



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**ANÁLISE DA FITOTOXICIDADE DA ATRAZINA APÓS
BIODEGRADAÇÃO FÚNGICA**

ALESSANDRA ANDRETTA

Foz do Iguaçu

2022



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**ANÁLISE DA FITOTOXICIDADE DA ATRAZINA APÓS
BIODEGRADAÇÃO FÚNGICA**

ALESSANDRA ANDRETTA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos

Foz do Iguaçu

2022

ALESSANDRA ANDRETTA

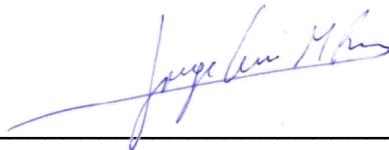
**ANÁLISE DA FITOTOXICIDADE DA ATRAZINA APÓS
BIODEGRADAÇÃO FÚNGICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA



Orientador: Prof. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos
UNILA



Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz
UNILA



Ma. Juliana Kafka Bilha
PPGIES

Foz do Iguaçu, 22 de dezembro de 2022.

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Alessandra Andretta

Curso: Biotecnologia

Tipo de Documento

- | | |
|---|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> graduação | <input type="checkbox"/> artigo |
| <input type="checkbox"/> especialização | <input checked="" type="checkbox"/> trabalho de conclusão de curso |
| <input type="checkbox"/> mestrado | <input type="checkbox"/> monografia |
| <input type="checkbox"/> doutorado | <input type="checkbox"/> dissertação |
| | <input type="checkbox"/> tese |
| | <input type="checkbox"/> CD/DVD – obras audiovisuais |
| | <input type="checkbox"/> _____ |

Título do trabalho acadêmico: ANÁLISE DA FITOTOXICIDADE DA ATRAZINA APÓS BIODEGRADAÇÃO FÚNGICA

Nome do orientador(a): Prof. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos

Data da Defesa: 22/12/2022

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

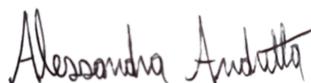
a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino- Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino- Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons Licença 3.0 Unported*.

Foz do Iguaçu, 22 de Dezembro de 2022.



Assinatura do Responsável

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, minha orientadora, Prof. Rafaella pela sua constante orientação e ajuda na elaboração deste trabalho.

Aos membros da banca, Prof. Jorge e Juliana pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições.

Aos docentes do curso, por todos os ensinamentos e oportunidades.

Aos meus amigos e colegas, pelo apoio emocional, risadas e trocas de experiências durante a graduação.

À Universidade Federal de Integração Latino-americana, pelo ensino de qualidade e por proporcionar diversas trocas culturais.

À minha família, que apesar de distantes sempre estiveram comigo. Em especial, aos meus irmãos, Magali e Darlan, pela distração, conversas, conselhos e amizade. Por fim, aos meus pais, Alice e Dirso, a quem dedico esse trabalho, obrigada por todo apoio, carinho e confiança que sempre depositaram em mim.

ANDRETTA, Alessandra. **ANÁLISE DA FITOTOXICIDADE DA ATRAZINA APÓS BIODEGRADAÇÃO FÚNGICA**. 2022. 60 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2022.

RESUMO

A atrazina (ATZ) é um herbicida muito comum utilizado para o controle de plantas daninhas, porém é capaz de permanecer por longos períodos no solo e ambientes aquáticos. Uma das formas de remover a ATZ do ambiente é através da biorremediação, utilizando fungos e bactérias. No entanto, sua degradação pode gerar resíduos tóxicos, assim, é necessário a avaliação da toxicidade dos metabólitos gerados após a biodegradação. De acordo com a literatura, o pepino (*Cucumis sativus*) se mostrou um ótimo modelo vegetal para a análise da fitotoxicidade e foi selecionado, no presente trabalho, para a avaliação da toxicidade do processo de biodegradação da ATZ pelos fungos *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018, *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014, e *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111, pertencentes à Coleção de Cultura de Micro-organismos de Importância Biotecnológica e Ambiental (CCMIBA). Os fungos foram reativados e cultivados em meio malte 2 % (MA2) na presença e ausência da atrazina (10 mg), por dez dias a 28 °C. Após o crescimento, a biomassa foi quantificada (peso seco) e o sobrenadante separado para avaliação da toxicidade. As sementes de *C. sativus* foram pré-tratadas e cultivadas com cinco (5) ml de cada tratamento do fungo, em seguida, foram mantidas em temperatura ambiente, durante nove dias. O crescimento das radículas e hipocótilos foram mensurados para o cálculo da porcentagem de inibição (toxicidade). O peso seco da biomassa dos fungos *C. rosea* CCMIBA_R018 e *P. lilacinum* CCMIBA_R014 mostraram resultados favoráveis, sem alteração do crescimento. Já *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 apresentou crescimento significativamente menor ($p < 0,05$) na presença de ATZ, indicando sensibilidade ao herbicida. Da mesma forma, para os testes de toxicidade, o tratamento da ATZ por *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 resultou na maior toxicidade (84,7 %), seguido por *C. rosea* CCMIBA_R018 (80,47 %), indicando, para esses fungos, possivelmente a formação de metabólitos tóxicos decorrentes da degradação. Enquanto, para *P. lilacinum* CCMIBA_R014 não houve toxicidade (0 %) do sobrenadante, indicando eficiência no processo de desintoxicação da ATZ. Apesar do resultado positivo do uso de *C. sativus* como indicador, nos testes sem ATZ (controles) identificamos, para alguns fungos, que a presença de metabólitos naturalmente produzidos pelos fungos pode interferir no crescimento das sementes, mostrando que *C. sativus* pode ser sensível à presença destes compostos fúngicos. Os resultados obtidos no presente estudo indicam que esses fungos possuem potencial para biorremediação da ATZ e que o uso futuro de um consórcio entre esses três fungos é uma promissora alternativa para a degradação completa deste poluente, e conseqüentemente, redução da sua toxicidade.

Palavras-chave: pesticidas, *Cucumis sativus*, biorremediação, fungos, toxicidade.

ANDRETTA, Alessandra. **ANÁLISE DA FITOTOXICIDADE DA ATRAZINA APÓS BIODEGRADAÇÃO FÚNGICA**. 2022. 60 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2022.

