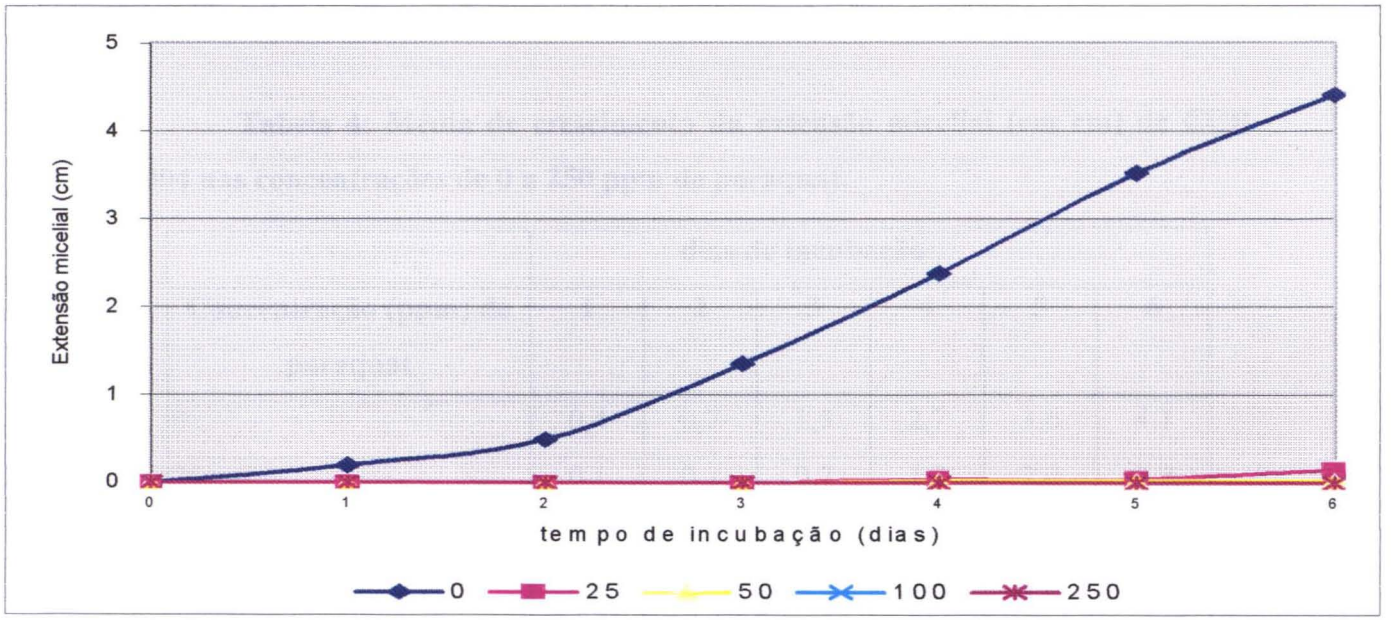


Figura 13: Crescimento micelial de *P.ostreatus* CCB650 em diferentes concentrações de paraquat (ppm).

Nas medições de crescimento micelial, verificamos o mesmo comportamento, onde CCB004 teve sua expansão medida confirmando os dados abaixo (Tabela 3), para as concentrações iniciais de 0 a 1000 ppm e para as concentrações de a 250 ppm (Tabela 3).

Tabela 3: Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 004 nas concentrações de 0 a 1000 ppm de paraquat.

	dias de incubação					
Concentração (ppm) de paraquat	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
0	0,4	0,9	1,6	2,5	3,5	4,1
250	0,0	0,0	0,2	0,8	1,6	2,0
500	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
750	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1.000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela 4: Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 004 nas concentrações de 0 a 250 ppm de paraquat.

	dias de incubação					
Concentração (ppm) de paraquat	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
0	0,4	0,7	1,5	2,7	3,6	4,1
25	0,1	0,2	0,7	1,2	2,0	3,2
50	0,0	0,1	0,4	0,8	1,4	1,8
100	0,0	0,1	0,3	0,5	1,0	1,7
250	0,0	0,1	0,2	0,6	1,0	1,9

CCB010 não teve expansão de micélio em nenhuma das placas adicionadas do herbicida, apresentando crescimento somente nas placas controle –0 de Paraquat-

As médias de extensão micelial de CCB 010 podem ser verificadas nas tabelas seguintes:

Tabela 5: Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 010 nas concentrações de 0 a 1000 ppm de paraquat.

	dias de incubação					
Concentração (ppm) de paraquat	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
0	0,4	0,9	1,6	2,5	3,5	4,1
250	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
500	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
750	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1.000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela 6: Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 010 nas concentrações de 0 a 250 ppm de paraquat.

	dias de incubação					
Concentração (ppm) de paraquat	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
0	0,4	0,7	1,5	2,7	3,6	4,1
25	0,1	0,2	0,7	1,2	2,0	3,2
50	0,0	0,1	0,4	0,8	1,4	1,8
100	0,0	0,1	0,3	0,5	1,0	1,7
250	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,3

CCB021 teve inibição na extensão micelial nas concentrações superiores a 25 ppm demonstrado nas tabelas abaixo. Na concentração de 250 ppm, observamos um

ligeiro crescimento de 0,3 cm até o 3° dia de incubação, porém não demonstrou resistência nos dias seguintes.

Tabela 7: Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 021 nas concentrações de 0 a 1000 ppm de paraquat.

	dias de incubação					
Concentração (ppm) de paraquat	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
0	0,4	0,8	1,9	3,2	3,6	4,4
250	0,0	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3
500	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
750	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1.000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela 8: Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 021 nas concentrações de 0 a 250 ppm de paraquat.

	dias de incubação					
Concentração (ppm) de paraquat	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
0	0,4	1,0	1,8	3,2	4,0	4,5
25	0,0	0,1	0,3	0,9	1,3	2,0
50	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,3
100	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,2
250	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,3

CCB650 não demonstrou expansão micelial em nenhuma das placas adicionadas de paraquat como o demonstrado nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9: Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 650 nas concentrações de 0 a 1000 ppm de paraquat.

	dias de incubação					
Concentração (ppm) de paraquat	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
0	0,2	0,4	1,1	1,9	2,7	4,5
250	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1
500	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
750	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1.000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela 10: Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 650 nas concentrações de 0 a 250 ppm de paraquat.

	dias de incubação					
Concentração (ppm) de paraquat	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
0	0,2	0,5	1,4	2,4	3,5	4,4
25	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,2
50	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
250	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Achamos as medidas de crescimento do micélio para todos os organismos em testes medindo diariamente e comparando com os controles (inoculações sem o herbicida na placa), e tirando a média aritmética demonstrada nas tabelas 3 a 10.

De acordo com os resultados apresentados concluímos que o melhor fungo a tolerar o herbicida paraquat foi CCB 004, apesar de CCB 021 ter apresentado tolerância, seus resultados foram baixos e resolvemos não aplicá-lo nos testes futuros de degradação em relação ao herbicida citado.

O fato de CCB 010 e CCB 650 não terem crescimento nesses testes, não foram descartados para os testes de repetição ao herbicida diquat, repetiremos a metodologia uma vez que a mudança na molécula pode variar significantemente a tolerância dos fungos e consequentemente seu poder de degradação.

5.2 Teste de tolerância dos fungos CCB 004, CCB 010, CCB 021 e CCB 650 junto ao herbicida Diquat.

Repetimos os testes de tolerância com a mesma metodologia, usando agora o herbicida diquat em meio MEA a 2% nas dosagens inicias de 0, 250, 500, 750 e 1000 ppm para achar as concentrações limite para os fungos.

O primeiro a ser testado foi CCB 004, para o qual observou-se novamente um crescimento somente em concentrações inferiores a 250 ppm, sendo totalmente inibido em concentrações superiores a esse valor. Conforme observamos na figura 14, a curva de crescimento se deu somente na placa controle (O de paraquat) e na placa inoculada com 250 ppm de diquat

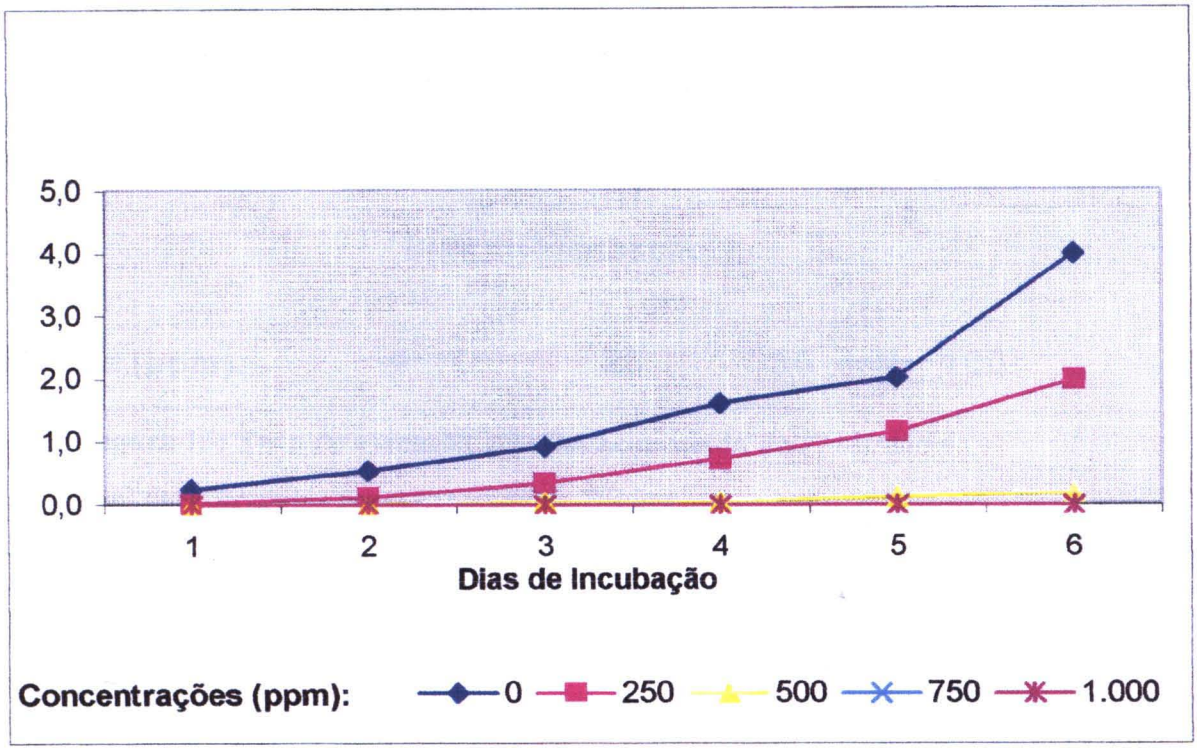


Figura 14: Taxa de Extensão Micelial Acumulada de *P. ostreatus* (CCB-004) em Diferentes Concentrações de Diquat

Em concentrações inferiores a 250 ppm a tolerância foi maior, podendo-se observar bons resultados o que demonstra uma provável facilidade da degradação da molécula nessas concentrações (Figura 15), onde as doses de 25 a 100 ppm acompanharam o crescimento da placa padrão (0 ppm).