ABSTRACT

Atrazine (ATZ) is a common herbicide used to control weeds, but it can remain for long periods in soil and aquatic environments. One of the ways to remove ATZ from the environment is through bioremediation, using fungi and bacteria. However, its degradation can generate toxic residues, so assessing the toxicity of the metabolites generated after biodegradation is necessary. According to the literature, the cucumber (*Cucumis sativus*) proved to be an excellent plant model for the analysis of phytotoxicity and was selected, in the present work, for the evaluation of the toxicity of the ATZ biodegradation process by the fungi *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018, *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014, and *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 from Culture Collection of Microorganisms to Biotechnological and Environmental Importance (CCMIBA). The fungi were reactivated and then cultivated in 2% malt medium (MA2) in the presence and absence of atrazine (10 mg), for ten days at 28 °C. After growth, the biomass was quantified (dry weight) and the supernatant was filtered and separated for toxicity assessment. *C. sativus* seeds were pretreated and grown in a petri dish with five (5) ml of each fungus treatment, then kept at room temperature for nine days. The growth of rootlets and hypocotyls was measured to calculate the percentage of inhibition (toxicity). The dry weight of the biomass of the fungi *C. rosea* CCMIBA_R018 and *P. lilacinum* CCMIBA_R014 in the presence and absence of ATZ showed favorable results, with no change in growth. The fungus *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 showed significantly ($p < 0.05$) lower growth in the presence of ATZ, indicating sensitivity to the herbicide. Likewise, for toxicity tests, treatment of ATZ by *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 resulted in the highest toxicity (84.7 %), followed by *C. rosea* CCMIBA_R018 (80.47 %), indicating, for these fungi, possibly the formation of toxic metabolites resulting from degradation. While, for *P. lilacinum* CCMIBA_R014 there was no toxicity (0 %) of the supernatant, indicating efficiency in the ATZ detoxification process during biodegradation. Despite the positive result of using *C. sativus* as an indicator, in tests without ATZ (controls) we identified, for some fungi, that the presence of metabolites naturally produced by fungi can interfere with seed growth, showing that *C. sativus* can be sensitive to the presence of these fungal compounds. The results obtained in the present study indicate that these fungi have the potential for ATZ bioremediation and that the future use of a consortium between these three fungi is a promising alternative for the complete degradation of this pollutant, and consequently, reduction of its toxicity.

Keywords: pesticides, *Cucumis sativus*, bioremediation, fungi, toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura molecular da atrazina	12
Figura 2 - Mecanismo de ação da ATZ	13
Figura 3 - Rota de degradação da atrazina no solo	19
Figura 4 - Biodegradação intracelular catalisada pelo citocromo P450. (SET) por transferência de elétron; (HAT) pela abstração do átomo de hidrogênio.	20
Figura 5 - Morfologia da semente	21
Figura 6 - Aspecto morfológico dos fungos <i>Bjerkandera</i> sp. CCMIBA_R111, <i>Clonostachys rosea</i> CCMIBA_R018 e <i>Purpureocillium lilacinum</i> CCMIBA_R014 em meio de cultivo com extrato de malte e ágar após 7 dias.	28
Figura 7 - Aspecto morfológico dos cultivos dos fungos (A) <i>Purpureocillium lilacinum</i> CCMIBA_R014 e (B) <i>Bjerkandera</i> sp. CCMIBA_R111.	29
Figura 8 - <i>Bjerkandera</i> sp. CCMIBA_R111.	29
Figura 9 - Microestruturas dos esporos produzidos por <i>C. rosea</i> CCMIBA_R018. (A) Conídios; (B) Clamidósporos.	30
Figura 10 - Microestrutura de <i>P. lilacinum</i> CCMIBA_R014 (A) conídios; (B) conidióforos	31
Figura 11 - Peso seco da biomassa fúngica produzida após incubação por 10 dias a 28°C e 150 rpm.	32
Figura 12 - Crescimento fúngico nos ensaios com <i>C. sativus</i> . Os pontos brancos sobre o papel filtro são micélios fúngicos.	35
Figura 13 - Crescimento fúngico nos ensaios com <i>C. sativus</i> . (A) placa onde foi usado o sobrenadante que continha fungo cultivado em meio com ATZ. (B) placa onde foi usado o sobrenadante que continha apenas ATZ e meio.	35
Figura 14 - Controle negativo do tratamento nos ensaios com <i>C. sativus</i> mostrando a presença de um composto colorido após germinação.	36
Figura 15 - Média do crescimento das sementes (cm).	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros Físico-Químicos da Atrazina	14
Tabela 2 - Percentual de toxicidade (%) dos ensaios após período de incubação das sementes de <i>C. sativus</i> com e sem ATZ por nove dias.	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1. USO E TOXICIDADE DA ATRAZINA	12
2.2. BIORREMEDIAÇÃO DA ATRAZINA	16
2.3. FITOTOXICIDADE	21
2.3.1. <i>Cucumis sativus</i>	22
3. OBJETIVO	25
3.1. OBJETIVOS GERAIS	25
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1. MICRORGANISMOS	26
4.2. CRESCIMENTO FÚNGICO EM MEIO LÍQUIDO	26
4.3. DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA	26
4.4. ANÁLISE DE FITOTOXICIDADE COM <i>Cucumis sativus</i>	27
4.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1. MICRORGANISMOS	28
5.2. BIOMASSA	31
5.3. FITOTOXICIDADE	35
6. CONCLUSÃO	41
7. REFERÊNCIAS	42
8. ANEXOS	53

1. INTRODUÇÃO

O uso de pesticidas e fertilizantes, produtos químicos sintéticos, usados para controlar a população de insetos, larvas, fungos, carrapatos e plantas daninhas a fim de diminuir a ação danosa provocada por esses vetores, permitiu aumentar a produção de alimentos em uma escala nunca vista (BRASIL, 2002; INCA, 2021). Porém, a necessidade de aumentar ainda mais a produtividade agrícola, juntamente com o uso de sementes geneticamente modificadas resistentes a esses compostos químicos, a fim de acompanhar o crescimento demográfico, tem intensificado o uso de pesticidas. Desta forma, esses agroquímicos têm causado um impacto significativo nos ecossistemas terrestres e aquáticos, além de efeitos tóxicos para os seres humanos e morte em massa da biota não humana, como peixes, anfíbios, abelhas, pássaros e pequenos mamíferos (CARVALHO, 2017).

Os herbicidas, agentes biológicos ou substâncias químicas capazes de eliminar as espécies de ervas daninhas (ROMAN *et al*, 2005), foram o grupo de pesticidas que mais se expandiram nas últimas décadas, dentre eles, a atrazina (ATZ) é o mais amplamente utilizado no controle de plantas daninhas em diversas culturas devido à sua praticidade de uso, baixo custo e eficácia (HE *et al*, 2019). A ATZ possui estabilidade estrutural, propriedades não biodegradáveis e permanece por longos períodos no ambiente devido a sua meia-vida em torno de 41 a 231 dias. Além disso, possui alta solubilidade e mobilidade nos solos. Todos esses fatores contribuem para que a ATZ persista por muito tempo nas águas superficiais e subterrâneas, afetando o ecossistema e a saúde humana (JIANG *et al*, 2020; HENN *et al*, 2020). A resistência da ATZ à degradação se dá ao fato de a molécula ser formada por um anel aromático heterocíclico, com átomos de carbono e nitrogênio alternando, além de um átomo de cloro, que torna a molécula bastante estável devido à eletronegatividade deste átomo ligado à molécula (CARBONERAS *et al.*, 2017).

Os fungos são capazes de degradar naturalmente a ATZ do solo através do processo de N-desalquilação, para isso podem usar o mecanismo de biodegradação intracelular, através do complexo enzimático do citocromo P450, ou por enzimas extracelulares, dentre elas a lignina, manganês peroxidase e lacase são as mais conhecidas e estudadas, são responsáveis por oxidar estruturas fenólicas e não fenólicas. A degradação da ATZ pelos fungos também pode ocorrer por bio-sorção,

onde biomoléculas ou a biomassa fúngica se ligam e absorvem contaminantes de soluções aquosas (NICODEMO, 2021; NGUYEN *et al*, 2014; MIN *et al*, 2001).

A biorremediação, processo pelo qual organismos vivos ou seus subprodutos são utilizados para recuperar áreas contaminadas, tem sido estudada para o tratamento de solos contaminados com ATZ (GONÇALVES & DELABONA, 2022). Várias técnicas *in situ* e *ex situ* foram utilizadas com sucesso para remediar esse agrotóxico. As técnicas *ex situ*, caracterizam-se pelo solo escavado e transportado para uma estação de tratamento (TOMEI & DAUGULIS, 2013), enquanto as técnicas *in situ* promovem a degradação no local contaminado, essa abordagem envolve a bioestimulação, bioaumentação e fitorremediação (PERELO, 2010).

Apesar de importante recurso de biorremediação, a biodegradação fúngica em alguns casos pode gerar resíduos mais tóxicos que a própria ATZ (MATIAS *et al*, 2021), portanto a avaliação da toxicidade é necessária para investigar os possíveis danos causados por esses metabólitos durante um estudo de biodegradação. Para isso, a análise de fitotoxicidade, que utiliza plantas para definir se um agente é tóxico ou não, é uma etapa necessária. A fitotoxicidade possui as vantagens de ser sensível a diferentes compostos químicos, ter simplicidade na realização dos testes, ser de baixo custo, ser fácil de manipular e armazenar (FISKESJÖ, 1985; PEDUTO *et al*, 2019). No seu crescimento as plantas absorvem grandes quantidades de elementos essenciais e não essenciais, que em determinada concentração podem ser tóxicos, inibindo o crescimento da planta, e é dessa forma que é possível avaliar a toxicidade de uma substância (FALANGA *et al*, 2020).

Portanto, o presente projeto tem como objetivo avaliar a fitotoxicidade do processo de biodegradação da ATZ por fungos de solo utilizando *Cucumis sativus* como modelo vegetal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

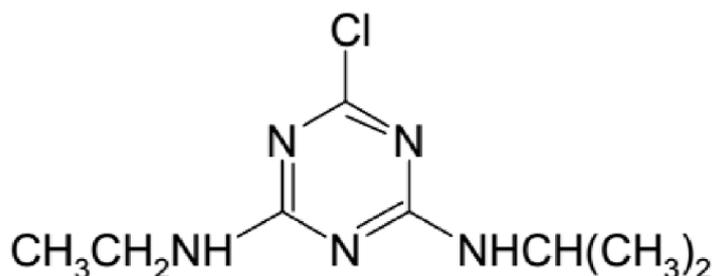
2.1. USO E TOXICIDADE DA ATRAZINA

Os pesticidas são compostos importantes capazes de permitir um aumento considerável na produtividade agrícola, porém podem causar contaminação do solo, da água e dos alimentos, além de danos aos seres humanos e animais devido a exposição excessiva e uso inadequado, por essa razão, foram desenvolvidos regulamentos que auxiliam na sua aplicação, incluindo a dosagem certa para cada produto químico e épocas de aplicação (CARVALHO, 2017) É importante destacar que o produto utilizado para controle de pragas e doenças nas plantações é conhecido mundialmente como pesticida. O Brasil foi o único que adotou agrotóxico como nomenclatura própria (PASCHOAL, 2019).

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de produtos agrícolas, em consequência disso, também é um dos maiores consumidores mundiais de agrotóxicos, como a ATZ e o glifosato, usados para manter esse alto rendimento agrícola (GONÇALVES & DELABONA, 2022). Em 2020, a ATZ esteve em 4º lugar no ranking de ingredientes ativos mais vendidos no Brasil, com mais de 33 mil toneladas vendidas (IBAMA, 2022).

A ATZ (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) (Figura 1) é um herbicida utilizado para o controle de ervas daninhas principalmente nas culturas de milho, sorgo e cana-de-açúcar (KAMAZ *et al*, 2020), é amplamente utilizada devido a sua eficácia, baixo custo e praticidade de uso (HE *et al*, 2019).

Figura 1 - Estrutura molecular da atrazina

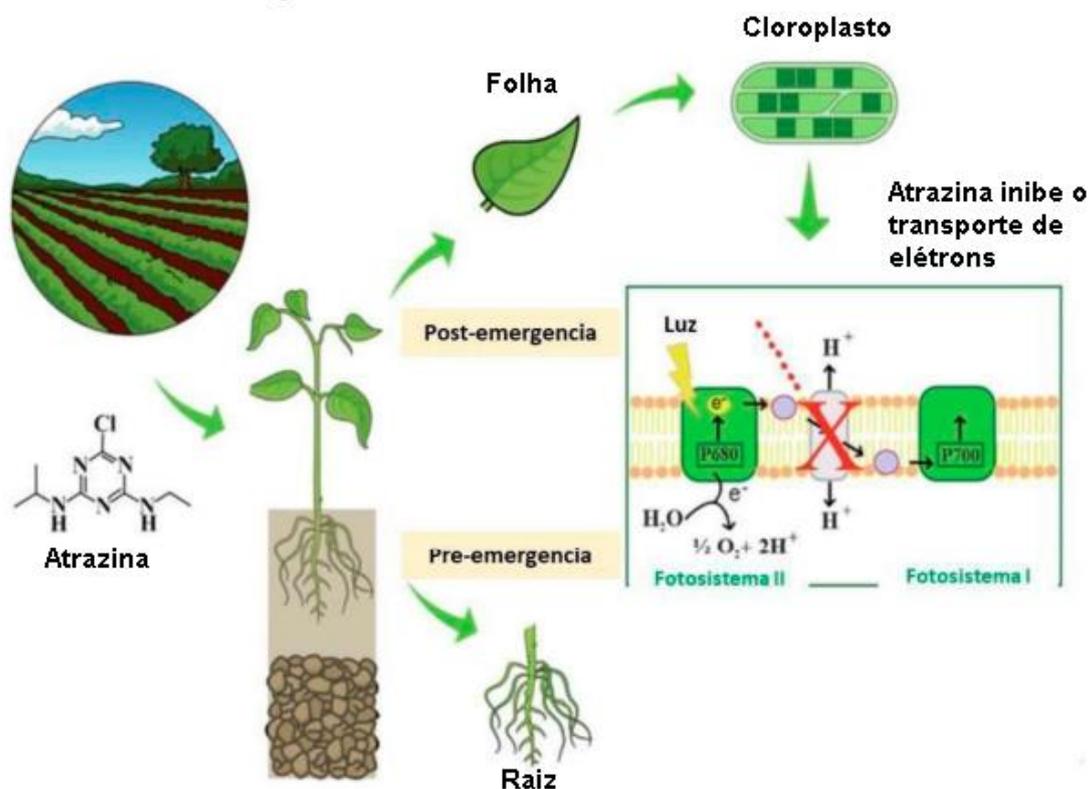


Fonte: Javaroni *et al* (1999)

O mecanismo de ação da ATZ é através da inibição do fotossistema II das plantas, durante a reação de Hill, bloqueando o transporte de elétrons, e

consequentemente inibindo a fotossíntese. Isso gera o bloqueio na síntese de carboidratos, redução na reserva de carbono e acúmulo de gás carbônico no interior da folha. A absorção da ATZ pelas plantas durante a pré-emergência (antes do aparecimento de plantas daninhas) ocorre principalmente pelas raízes, que acumulam-se nos meristemas apicais e nas folhas. Na pós-emergência (após o aparecimento da planta daninha) a ATZ entra sobretudo pelas folhas (FERNANDES *et al*, 2020; Gagneten *et al*, 2021) (Figura 2).