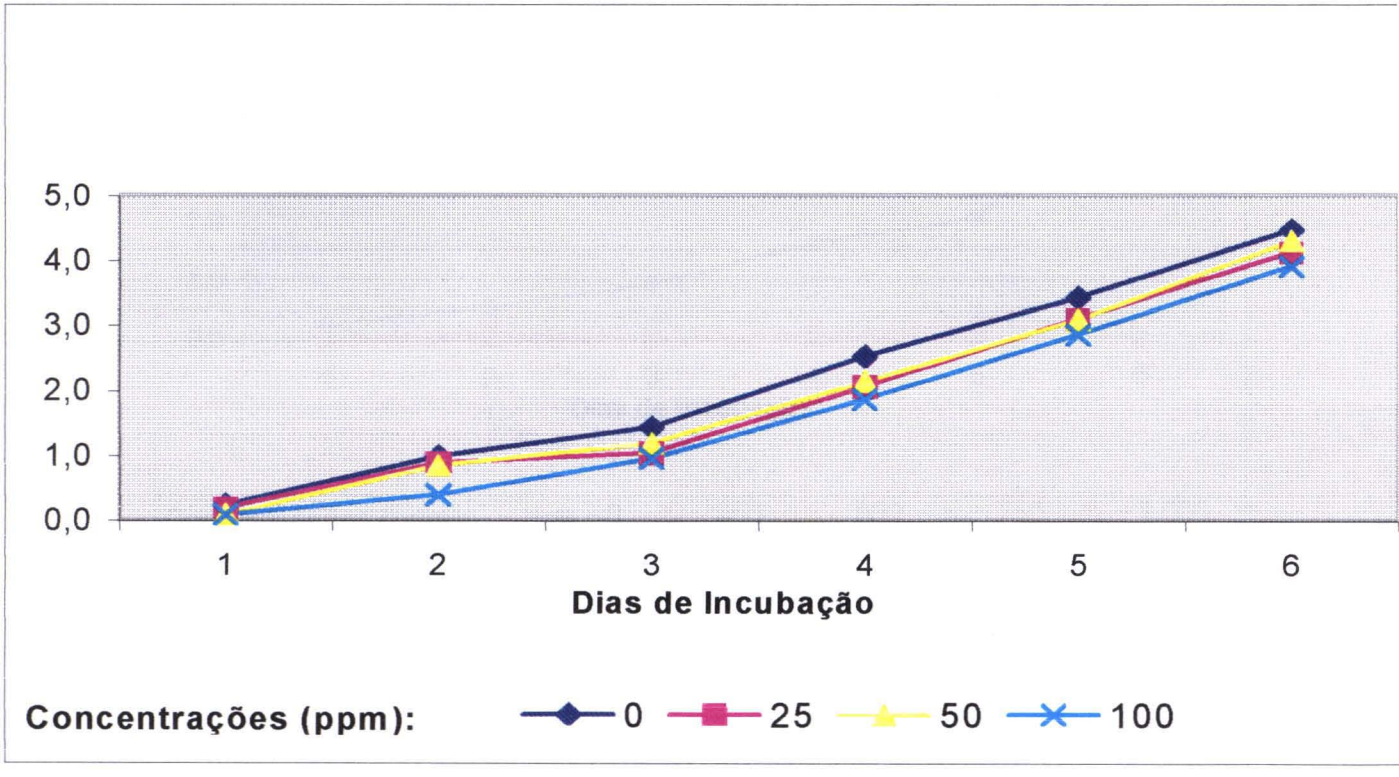


Figura 15: Taxa de extensão micelial acumulada de *P. ostreatus* **(CCB-004) em diferentes concentrações de Diquat**

O teste com CCB 010 mais uma vez demonstrou que não houve crescimento em nenhuma das concentrações medidas, apenas nas placas controle, assim como no teste anterior efetuado com o paraquat, conforme observamos nas figuras 16 e 17.

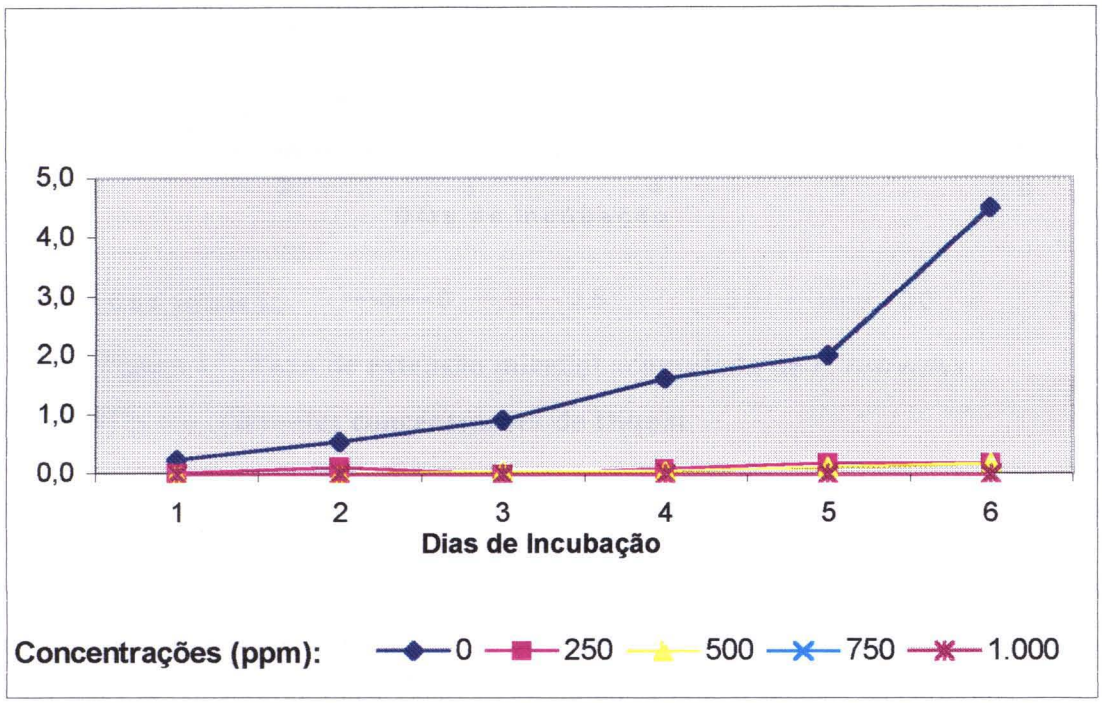


Figura 16: Taxa de extensão micelial acumulada de *P. ostreatus* (CCB-010) em diferentes concentrações de Diquat

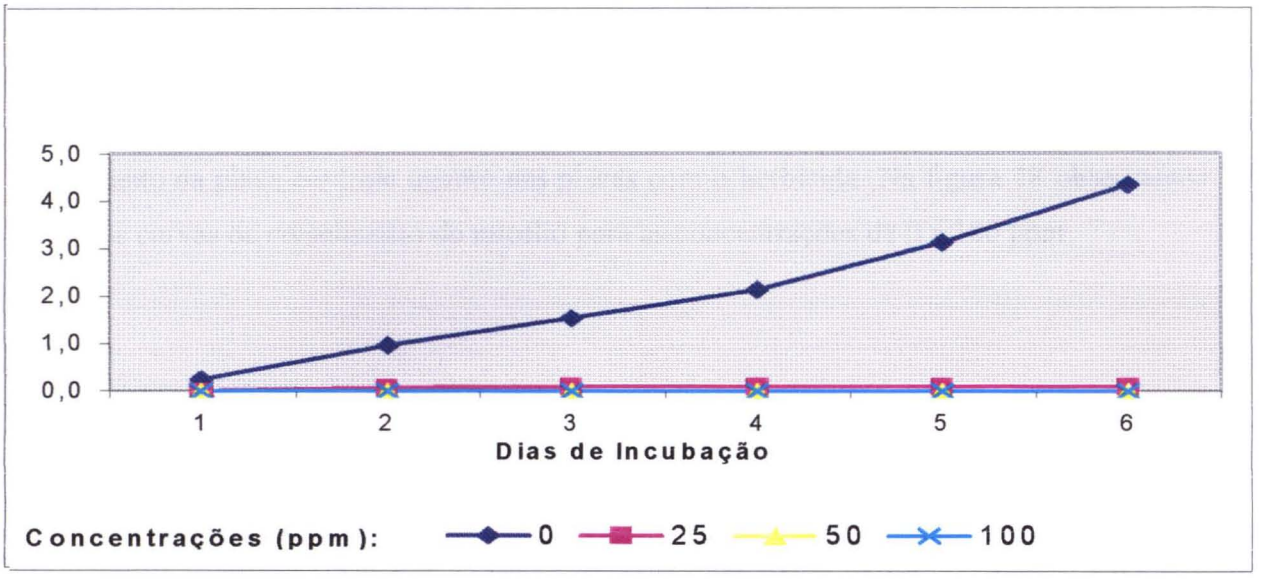


Figura 17: Taxa de extensão micelial acumulada de *P. ostreatus* **(CCB-010) em diferentes concentrações de Diquat**

Baseado nos dois testes de tolerância efetuados com o fungo CCB 010 e verificado que não houve crescimento deste em nenhuma concentração do herbicida aplicado (de 25 a 1000 ppm), tanto ao herbicida paraquat quanto ao herbicida diquat , resolvemos excluí-lo dos testes de respirometria (avaliação da Biodegradabilidade), uma vez que esse fungo não tolerou as substâncias testadas.

O fungo CCB 021 apresentou um bom desenvolvimento nas placas inoculadas com as diferentes doses de diquat, o crescimento micelial foi contínuo tanto na placa controle quanto nas placas com o herbicida. Na figura 18 observamos as curvas de crescimento do micélio para as concentrações de 0 a 100 ppm

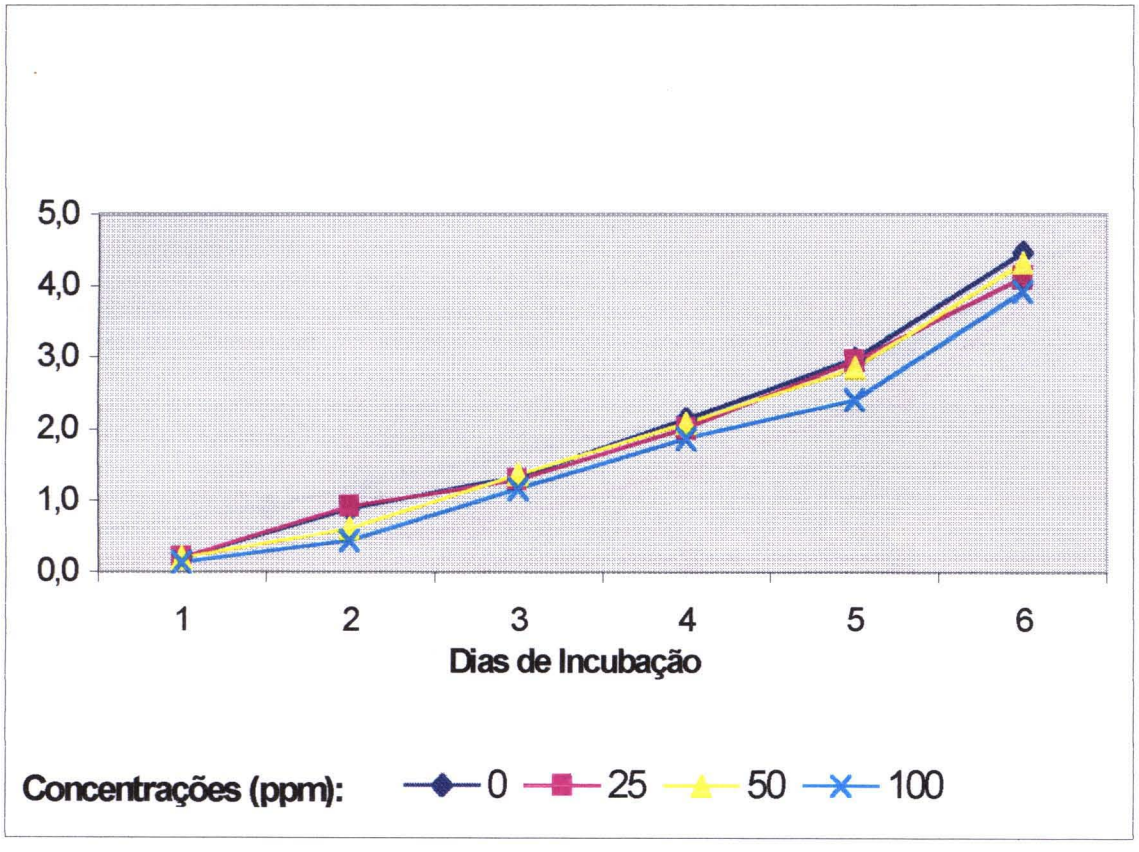


Figura 18: Taxa de extensão micelial acumulada de *P. ostreatus* (CCB-021) em diferentes concentrações de diquat

Na figura 19 observamos o melhor desenvolvimento fúngico em todos os testes efetuados, CCB 021 tolerou as maiores concentrações até então, chegando a ter desenvolvimento em até 500 ppm de diquat

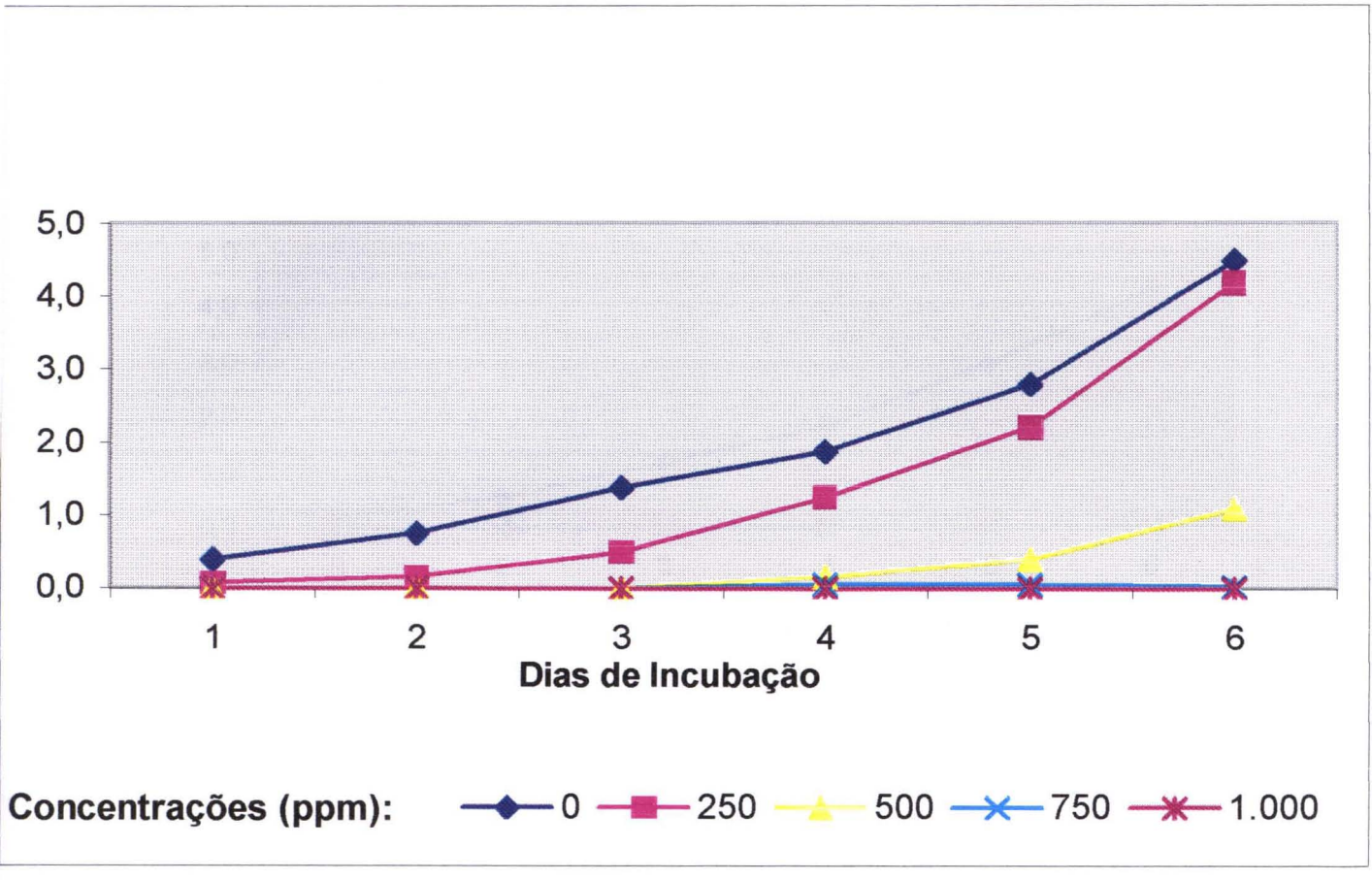


Figura 19: Taxa de extensão micelial acumulada de *P. ostreatus* (CCB-021) em diferentes concentrações de diquat

CCB 650 não demonstrou tolerância ao herbicida diquat em nenhuma concentração testada, assim como CCB 010, com esses resultados resolvemos excluí-lo também dos testes futuros de Biodegradabilidade, uma vez que o mesmo não tolerou nenhum dos dois compostos como podemos observar nas figuras abaixo.

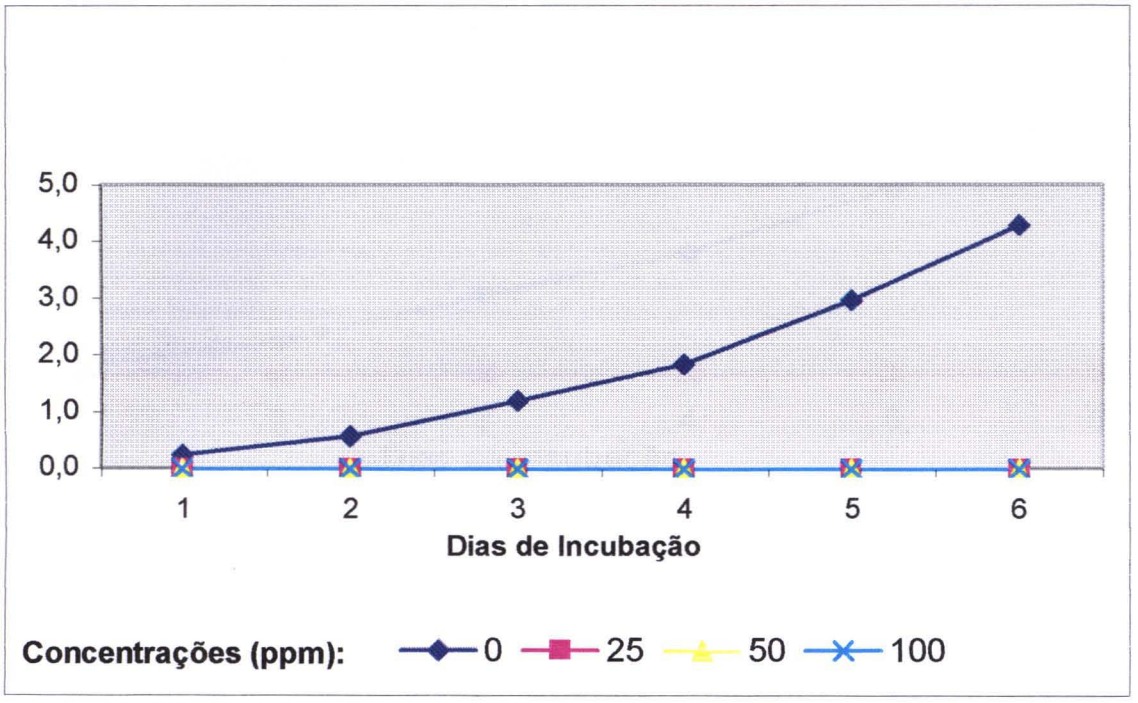


Figura 20: Taxa de extensão micelial acumulada de *P. ostreatus* (CCB-650) em diferentes concentrações de diquat

Mesmo em concentrações baixas não foi observado crescimento micelial de CCB 650 conforme podemos observar na figura 21.