Figura 2 - Mecanismo de ação da ATZ



Fonte: modificado de Gagneten *et al* (2021)

A ATZ é o pesticida detectado em maiores concentrações nas águas superficiais no Brasil (ACAYABA *et al*, 2021; ZINI & GUTTERRES, 2021) e no mundo (SOUZA *et al*, 2020). Devido a sua solubilidade (Tabela 1), a ATZ também é capaz de escoar para as camadas mais profundas do solo (LUO *et al*, 2021), além disso, sua estabilidade química, período residual mais longo e baixa biodegradabilidade, também contribuem para que a ATZ se acumule nos ecossistemas do solo e permaneça por um longo tempo nas águas superficiais e subterrâneas (JIANG *et al*, 2020).

Tabela 1 - Parâmetros Físico-Químicos da Atrazina

Solubilidade em Água (20°C)	33 mg/L
Peso molecular	215,69 g/mol
Pressão de Vapor	3,0x10 ⁻⁷ mmHg
Constante de Henry	2,69x10 ⁻⁹ atm m ³ /mol
Adsorção em solos (K _{oc})	103 mg/L
log K _{ow}	2,34
	LD50 oral ratos =1869 mg/Kg
Toxicidade	LC50 inalação> 5,8mg/L
	LC50 dérmica> 2000 mg/Kg

Fonte: Pereira (2011).

A ATZ tem impacto prejudicial no solo, água, animais aquáticos, plantas, insetos, e pode afetar répteis e anfíbios, além disso, esse herbicida é considerado carcinogênico e um potente desregulador endócrino (HE *et al*, 2019).

A ATZ tem impacto na comunidade microbiana do solo, devido a diminuição do teor da matéria orgânica, redução da espessura da camada do solo e danos ao microambiente ecológico do solo (YANG *et al*, 2021). Além disso, o uso indevido de herbicidas causa pressão seletiva sobre os microrganismos, podendo resultar em alterações nos processos microbianos (PILEGGI *et al*, 2020). Outro grupo prejudicado pela ATZ são as bactérias em simbiose com as populações de moluscos marinhos, Britt *et al* (2020) relatou que ostras expostas a ATZ tiveram uma perda significativa de uma espécie microbiana mutualista, posteriormente substituída por uma bactéria patogênica, impedindo o repovoamento desta espécie de ostra. Outra espécie que após a exposição à ATZ tem efeitos prejudiciais no tamanho da população, são os lagostins, que mostraram danos ao DNA das células das antenas, além de danos aos neurônios sensoriais olfativos, reduzindo suas habilidades quimiossensoriais (ABDULELAH *et al*, 2019).

Além disso, várias espécies que dependem do olfato e da quimiorrecepção para sobreviver, como os girinos e os lagostins, tem seu comportamento alterado após exposição à ATZ, como comportamentos hiperativos e incapacidade de evitar sinais

químicos de predadores (EHRSAM *et al*, 2016), alterações alimentares (BELANGER *et al*, 2016) e interrupção do acasalamento (BELANGER *et al*, 2017).

A exposição à ATZ gera efeitos adversos, principalmente durante o desenvolvimento, quando se está mais suscetível a substâncias tóxicas, relatado em diversos modelos animais. Em estudos com peixe-zebra, a exposição à ATZ gera alterações comportamentais em larvas em desenvolvimento (TAI *et al*, 2021). Uma pesquisa utilizando uma linhagem de células de fibroblastos de peixe-zebra demonstrou que a ATZ provoca genotoxicidade através das alterações no número de cópias do genoma (WIRBISKY & FREEMAN, 2017). Há relatos também de aumento no comprimento da cabeça observados em larvas de peixe-zebra expostas a ATZ (WEBER *et al*, 2013), alterações na cartilagem craniofacial, no desenvolvimento do coração e mineralização óssea atrasada, além de redução na taxa de eclosão (WALKER *et al*, 2018). Testes em ratos púberes mostraram um desenvolvimento alterado do sistema de dopamina nigroestriatal, essa alteração é responsável pela diminuição da neurotransmissão dopaminérgica, ocasionando tremores e rigidez muscular (LI *et al*, 2015). Esses resultados sustentam que a ATZ é tóxica para o desenvolvimento neurológico.

A exposição à ATZ também leva a alterações na liberação do hormônio luteinizante (LH), responsável pela ovulação e produção de progesterona, através da inibição do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (FORADORI *et al*, 2013), em proles masculinas de camundongos tratados com ATZ durante a gestação foi observado níveis reduzidos de testosterona (STRADTMAN & FREEMAN, 2021). Em ovos de tartarugas tratados com ATZ foi observado alterações na expressão gênica do hipotálamo, com efeitos significativos nos eixos hipotálamo-hipófise-gônada (HHG), responsável pelo desenvolvimento sexual, e eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), importante para o sistema endócrino (RUSSART & RHEN, 2016).

Em humanos, foi relatado que o consumo de água contaminada com ATZ durante a gravidez resulta em redução do peso dos bebês ao nascer (ALMBERG *et al*, 2018). Em anfíbios adultos, expostos a ATZ, foi demonstrado uma fertilidade diminuída, diminuição do tamanho da glândula reprodutiva e redução da testosterona, em alguns casos, levando a completa feminização das rãs machos analisadas (HAYES *et al*, 2010). Larvas de libélula azul foram analisadas quanto ao sistema imunológico em exposição à ATZ e foi demonstrado um efeito significativo na

contagem de hemócitos e na atividade da hemolinfa fenoloxidase, podendo resultar em dificuldade no crescimento, metamorfose e suscetibilidade a patógenos (St CLAIR & FULLER, 2018).

Devido a esses diversos fatores, em 2003 a União Europeia proibiu o uso de ATZ em razão de sua inevitável contaminação da água (SASS & COLANGELO, 2006). Entretanto, o herbicida continua sendo usado em mais de 70 países, entre eles os Estados Unidos, Brasil, Argentina e China (TAN *et al*, 2021).