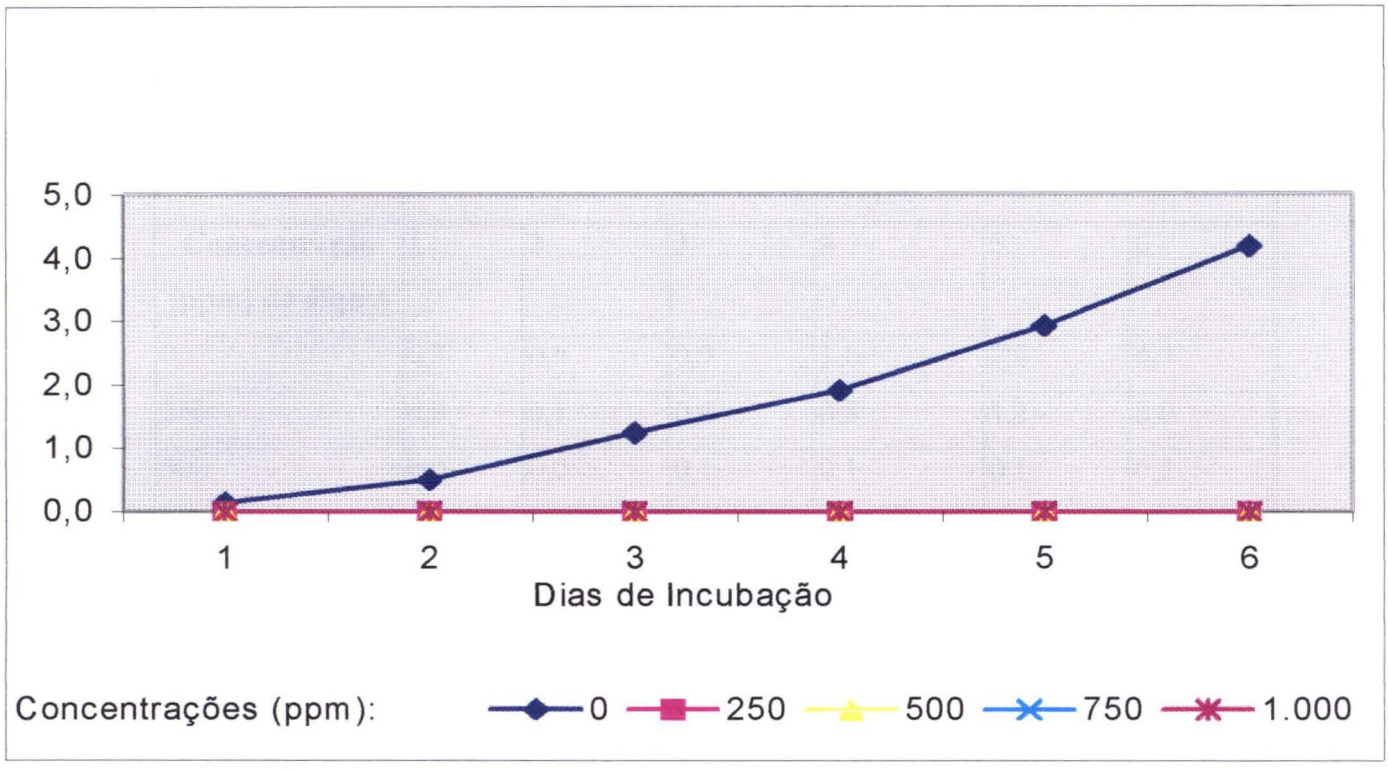


Figura 21: Taxa de extensão micelial acumulada de *P. ostreatus* (CCB-650) em diferentes concentrações de diquat

Nas medições de crescimento micelial, elaboramos as medições diárias com as placas inoculadas em todas as concentrações com os 4 fungos em testes, as médias de crescimento estão demonstradas nas tabelas abaixo

Tabela 11: Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 004 nas concentrações de 0 a 1000 ppm de diquat.

	dias de incubação					
Concentração (ppm) de diquat	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
0	0,3	0,6	0,9	1,6	2,0	4,3
250	0,0	0,1	0,4	0,8	1,2	2,0
500	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2
750	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1.000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela 12: Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 004 nas concentrações de 0 a 100 ppm de diquat

	dias de incubação					
Concentração (ppm) de diquat	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
0	0,3	1,0	1,5	2,6	3,5	4,5
25	0,2	0,9	1,1	2,1	3,1	4,2
50	0,1	0,9	1,2	2,2	3,1	4,3
100	0,1	0,4	1,0	1,9	2,9	3,9

Tabela 13: Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 010 nas concentrações de 0 a 1000 ppm de diquat.

	dias de incubação					
Concentração (ppm) de diquat	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
0	0,3	0,6	0,9	1,6	2,0	0,0
250	0,0	0,1	0,4	0,8	1,2	2,0
500	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2
750	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1.000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela14: Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 010 nas concentrações de 0 a 100 ppm de diquat.

	dias de incubação					
Concentração (ppm) de diquat	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
0	0,3	1,0	1,6	2,2	3,2	4,4
25	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
50	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela 15: Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 021 nas concentrações de 0 a 1000 ppm de diquat

	dias de incubação					
Concentração (ppm) de diquat	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
0	0,4	0,8	1,4	1,9	2,8	4,5
250	0,1	0,2	0,5	1,3	2,2	4,2
500	0,0	0,0	0,0	0,2	0,4	1,1
750	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0
1.000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela 16: Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 021 nas concentrações de 0 a 100 ppm de diquat.

	dias de incubação					
Concentração (ppm) de diquat	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
0	0,2	0,9	1,4	2,2	3,0	4,5
25	0,2	0,9	1,3	2,0	3,0	4,2
50	0,2	0,6	1,4	2,1	2,9	4,4
100	0,2	0,5	1,2	1,9	2,4	4,0

Tabela 17: Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 650 nas concentrações de 0 a 1000 ppm de diquat.

	dias de incubação					
Concentração (ppm) de diquat	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
0	0,2	0,5	1,3	1,9	3,0	4,2
250	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
500	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
750	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1.000	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela 18: Média de crescimento da extensão micelial (em cm) de CCB 650 nas concentrações de 0 a 100 ppm de diquat.

	dias de incubação					
Concentração (ppm) de diquat	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
0	0,3	0,6	1,2	1,9	3,0	4,3
25	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
50	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

5.3 Resultados do teste de Biodegradabilidade imediata:

De acordo com os resultados obtidos no teste de tolerância selecionamos para o teste de Biodegradabilidade os fungos CCB 004 com o herbicida paraquat e CCB 021 com o herbicida diquat, uma vez que foram os fungos que melhor toleraram os respectivos herbicidas.

Os ensaios respirométricos foram efetuados seguindo os critérios estipulados pela CETESB em sua norma resolutiva L 6350, de 1990, para ensaio de Biodegradabilidade método respirométrico de BARTHA.

PONTES (2001), afirma em sua dissertação que essa norma tem flexibilidade em suas aplicações, desde que estas sejam explicitamente definidas.

Estipulamos a concentração de 100 ppm (mg/l) devido aos resultados dos testes de tolerância, efetuamos o teste durante um período de 28 dias com um total de 13 leituras, sendo efetuadas as 7 primeiras diariamente, e as seguintes a cada 4 dias.

Com base nos resultados do ensaio verificamos uma ação degradante dos fungos em condições especificadas para o ensaio de respirômetria, conforme podemos observar nos gráficos abaixo.

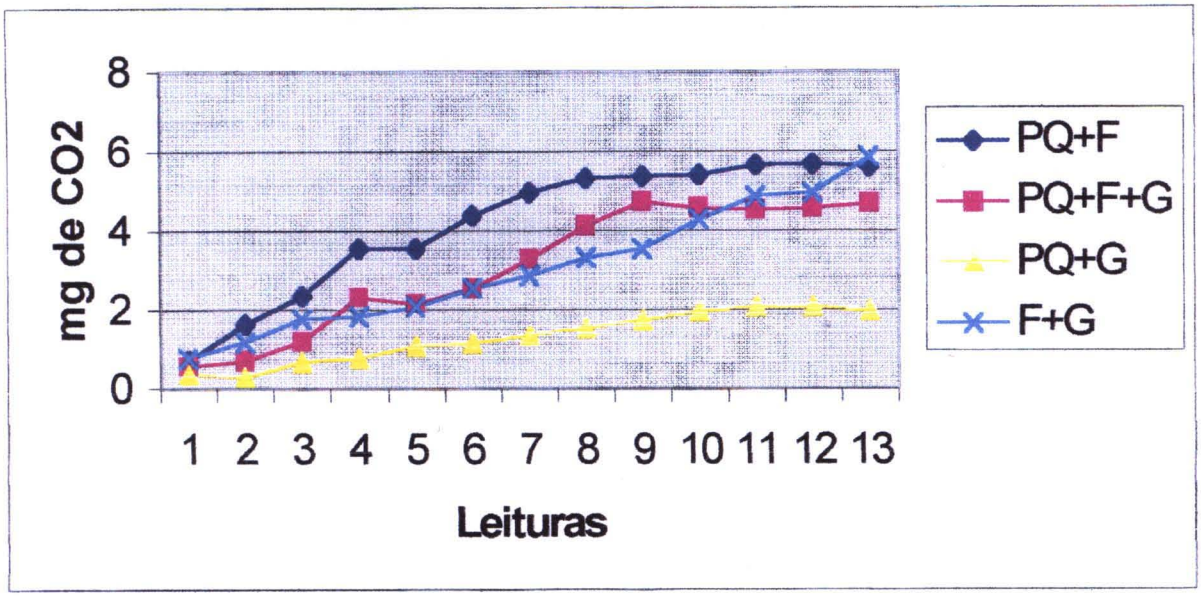


Figura 22: Quantidade de CO_2 produzido por CCB 004 no teste respirométrico após 28 dias de incubação e 13 leituras, com concentrações de 100ppm (mg/l) de Paraquat.

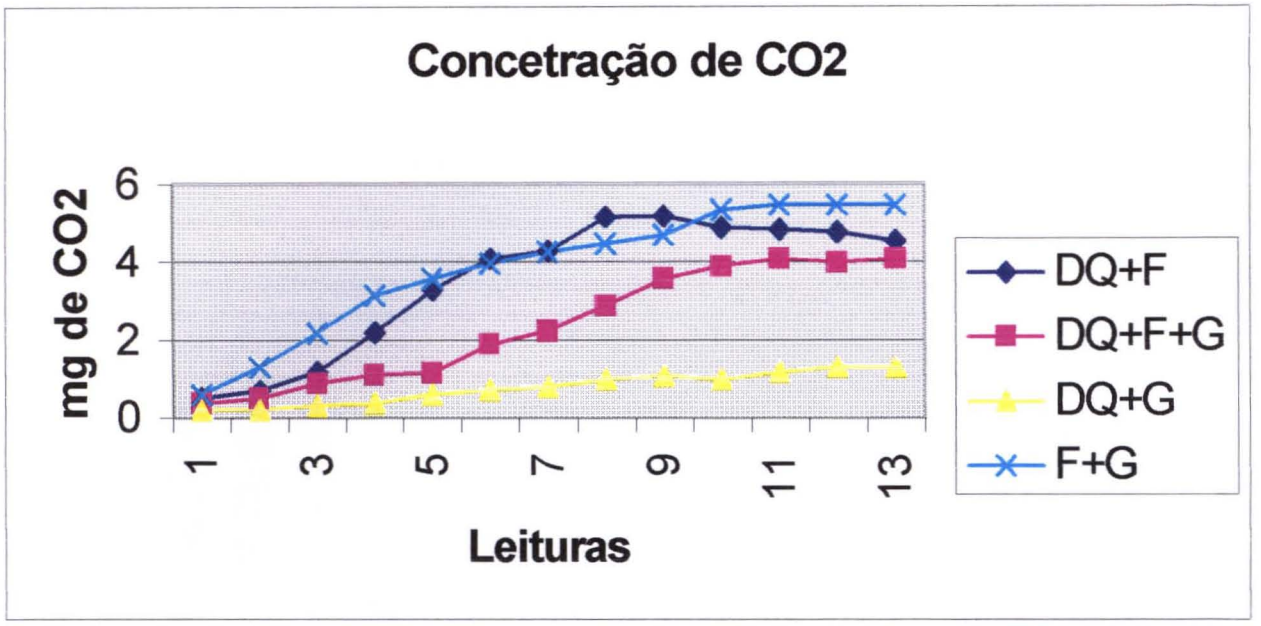


Figura 23: Concentração de CO_2 produzido por CCB 021 no teste respirométrico após 28 dias de incubação e 13 leituras com concentrações de 100 ppm (mg/l) de Diquat.

Verificamos que houve a produção de CO_2 nos dois fungos testados, com isso precisamos analisar quantitativamente se houve degradação dos compostos, uma vez que necessitamos da confirmação da degradação, já que só a respirometria não reflete dados quantitativos.

Por isso se fez necessário as análises espectrofotométicas para determinarmos a degradação dos herbicidas estudados.

5.4 Resultados da Análise Espectrofotométrica:

De acordo com as análises observadas verificamos reduções significativas do herbicida paraquat, CCB 004.

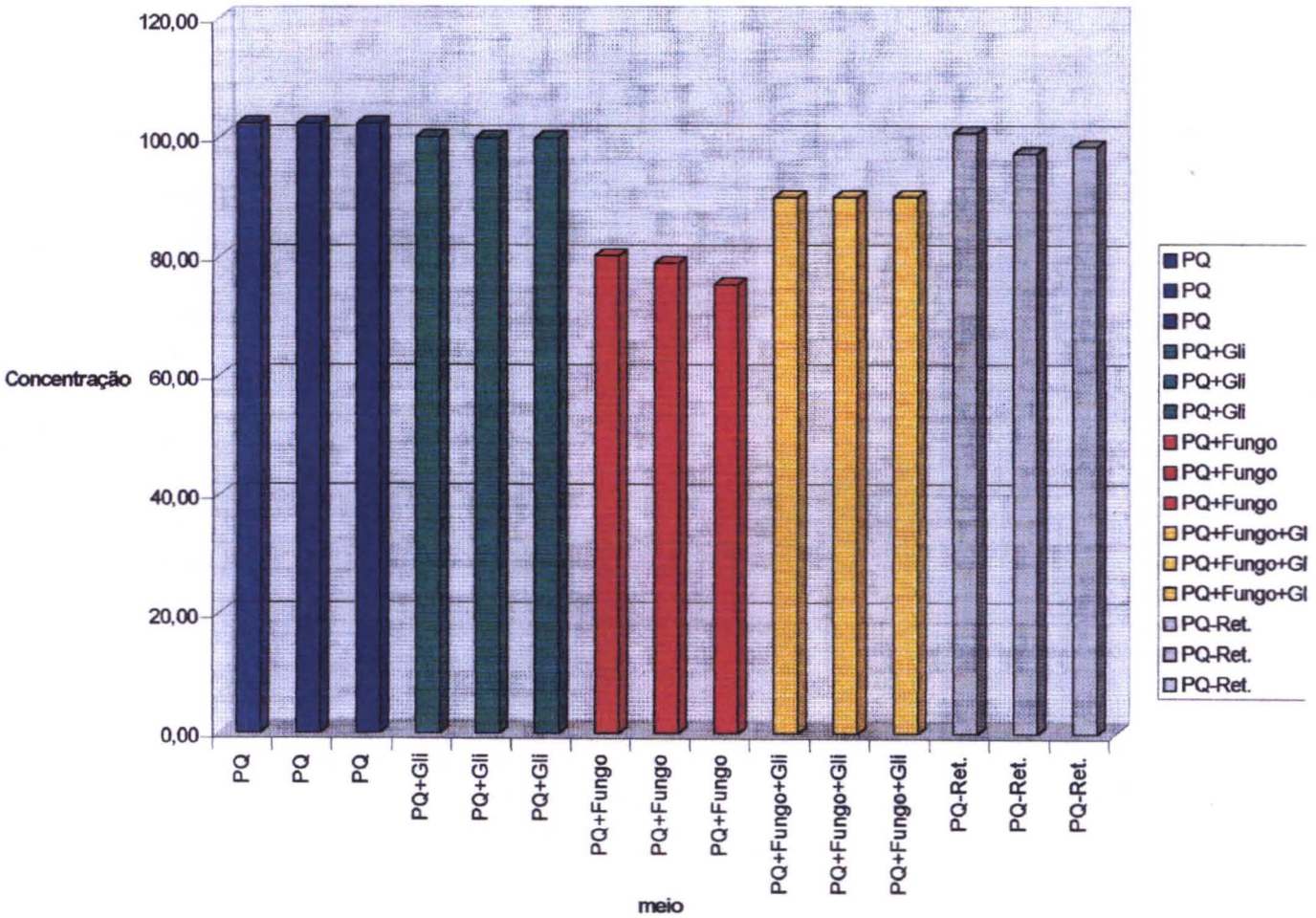


Figura 24: Variação nas concentrações de paraquat após teste de Biodegradabilidade, confirmados por espectrofotometria.

Observamos que as amostras que continham paraquat e fungo foram as que apresentaram os melhores resultados em relação à degradação.

Nos testes que continham glicose juntamente com o fungo, a degradabilidade não foi tão efetiva pois provavelmente o fungo usou o carbohidrato como fonte principal de carbono e usou o paraquat como fonte secundária.

Observamos que não houve degradação abiótica (paraquat + glicose) e nem retenção nos processos de filtragem verificados em PQ-ret.