A ATZ é detectada em águas superficiais e subterrâneas em todas as regiões onde ela é aplicada. Dessa forma, cada país estabelece uma concentração máxima permitida na água potável, nos Estados Unidos (EUA) é de 3,0 µg/L, enquanto na China e no Brasil é de 2,0 µg/L, porém a quantidade de ATZ detectada ultrapassa esse limite, devido ao seu uso contínuo e abrangente (HE *et al*, 2019; BRASIL, 2005). Pesquisas realizadas em fontes de água potável na região centro-oeste dos EUA, mostraram concentrações de ATZ superiores a 300 µg/L, durante períodos de chuva (WIRBISKI-HERSHBERGER *et al*, 2017), na Europa, estudos realizados em águas subterrâneas mostraram que o herbicida era um dos contaminantes mais comuns encontrados, com concentração máxima detectada de 253 ng/L (LOOS *et al*, 2010).

Dessa forma, pesquisas científicas que buscam formas de remediar os danos causados pelos agrotóxicos são de extrema importância.

2.2. BIORREMEDIAÇÃO DA ATRAZINA

A biorremediação é um processo pelo qual organismos vivos ou seus subprodutos são usados para degradar, remover ou transformar contaminantes de um ambiente através do processo biológico conhecido como biodegradação. Essa é uma solução eficaz para reduzir os impactos causados pelo uso crescente de agrotóxicos (GONÇALVES & DELABONA, 2022).

Por isso, a biorremediação vem sendo usada para o tratamento de muitos poluentes ambientais, como hidrocarbonetos (TREU & FALANDYSZ, 2017), metais pesados (CUI *et al*, 2021), desreguladores endócrinos, como hormônios, fenóis, ftalatos, produtos farmacêuticos (ROCCUZZO *et al*, 2021) e pesticidas, como o glifosato (KRYUCHKOVA *et al*, 2014), ATZ, picloram, e outros herbicidas (SANTOS *et al*, 2016; HENN *et al*, 2020). Apesar da biorremediação de pesticidas ser uma

estratégia bem estudada e compreendida, ainda não é muito aplicada (PILEGGI *et al*, 2020).

A degradação da ATZ por enzimas ligninolíticas produzidas por 13 cepas de basidiomicetos foi investigada e observou-se que as linhagens *Gloelophyllum striatum* e *Agaricales* alcançaram os maiores níveis de biodegradação, 37,3 % e 38,7 %, respectivamente (HENN *et al*, 2020). Outro estudo relatou o desempenho de *Pleurotus ostreatus* que degradou 82 % da ATZ, além disso foi capaz de degradar os metabólitos deetilatrazina (DEA) e deisopropilatrazina (DIA), potencialmente tóxicos (LOPES *et al*, 2020). Mougín *et al* (1994) demonstraram que o fungo *Phanerochaete chrysosporium* reduziu 48 % da concentração inicial do herbicida no meio de crescimento nos primeiros quatro dias de incubação.

Também foi estudado a biodegradação da ATZ por *Penicillium chrysogenum*, através de experimentos em laboratório e em microcosmos com solo. O fungo demonstrou um potencial de degradação acima de 40 %, tanto a forma livre como a imobilizada, quando a concentração foi de 25 mg/L de ATZ. Foi observado que a quantidade de nitrogênio interferiu na eficiência de degradação, que desviou a rota metabólica para favorecer a esporulação. Também foi eficiente na remediação em microcosmos com solo, com eficiência superior a 80 %. Contudo nesse estudo, *P. chrysogenum* inibiu o desenvolvimento de outros microrganismos, ou seja, poderia resultar em distúrbios ecológicos (NICODEMO, 2021).

Marinho *et al* (2017) verificaram a capacidade do fungo *Aspergillus niger* em metabolizar a ATZ em concentrações de até 30 mg/L em biorreatores durante oito dias, no fim desse período houve redução de 60 % do herbicida. Quando a mistura foi suplementada com 3 g/L de glicose a biodegradação subiu para 72 %. *Metarhizium robertsii* foi usado para a caracterização do curso de biodegradação da ATZ, os resultados sugeriram que a alta tolerância do fungo está ligada à sua capacidade de degradação e à alteração no perfil do metaboloma e do lipidoma (SZEWCZYK *et al*, 2020).

O fungo de podridão branca, *Anthracoephyllum discolor*, também tem uma capacidade conhecida de degradar o herbicida ATZ, dessa forma, estudos realizados por Elgueta *et al* (2016) tiveram como objetivo aumentar a eficácia da degradação, utilizando suporte peletizado para imobilizar o fungo. Diferentes proporções de serragem, amido, fubá e linhaça foram utilizadas para gerar três suportes peletizados.

A formulação com alto teor de linhaça teve uma proliferação significativamente maior de micélios fúngicos e foi possível observar que o fungo *A. discolor* imobilizado teve sua capacidade de degradação da ATZ aumentada.

Muitos estudos mostram o potencial fúngico para a biorremediação da ATZ, porém a ausência de conhecimento da rota metabólica gera uma lacuna quanto a toxicidade dos compostos gerados ao longo do processo de biodegradação. Muitas vezes a biodegradação fúngica gera resíduos que podem ser mais tóxicos que a própria ATZ (MATIAS *et al*, 2021).