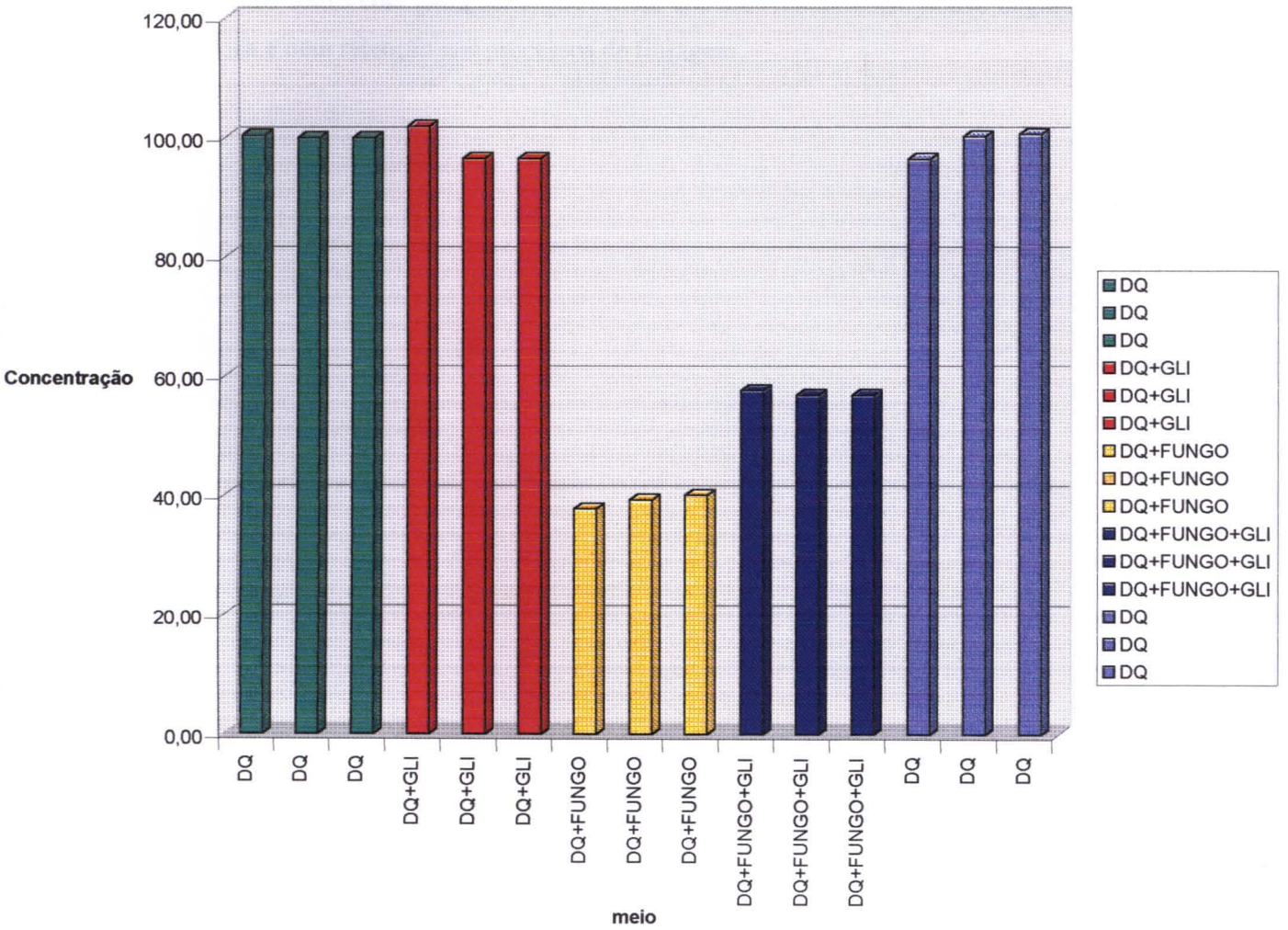


Figura 25: Variação nas concentrações de diquat após teste de Biodegradabilidade, confirmados por espectrofotometria.

O fungo CCB 021 foi o melhor a ser testado tanto em relação à tolerância quanto à biodegradabilidade, apresentando ótimos resultados como os apresentados no gráfico acima, onde as amostras que foram inoculadas diquat + fungo apresentaram mais de 60% de degradação; as amostras com fungo + diquat e glicose apresentaram níveis de mais de 50% de degradação.

As amostras que continham diquat + glicose não tiveram degradação assim como nos testes com paraquat o que reflete que efetivamente não houve degradação abiótica e nem retenção nos processos de filtragem.

5.5 Resultados dos testes de verificação da adsorsão/absorção.

Seguindo a metodologia citada no capítulo de materiais e métodos, item 6.15, elaboramos o teste nas mesmas condições dos ensaios respirométricos obtendo os seguintes resultados observados na figura 26, concentrações encontradas de diquat em tomo de 60, o que reflete degradação efetiva de 40ppm (mg/l) do herbicida, diferente dos resultados de espectro que indicou valores superiores a 50% de degradação.

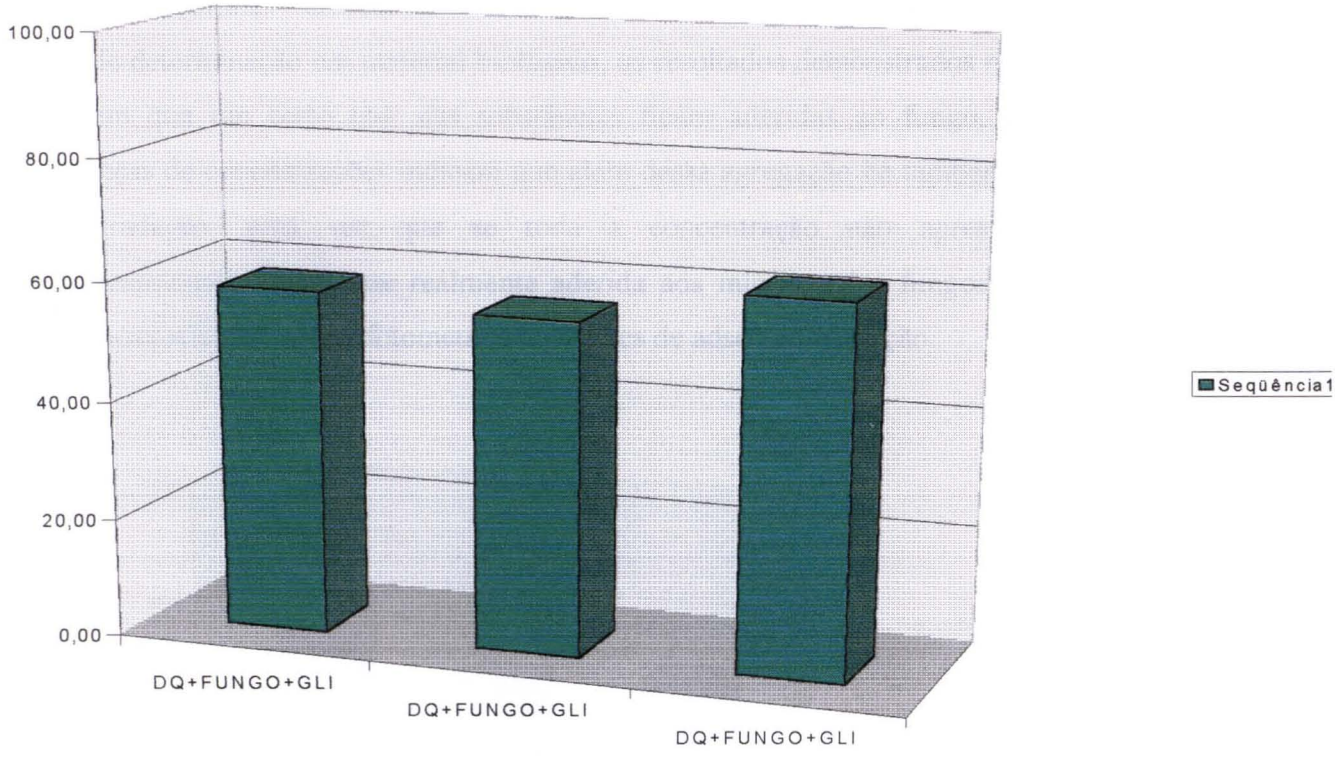


Figura 26: Resultados de concentração do herbicida diquat em determinação espectrofotometrica, junto ao fungo CCB 021.

Na figura 27 verificamos os resultados em relação ao herbicida paraquat, após teste de determinação em material biológico, os resultados demonstrados nos gráfico sugerem que um certo teor das substâncias ficam aderidas ao fungo, porém as diferenças de concentrações indicam que além dessa agregação há também a efetiva biodegradação, uma vez que se toda a concentração não apresentada na Espectrofotometria estivesse realmente aderida aos micélios dos fungos, a mesma seria mostrada nas espectofotometrias dos testes de adsorsão/absorção.

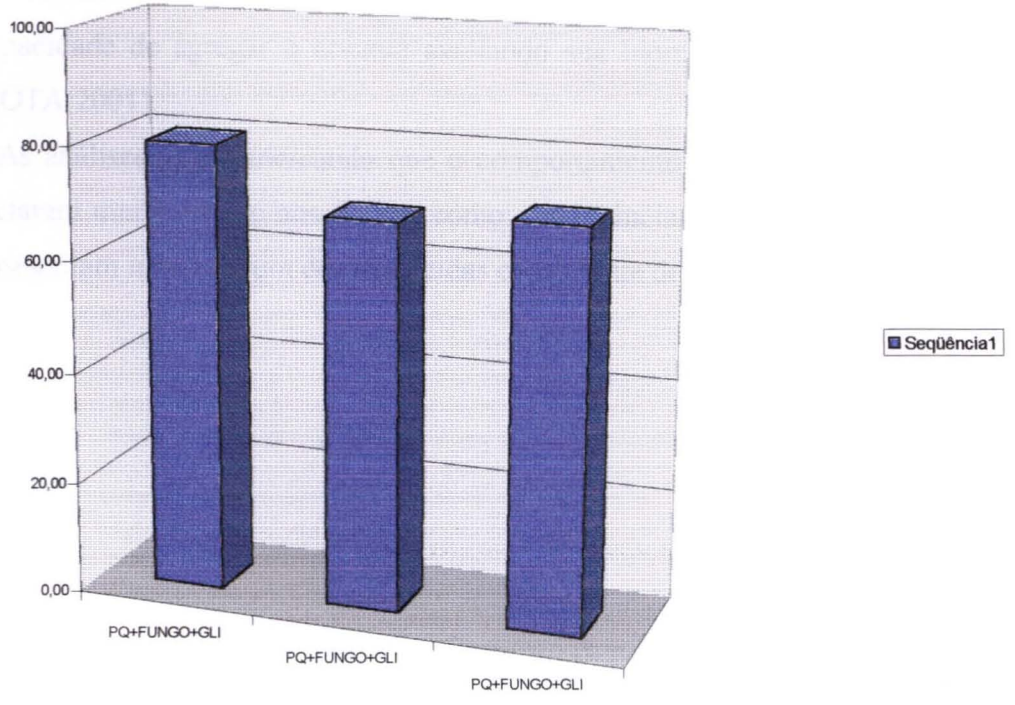


Figura 27: **Resultados de concentração do herbicida paraquat em determinação espectrofotometrica, junto ao fungo CCB 004.**

Observamos resultados semelhantes na figura acima onde o paraquat teve uma biodegradação média de 30% (valores máximos), confirmando as análises espectofotométricas.

8. DISCUSSÃO.

Testou-se a capacidade de biodegradação de quatro linhagens do fungo *P. ostreatus* junto a dois herbicidas , usando os testes de tolerância, biodegradabilidade e confirmação por determinação das concentrações em solução por espectrofotometria de absorção molecular.

Esse último teste (absorção/adsorção), teve uma característica comprovatória pois outros trabalhos usando fungos basideomicetos verificaram seu poder de remoção de substâncias orgânicas, tais como corantes em efluentes de industria têxtil pela capacidade de agregar o corante avaliando sua biomassa como sugerido por GUGLIOTA(2001).

As análises foram indicando que o comportamento das quatro linhagens se diferenciaram muito devido aos fatores como: intolerância de CCB 010 e 650, que não conseguiram usar nenhum dos herbicidas como fonte de carbono.

7.CONCLUSÕES e RECOMENDAÇÃO

Concluímos com os testes preliminares de tolerância que os fungos CCB 004 e CCB 021 foram os que mais toleraram a presença do herbicida paraquat e diquat, o que já é um indicativo da continuidade dos testes de avaliação do poder biodegradante desses organismos.

Esses resultados foram proveitosos uma vez que os fungos tolerantes já se encontram climatizados às condições brasileiras o que descarta à introdução de espécies de origem estrangeira (nesta pesquisa apesar de se tratar do mesmo gênero e espécie, CCB 010 e CCB 650 provinham do México e da China respectivamente).

O uso excessivo de agrotóxicos no solo, os impactos ambientais e a contaminação do solo já são conhecidos há décadas, a proposta de biorremediação usando basideomicetos tem demonstrado bons resultados para outros poluentes (vide tab.1) e contaminantes, com isso tentamos levar uma nova "biotecnologia" para tentar sanar ao menos em parte esse tipo de problema relativo a dificuldade de microrganismos eficientes na degradação de poluentes a idéia de usar fungos basideomicetos para dar continuidade às pesquisas e levar para testes em campo como alternativa de recuperação de solos contaminados.

Os testes com esses fungos contribuem também para a incrementação de um banco de dados sobre eficiência de fungos basideomicetos como degradantes, da Secretária Estadual do Meio Ambiente, que classifica esses organismos como potenciais biodegradadores de diversos xenobióticos.

As substâncias que foram testadas (paraquat e diquat) não são facilmente biodegradáveis ao menos sob o aspecto dos testes de biodegradabilidade aqui aplicados. GLENDHILL (1975) afirma que: "para uma substância ser facilmente biodegradável em relação ao teste respirométrico, ela deve ter 70% de degradação, o que não foi conseguido nos resultados obtidos.

O uso de microrganismos para fins de biorremediação é uma boa proposta, pois naturalmente bactérias e fungos ajudam na decomposição de xenobióticos, cabendo as futuras pesquisas em relação a biorremediação aplicar os organismos mais eficazes em questão aos poluentes; porém devemos ter o cuidado na escolha das espécies, ter conhecimento claro sobre sua biologia, aplicá-los em testes em vitro

para avaliar seus potências antes de usá-los em campo e respeitar as legislações ambientais vigentes, evitando assim a introdução de espécies alóctones que podem causar impactos ambientais na fauna e na flora nativa.

Estudar e aplicar formas alternativas de agricultura também pode ser vista como uma boa medida para a diminuição do uso de agrotóxicos e todos os impactos que eles causam.

Apesar dos bons resultados que obtivemos, o uso de basideomicetos como biorremediadores de solo ainda necessita de mais estudos, principalmente quanto aos testes em relação aos tipos de xenobióticos que os mesmos podem degradar, suas aplicações em campo e principalmente as avaliações das espécies mais eficazes junto com suas condições necessárias (estágio de crescimento,condições abióticas, nutrientes, etc...).

Concluímos pôr fim que o fungo *P. ostreatus* vem se destacando nessa linha, vários estudos em relação a esse fungo foram e estão sendo feitos com bons resultados e com os mais diversos tipos de poluentes, o que já caracteriza esse fungo como uma boa opção de escolha para os testes de biorremediação.

Como recomendação, em relação a avaliação da degradação biológica dos herbicidas, proõe-se para testes futuros o uso dos fungos tolerantes na biorremediação de solos impregnados com os agrotóxicos estudados no presente trabalho e outros de uso comum no Estado além de propor o uso desses fungos como biorremediadores de solos contaminados pelos mais diversos tipos de xenobióticos, um problema cada vez mais sério que afeta boa parte das áreas industrializadas no Brasil e no mundo, prejudicando a saúde pública e o equilíbrio ambiental , além de afetar indiretamente os recursos hídricos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, E. 1997. Lignin Chemistry -Past. present and future. Wood Science and technology 11:169-218.

ALLEMAN, B. C-, LOGAN, B. E. & GILBERTSON, R. L. 1992. Toxicity of pentachiorophenol to six species of white-rot fungi as a funcion of chemical dose. Applied and Environmental Microbiology 58(12): 4048-4050.

ALLEMAN, B. C., LOGAN, B. E. & GILBERTSON, R. L. 1995. Degradation of pentachiorophenol bu fixed films os white-rot fungi in totating tube bioreactors. Water Research 29(l): 61-67.

AGROCHEMICALS HANDBOOK, 2 nd ed., Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, England 1990

ANDREI, E. (coord.) Compêndio de Defensivos Agrícolas. São Paulo: Andrei Editorial, 4ª ed., 1993.

ARAÚJO, A.CP., NOGUEIRA, D.P., AUGUSTO, L.G.S. 2000. Impacto dos Praguicidas na Saúde: Estudo da Cultura de Tomate. *Revista de Saúde Pública* 34(3): 310.

AUST, S.D. Degradation of environmental pollutants by *Phanerochaete chrysporium*. Microbial Ecology, v. 20. P 197-209, 1990.

BEZALEL, L., HADAR, Y. FU, P. P., FREEMAN, J. P. & CERNIGLIA, C. E. 1996. Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene, and dibenzothiophene by the fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology 62(7): 2554-2559.

BONONI, Vera Lúcia Ramos (org.). Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 1998.

BONONI, V. L. R., MAZIERO, M. C. . & TRUFEM, S. F. B. 1995. Cultivo de cogumelos comestíveis. São Paulo, ed. Ícone. 206 p.

BOYLE, C. D. 1995. Development of a practical method for inducin white-rot fungi to grow into and degrade organopollutants in soil. Canadian Hournal of Microbiology 41(4-5): 345-353.

BRIGSS, S.A. Basic Guide to Pesticide: their caracteristcs and hazards. Hemisphere Publishing Corporation. Philadelphia, 1992.

CETESB, Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental- Solos- determinação da Biodegradação de Resíduos. Metódo respirométrico de Bartha. Norma Técnica L.6350- São Paulo, 1990.

DAVIS, M. W. GLASER, J. A., EVANS, J. W. & LAMAR, R. T. 1993. Field evaluation of the lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* to treat creosote-contaminated soil. Environmental Science and Technology 27:2572-2576.

DIQUAT in Hazardous Substances Data Bank , National Library of Medicine, Betehsda , MD (CD ROM version), Micromedex, Inc., denver, Co 1994.

DORES, E.F.G.C. e FREIRE, E.M.L. Contaminação do ambiente aquático pôr pesticidas: vias de contaminação e dinâmica dos pesticidas no ambiente aquático. *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*. Universidade Federal do Paraná. Ceppa, Curitiba, V.9 p.9-17 jan./dez./1999.

ECOBICHON, T.J. Toxic Effects of Pesticides in Casarett and Dooll's Toxicology. The Basic sciences of poisons. Fourth Edition, 1991.

E.P.A. Guidance for registration of pesticide containing as the active ingredient diquat dibromide (032201). Case number 0288. CAS 85.007-Office of pesticide programs. Washington. D.C., 1986.

E.P.A.(b) Office of drinking water. Paraquat health advisory, 1987.

ESSER,H.D., HEMINGWAY,R.J., KLEIN,W. SHAPARD,D.B., VONK,J.W. HOLLAND, P.T.: Recomended approach to the evaluation of the environmental behaviour of pesticides. Pure and Applicade. Chemystri., v.60, n 6, pg 901-932, 1988.

FIELD, J. A., DE JONG, E., COSTA, G. F. & BONT, J. A. M. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. Applied and Environmental Microbiology 58(7): 2219-2226, 1992.

GOLD, M.H., JOSHI.D.K., Degradation of 2,4,5-trichlorophenol by the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium.* Applied and Environmental Microbiolgy, .59(6): 1779-1785, 1993

GLENDHILL, W. E.,Screening test for assessment of ultimate biodegradability: linear alkylbenzene sulfonate. Applied Microbiology, 30: 922-929, 1975.

GUGLIOTA, A . de M. Utilização de Basideomicetos Nativos na Remoção de Corantes em Efluentes da Industria Têxtil. Tese de Doutorado apresentada no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo em 2001.-

HALL, A . H e BISMUTH, C. Paraquat poisoning, mechanisms, prevention, treatment. Marcel Dekker inc., 1995.

HARTLEY, D. and KIDD, H. The agrochemics handbook. Nottinghm, England: Royal Societ of Chemistry, 1983.

HAYES, W. J. Pesticides studied in man. Baltimore, M.D. Willians and Wilkins, 1982.

HAYES, W. J. and LAWS, E.R. Handbook of pesticide toxicology. vol.3. Classes of pesticides. Academic Press, Inc.,N.Y.1990.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. Estatísticas da Produção Vegetal, por Escritório de Desenvolvimento Rural, Estado de São paulo. Série de informações. estatísticas. Agricola, SP, v.12, n 1, p. 1-248, 2001

KHADRANI, A. , SEIGLE-MURANDI, F. , STEIMAN, R. , VROUMSIA, T. Degradation of three phenylurea herbicides (cholortoluron, isoproturon and diuron) by micromycetes isolated from soil. Chemosphere, v. 38, n.° 13, p. 3041-3050, 1999.

KREMER, S. , STERNER, O. 1996. Metabolism of 3,4-dichloroaniline by the basidiomycete *Filoboletus* species TA9054. Journal of Agricultural and Food Chemistry 44(4): 1155-1159.

LAMAR, R. T. & DIETRICH, D. M. 1992. Use of lignin-degradin fungin in the disposal of pentachlorophenol treated wood. Journal of Industrial Microbiology 9(3-4):181-191.

LAMAR, R.T. & EVANS, J. W. 1993. Solid-phase treatment of a pentachlorophenol-contaminated soil using lignin-degrading fungi. Environmental Sciece and Technology 27:2566-2571.

LAMAR, R.T., DAVIS, M. W., DIETRICH, D. M. & GLASER, J. A. 1994. Treatment of a pentachlorophenol and creosote-contaminated soil using the lignin-degrading fungus *Phanerochaete* sordida: a field demonstration. Soil Biology and Biochemistry 26(12): 1603-1611.

MACHADO, K. M. G. 1998. Biodegradação de pentaclorofenol pôr fungos basidiomicetos ligninolíticos em solos contaminados pôr resíduos industriais. Tese de Doutorado, apresentada no Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, , Rio Claro, 1998.

MATHEUS, D. R. Biorremediação de solos contaminados pôr basideomicetos brasileiros. Dissertação de Mestrado apresentada no Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.