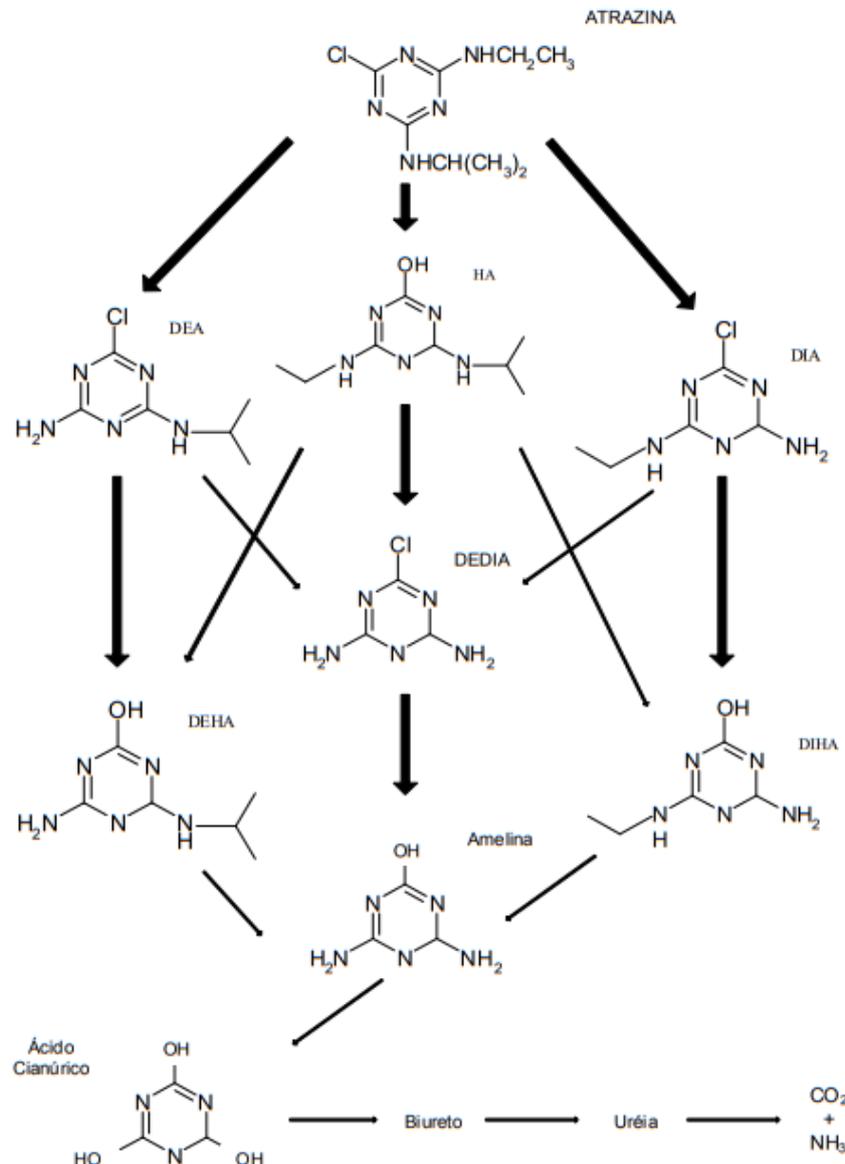
A degradação fúngica da ATZ é realizada por rotas metabólicas diversas, que são baseados em mecanismos hidrolítico-oxidativos. Várias espécies de fungos são capazes de degradar a ATZ removendo sequencialmente os substituintes do anel aromático, onde a desalquilação é o primeiro passo. Nesse processo os fungos produzem os metabólitos desetilatrazina (DEA), deisopropilatrazina (DIA), hidroxiatrazina (HA) e deetildeisopropilatrazina (DEDIA) que ainda mantêm o anel aromático (HENN *et al*, 2020; MOUGIN *et al*, 1994). Outro estudo onde também foi observado a formação desses quatro metabólitos foi realizado utilizando *Cryptococcus laurentii* que obteve 100% de degradação da ATZ em nove dias. Por meio de análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) detectaram a formação dos quatro metabólitos, HA, DEA, DIA e DEDIA durante o processo de degradação da ATZ (ABIGAIL *et al*, 2012).

Kruger *et al* (1993) sugeriram uma rota metabólica de degradação da ATZ no solo (Figura 3) sob condições saturadas e insaturadas. Foi observado os metabólitos DIA, DEA, HA, DEDIA, e também duas hidroxitriazinas desalquiladas, deetilhidroxiatrazina (DEHA) e deisopropilhidroxiatrazina (DIHA). Em amostras de solo saturadas, o metabólito DIA mostrou ser menos persistente com meia-vida igual a 58 dias.

Solomon *et al* (1996) testaram a toxicidade da ATZ e seus produtos de transformação (DEA, DIA, HA e diaminoclorotriazina (DAC)). Os autores perceberam, com estudos em plantas aquáticas, que a ATZ foi mais inibidora da fotossíntese do que seus metabólitos, sendo sete a 10 vezes mais inibitória para algas azuis e quatro a seis vezes mais inibitória para algas verdes do que o DEA, produto de transformação mais potente. Além disso, a ATZ foi 20 a 50 vezes mais inibitória para algas azuis e

sete a 13 vezes mais inibitória para algas verdes do que DIA. DAC e HA foram relativamente não tóxicos para plantas aquáticas.

Figura 3 - Rota de degradação da atrazina no solo

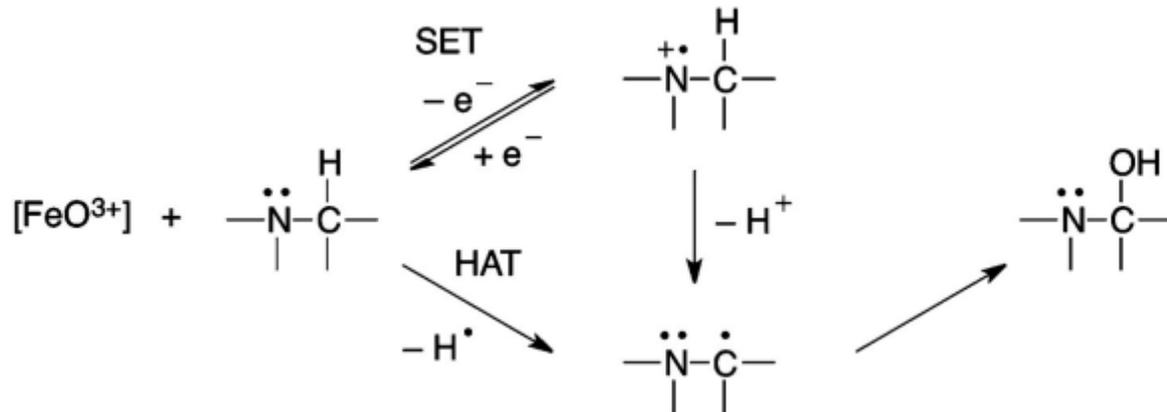


Fonte: Kruger *et al* (1993)

Os fungos podem usar dois mecanismos de ação para degradar a ATZ: biodegradação intracelular e enzimas extracelulares. A biodegradação intracelular é realizada pelo complexo enzimático do citocromo P450 (Figura 4). Nesse processo a N-desalquilação se inicia pela transferência de um elétron do átomo de nitrogênio para um centro FeO^{3+} do citocromo P450, liberando um cátion de nitrogênio e, em seguida, liberação de um hidrogênio. A N-desalquilação também pode se iniciar através da

clivagem da ligação C-H do heteroátomo. Nos dois casos, ocorre a geração de 1,1-aminoálcool, que pode ser eliminado na forma de aldeído ou cetona (NICODEMO, 2021).

Figura 4 - Biodegradação intracelular catalisada pelo citocromo P450. (SET) por transferência de elétron; (HAT) pela abstração do átomo de hidrogênio.



Fonte: Meyer *et al* (2014)

Enquanto, a degradação por enzimas extracelulares é realizada, principalmente pela lacase (Lac), manganês-peroxidase (MnP) e lignina-peroxidase (LiP). As lacases são oxidases que possuem quatro átomos de cobre (Cu) em seu sítio ativo, a oxidação se inicia pela redução de Cu^{2+} em Cu^+ . No fim, ocorre a redução de O_2 em H_2O . Na primeira etapa do ciclo da LiP, ocorre a oxidação do ferro (Fe) pela ação do H_2O_2 , que leva a enzima a um estado de oxidação deficiente em dois elétrons, chamado Composto I, em seguida, redução deste composto para formar o Composto II, e por fim, redução para a forma nativa, sendo o álcool veratrílico o doador de elétrons. O ciclo catalítico do MnP é semelhante ao da LiP, com a diferença de que o doador de elétron é um Mn^{2+} (FARIA, 2010).