MATHEUS, D. R., MACHADO, K. M. G., FABRIS, C. & BONONI, V. L. R. 1998. Protocol for selection of basid-iomycetes to be applied in contaminated soils remediation systems. In Proceedings of Third Latin American Biodegradation and Biodeterioration Symposium, April, Florianópolis, SC (no prelo).

MATHEUS, D.R. e OKINO ,L. (Cap. 8: Uso de Basideomicetos em aplicações Biotécnológicas) in BONONI, V. L. R. (org.) Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 1998.

MORGAN, P., LEWIS, S. T. & WATKINSON, R. J. 1991. Comparison of abilities of white-rot fungi to mineralize selected xenobiotic compounds. Applied Microbiology and Biotechnology 34:693-696.

OKEKE, B. C., SMITH, J. E., PATERSON, A. & WATSON-CRAIK, I. A. 1996. Influence of environmental parameters on pentachlorophenol biotransformation

in soil by *Lentinula edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. Applied Microbiology and Biotechnology 45(1/2):263-266.

PARAQUAT in Hazardous Substances Data Bank , National Library of Medicine, Betehsda , MD (CD ROM version), Micromedex, Inc., denver, Co 1994.

PEDROSA, R.C., Determinação de Paraquat em Material Biológico. Dissertação de Mestrado apresentada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas –área de Análises Toxicológicas- da Universidade de São Paulo em 1984.

PONTES, V. I.de M. Biodegradação de Efluentes Contendo Fenol Eletrolizado em Solo Utilizando o Método Respirométrico de BARTHA & PRAMER. Dissertação de Mestrado apresentada no Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001

RACKE, K.D., COALTS, J.R.: Pesticides in the soil microbial ecosystem in RACKE, K.D., COALTS, J.R.:Enhanced biodegradation of pesticides in the environment. Iowa:Dow Elanco, pg 1-12., 1990

RODRIGUES, Benedito Noedi & ALMEIDA, Fernando Sousa de (in memorian). Guia de Herbicidas. 4ª ed. 1998.

RUEG, E. F. –coordenador- Impacto dos agrotóxicos sobre o meio ambiente, a saúde e a sociedade. SP.: ícone, 1991.

SAX, N.I, Dangerous proprieties of industrial materials. Sixth edition. N.Y. Van Nestrand Company, 1984.

STEIMAN, R. et al. Biodegradation of pentachlorophenol by micromycetes. II. Ascomycetes, basidiomycetes, and yeasts. International Journal, vol. 9 (1994) 1-6.

SHEPARD, T.H. Catalog of teratogenic agents.Fifth edition. Baltimore. MD: The Johns Hopkins University Press, 1986.

STEVENS, J. T. and DARREL, D.S. Herbicides in handbook of pesticides toxicology. vol. 3. Classes of pesticides. Wayland J. Havens and Edward R. Laws editors. Academic Press, N.Y., 1991.

SOCCOL, C.R., PINHEIRO, L.I., KREFTA, A.A.W. Degradação Microbiológica de Pesticidas no Solo. Revisão bibliográfica. Pesticidas Revista Técnico Científica. Universidade Federal do Paraná. Ceppa, Curitiba, V.5 p.8-18 jan./dez/1995.

TAKADA, S., NAKAMURA, M., MATSUEDA, T., KONDO, R. & SAKAI, K. 1996. Degradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. Applied and Environmental Micribiology 62(12): 4223-4328.

TUCKER, R. and CRABTREE, D. G. Handbook of toxicity of pesticides to wild life. U.S. Departament of Agriculture, Fish and wild life service, 1970.

VETTORAZZI, G. International Regulatory Aspects for Pesticides Chemicals. vol 1. C.R.C. Press, 1979.

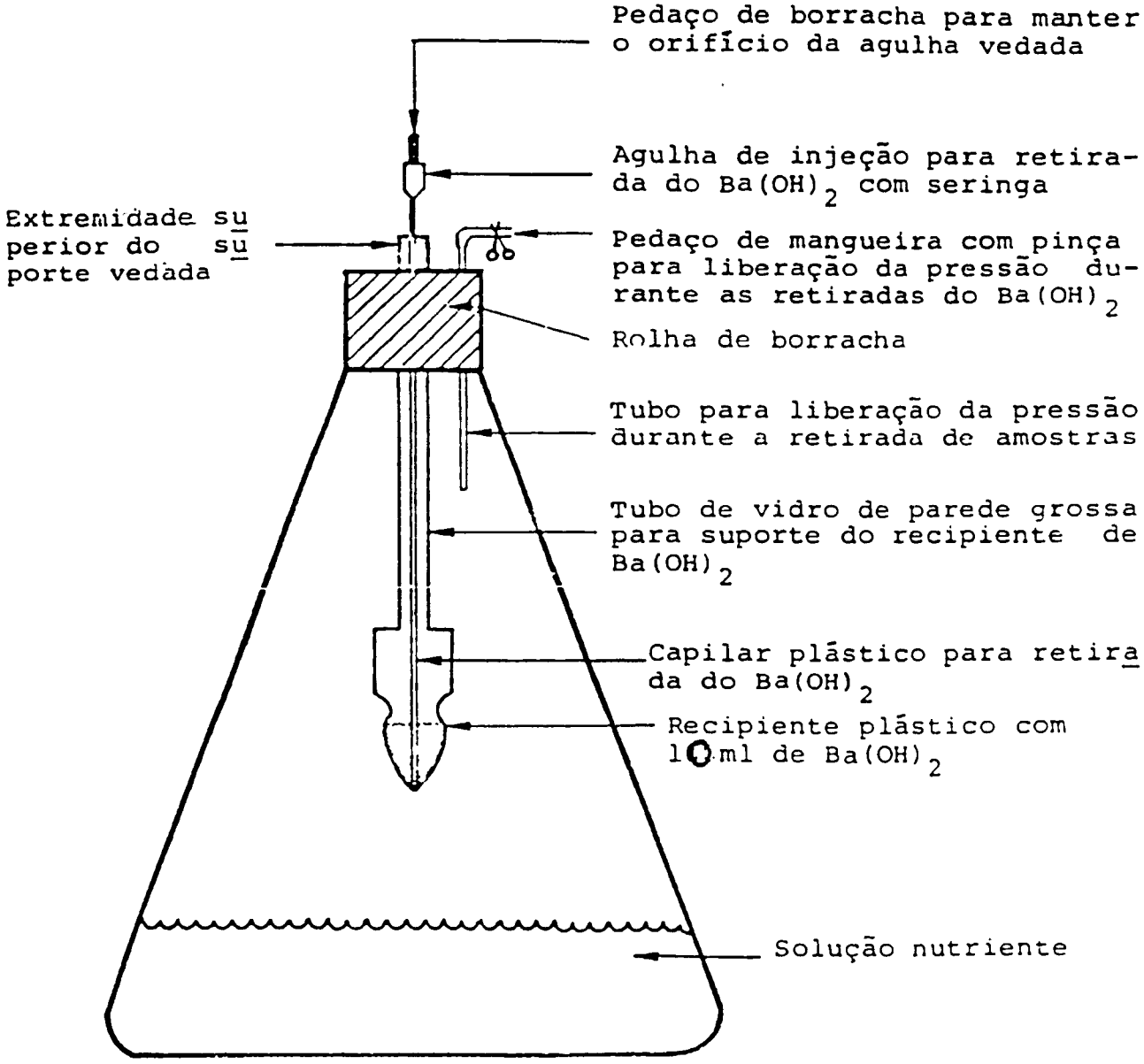
YONG, L. Y. e CERNAGLIA, C. E. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals, ed Wiley-Liss, New York, 1995.

WARE, G. W.: Effect of pesticides on nom- trget organisms. Residue Reviews, N.Y., V 76, p 173- 201- 1980.

WALKER, M.M. and LAWRENCE, H. K. EPAs Pesticides Fact Sheet Database, Lewis publishers, 1992.

WSSA (Weed Science Society of America), Herbicide Handbook Committee of the WSSA, 6th, Ed. WSSA, Champaing, I.L.,1989.

ANEXO A:



Frasco para ensaio da Biodegradabilidade pela medida de dióxido de carbono, GLEDHILL, 1975.

ANEXO B:

Fórmula do Meio MEA 2%:

Extrato de malte	**20g**
Glicose	**20g**
Agar	**15g**
Peptona	**1g**
Água destilada qsp	**1litro.**

ANEXO C:

Fórmula do Meio BIII

Glicose	**10g**
Thiamina HCL	**1 mg**
Tartarato de Amônia	**3,75 g**
Sulfato de Mg	**0,5g**
Fosfato Monocálcio	**0,016g**
Sulfato de Mn	**0,016g**
Tampão Acetato	**pH 4,5**

980 ml de água destilada

ANEXO D:

Fórmula do Meio BIII modificado

Thiamina HCL	**1 mg**
Tartarato de Amônia	**3,75 g**
Sulfato de Mg	**0,5g**
Fosfato Monocálcio	**0,016g**
Sulfato de Mn	**0,016g**
Tampão Acetato	**pH 4,5**

980 ml de água destilada

ANEXO E:

Água isenta de CO_2: (PONTES, 2001 –modificado-)

Água destilada fervida até a ebulição durante 60minutos.

Resfriar em recipiente com filtro de ascarita

Guardar em recipiente com filtro de ascarita

ANEXO F:

Solução de hidróxido de potássio 0,2 N:

Pesar 11,2 g de KOH (p. a .)

Dissolver em 1 litro de água isenta de CO_2

ANEXO G:

Solução de ácido clorídrico 0,1 N

Medir 8,5 ml de HCl concentrado

Completra para 1 litro com água destilada

ANEXO H:

Solução de Cloreto de Bário 1,0 N

Pesar 12,2 g de Cloreto de Bário

Completar o volume para 100ml com água destilada isenta de CO_2

ANEXO I:

Solução indicadora de Fenolftaleina;

Dissolver 0,2g de fenolftaleina em 60 ml de etanol

Completar para 100 ml com água destilada

ANEXO J:

Solução de Carbonato de Sódio

Secar o carbonato em mufla por por 1h a 270 graus Celsius

Pesar 3,5 g desse carbonato, dissolver com 500ml de água destilada isenta de CO_2 a 15 graus Celsius e completar para 1 litro com água dest. Isenta de CO_2