Além da degradação intracelular e extracelular, os fungos podem realizar a biorremediação através da bioissorção, que é definida como a propriedade de certas biomoléculas ou biomassas de se ligar e concentrar os poluentes de soluções aquosas. Nos fungos a bioissorção ocorre na parede celular de leveduras ou micélios (ESCUADERO *et al*, 2019). A bioissorção consiste na adsorção de metais pesados, os fertilizantes e agrotóxicos contém metais pesados na sua composição, sendo esses compostos adsorvidos pelos micélios dos fungos (GONÇALVES JR *et al*, 2000).

2.3. FITOTOXICIDADE

Toxicidade é a capacidade de uma substância em causar danos aos seres vivos ou ao ambiente (DUX & STALZER, 1988). Os testes de toxicidade buscam compreender os efeitos das substâncias químicas nos organismos e no meio ambiente e descobrir se essas substâncias são potencialmente tóxicas. Esses testes procuram determinar se essas substâncias podem afetar os aspectos fisiológicos e moleculares do organismo exposto (PEDUTO *et al*, 2019).

Os testes de fitotoxicidade utilizam plantas para definir se um agente é tóxico ou não, são vantajosos por serem sensíveis a diversos compostos químicos, como os herbicidas. Além disso, as plantas são fáceis de armazenar e manipular, possuem baixo custo, fácil acesso às sementes e podem ser usadas para estudo de danos cromossômicos ou distúrbios da divisão celular, e ainda, o estudo com plantas permite considerações estatísticas a partir das curvas de crescimento, uma vez que é possível usar uma série de sementes para cada concentração do produto químico testado (FISKESJÖ, 1985). Também, possuem metodologias simples que podem ser reproduzidas e repetidas facilmente, além da rápida germinação das sementes (WANG *et al*, 2001).

O teste de fitotoxicidade com base no índice de germinação de sementes, combina medidas de germinação de sementes e alongamento de raízes que são sensíveis à componentes tóxicos presentes no meio de cultivo das plantas (DEVESAREY *et al*, 2008). Os processos fisiológicos das plantas podem ser comprometidos pela presença de toxinas, dessa forma, o princípio dos ensaios de fitotoxicidade é analisar o crescimento da radícula e do hipocótilo (figura 5), indicando a capacidade da planta em se desenvolver naquele meio (ROCHA, 2017).

Figura 5 - Morfologia da semente



Fonte: Toyama *et al* (2017)

As plantas usadas para os testes de fitotoxicidade são bem variadas dependendo da metodologia e finalidade desejados. Os estudos podem ser realizados utilizando rúcula (*Eruca sativa*) e alface (*Lactuca sativa*) para análises com glifosato (FANTIN *et al*, 2009), agrião (*Lepidium sativum*) e azevém (*Lolium multiflorum*) para testes com ácidos carboxílicos (HIMANEN *et al*, 2012), testes com *Armeria maritima* (cravo-do-mar), *Anthemis maritima* e *Plantago coronopus* que podem se desenvolver em áreas costeiras com sedimentos dragados em portos marítimos, são capazes de evitar o efeito relacionado ao sal e serem sensíveis somente aos compostos tóxicos, por serem plantas halófitas (BEDELL *et al*, 2014), salgueiro-branco (*Salix alba*) para avaliar os efeitos de altos níveis de nutrientes na água (KUNDRÁT *et al*, 2017), mostarda-branca (*Sinapis alba*) para avaliar a fitotoxicidade das águas superficiais (KOHATSU *et al*, 2018), pepino (*Cucumis sativus*) para análise da toxicidade de nanopartículas de cobre e de prata, sulfato de alumínio, metil metano sulfonato e poluentes orgânicos (MOSA *et al*, 2018; BARBOSA *et al*, 2013; URBANIAK *et al*, 2020; FALANGA *et al*, 2020).

2.3.1. *Cucumis sativus*

Os testes com *Cucumis sativus*, popularmente conhecido como pepino, buscam determinar a inibição da germinação e o crescimento das radículas das sementes, além disso, é possível realizar análise de bioacumulação. *C. sativus* é um ótimo modelo para uso em teste de fitotoxicidade, com base em sua taxa média de germinação de aproximadamente 80 % e um comprimento médio de raiz superior a 20 mm obtido após 48 h de incubação, de acordo com testes controle realizados por Wang *et al* (2001).

Um trabalho realizado utilizando dois contaminantes, Sulfato de Alumínio (Al_2SO_4) e solução de Metil Metano Sulfonato (MMS), demonstrou que a taxa de germinação do *C. sativus* não apresentou diferença entre o controle e os tratamentos, somente após 96 horas houve redução no crescimento radicular nos dois tratamentos em relação ao controle. Dessa forma, o aumento no tempo de exposição aos agentes tóxicos foi importante para garantir melhores resultados (BARBOSA *et al*, 2013).

Outro trabalho utilizando *C. sativus*, investigou a fitotoxicidade de nanopartículas de cobre em um sistema hidropônico. Os resultados demonstraram que após quatro dias de tratamento, *C. sativus* acumulou cobre nos tecidos vegetais

com quantidades dependentes da concentração, além disso houve alterações genômicas, mudanças fenotípicas adversas, modificações fisiológicas e bioquímicas, diminuição da biomassa, vazamento de eletrólitos e diminuição dos níveis dos pigmentos fotossintéticos, demonstrando a capacidade de bioacumulação nano-metálica de *C. sativus* (MOSA *et al*, 2018).

Foi avaliado a toxicidade de nanopartículas de prata (AgNP) não revestidas e revestidos com o peptídeo antimicrobiano indolicidina, utilizando modelos animais, algas e sementes de *Lepidium sativum*, *C. sativus* e *Lactuca sativa*. Dentre as sementes, após 72 h, apenas *L. sativa* mostrou inibição do crescimento e bioacumulação de AgNP. Foi teorizado que as taxas de germinação significativamente mais rápidas e maior produção de biomassa das plantas foi devido à absorção de água. Além disso, as AgNPs apresentam toxicidade mais severa para os organismos aquáticos (FALANGA *et al*, 2020).

Kim *et al* (2013) também relataram a bioacumulação de partículas de óxido de cobre (CuO) e óxido de zinco (ZnO) em *C. sativus* e *Zea mays*, e perceberam que o acúmulo de CuO e ZnO por *C. sativus* foi visivelmente maior, sugerindo que os padrões de acumulação de nanopartículas dependem da espécie vegetal. Outro estudo com diversas espécies vegetais, incluindo alface (*Lactuca sativa*), rabanete (*Raphanus sativus*), cebola (*Allium cepa*), pepino (*Cucumis sativus*) e trigo (*Triticum aestivum*), para analisar a fitotoxicidade do 4,8-dihidroxi-1-tetralona (4,8 - DHT) e seus enantiômeros, também indicaram toxicidade diferente para germinação de sementes e crescimento de plântulas dependendo do organismo analisado, onde o alface foi mais sensível aos tratamentos com um dos enantiômeros (YANG *et al*, 2016).

Servin *et al* (2012) utilizando *C. sativus* para tratamentos com dióxido de titânio (TiO₂), demonstraram que mudas com sete dias de idade tiveram um aumento significativo do comprimento da raiz e ocorreu o transporte do titânio das raízes para as folhas, indicando que as folhas são um possível sistema excretor para o titânio, além disso as partículas de TiO₂ não foram biotransformadas pelas plantas, pois permaneceram como TiO₂ nos tecidos.

Pesquisas realizadas por Urbaniak *et al* (2020) com o objetivo de avaliar a fitotoxicidade e respostas biométricas e fisiológicas do *C. sativus* e *Cucurbita pepo* à aplicação de sedimentos do Rio Hudson contaminados com bifenilos policlorados (PCB) para análise dos potenciais fito e rizorremediadores, mostraram, após quatro

semanas, que os efeitos fitotóxicos foram maiores em solos plantados com *C. pepo*, e o efeito estimulador permaneceu alto para os tratamentos com *C. sativus*. Porém, a área foliar de *C. pepo* apresentou aumento para os tratamentos com 50 % e 75 % de sedimento, enquanto *C. sativus* teve diminuição da área foliar em 75 % e 100 % de sedimento. Clorofila a e b tiveram maior inibição em *C. sativus*.

C. sativus também é usado como modelo vegetal para testes de toxicidade com agrotóxicos. Estudos realizados para analisar a fitotoxicidade de pesticidas piretróides (cipermetrina, deltametrina e cialotrina) e seu metabólito (ácido fenoxibenzóico), obtiveram impacto negativo na porcentagem da germinação somente quando a semente foi exposta ao metabólito. A cipermetrina apresentou impacto no comprimento da raiz e das partes aéreas da planta, enquanto a deltametrina afetou apenas o comprimento da raiz. Quando exposta a cialotrina e ao metabólito não foram observadas diferenças significativas no desenvolvimento da semente (BRAGANÇA *et al*, 2018). A atividade fitotóxica dos herbicidas benzoxazóis, utilizando *C. sativus*, *Allium cepa*, *Solanum lycopersicum* e *Sorghum bicolor* também foi avaliada e observou-se que todos os compostos herbicidas sintetizados apresentaram inibição da germinação das sementes nas quatro espécies vegetais testadas (SANGI *et al*, 2019).

Estes resultados demonstram que *C. sativus* é uma planta sensível aos poluentes e pode ser usada como espécie modelo em análises de fitotoxicidade de forma eficaz.

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a fitotoxicidade do processo de biodegradação da atrazina por fungos de solo usando *Cucumis sativus* como modelo vegetal.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar os fungos em meio de cultivo com e sem a presença de atrazina;
- Avaliar a biomassa fúngica após o cultivo com atrazina;
- Avaliar a toxicidade da atrazina nos cultivos fúngicos;
- Calcular a taxa de inibição do crescimento (% toxicidade);
- Identificar o potencial para biorremediação do solo agrícola dos fungos avaliados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MICRORGANISMOS

Esse trabalho faz parte do projeto intitulado “Desenvolvimento de Inoculante para Biorremediação de Solos Agrícolas baseado na Associação de Fungos e Carvão Ativado” coordenado pela Profa. Rafaella Costa Bonugli Santos. No trabalho de conclusão do curso de Biotecnologia da discente Giuliana Rahmeier Bonassa, intitulado “Seleção de Fungos para o Desenvolvimento de Bioinoculante para Biorremediação de Solos Agrícolas Impactos com Atrazina” foram selecionamos três fungos pertencentes à Coleção de Cultura de Micro-organismos de Importância Biotecnológica e Ambiental – CCMIBA, situada no laboratório de Bioquímica e Microbiologia da UNILA: *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018, *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014, e *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111. Esses fungos foram selecionados devido a produção de enzimas ligninolíticas, potencial de controle biológico de fitopatógenos e capacidade de degradação da ATZ. Para o presente estudo os fungos foram reativados em placa de Petri em meio malte 2% (MA2) por sete dias a 28°C.

4.2. CRESCIMENTO FÚNGICO EM MEIO LÍQUIDO

Os fungos previamente cultivados em meio sólido foram transferidos para o meio MA2 (2 % de extrato de malte) líquido contendo 10 mg/L de ATZ comercial (solução estoque de 1 g/L), conforme Bonassa (2021). Foram utilizados três discos de 5 mm do meio sólido dos fungos previamente cultivados para a inoculação dos ensaios. Os ensaios foram realizados com três réplicas e os fungos foram cultivados também sem a adição de atrazina como controle. Além dos ensaios com fungos, também foi realizado um ensaio de controle negativo. Neste, não foi inoculado nenhum fungo, contendo apenas o meio de cultivo com atrazina. Todos os erlenmeyers foram colocados para cultivo em shaker, a 150 rpm e 28 °C, por um período de 10 dias.

4.3. DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA

Após o período de incubação, os ensaios foram transferidos para tubos tipo falcons de 50 ml e centrifugados a 6.000 rpm por 15 min para separar a biomassa

fúngica do sobrenadante. A biomassa total de cada erlenmeyer foi transferida para uma placa de petri com papel filtro e colocada na estufa para secar a 90°C, por três dias, após esse período a biomassa foi pesada, para obtenção do peso seco com e sem ATZ (BONASSA, 2021).

4.4. ANÁLISE DE FITOTOXICIDADE COM *Cucumis sativus*

As sementes foram pré-tratadas com solução de hipoclorito de sódio 0,1% por 20 minutos, em seguida embebidas em água deionizada por 10 min e lavadas com água deionizada por três vezes antes do uso, conforme Wang *et al* (2001).

Em seguida, os ensaios de toxicidade foram realizados utilizando as sementes de pepinos cultivadas em placas de petri, com base nos estudos de Farias (2022), onde em cada placa foi colocado papel filtro, 15 sementes e 5 ml de cada tratamento do fungo. Para evitar fragmento fúngico ou esporos, o sobrenadante de cada fungo foi filtrado, utilizando uma seringa com um filtro do tipo millipore 0,22 µm, antes de ser colocado nas placas de petri com as sementes. Três réplicas foram definidas para cada fungo cultivados com e sem ATZ e três réplicas para o controle negativo do tratamento fúngico (apenas meio de cultivo e ATZ). Logo após, as placas foram envolvidas com filme plástico para evitar evaporação, e mantidas em temperatura ambiente, no escuro, durante nove dias. Para o controle negativo foi usado uma solução de sulfato de zinco (ZnSO₄) (0,05 M) e para o controle positivo, água destilada. Após, as radículas e os hipocótilos foram medidos, por fim, foi calculado a porcentagem de inibição de acordo com a equação 1.

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(\text{média do controle positivo} - \text{média do bioensaio})}{(\text{média do controle positivo})} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

4.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O software PAST 4.03 e o Microsoft Excel foram usados para todas as análises estatísticas. As diferenças entre as médias foram analisadas por ANOVA unidirecional, seguida do teste de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

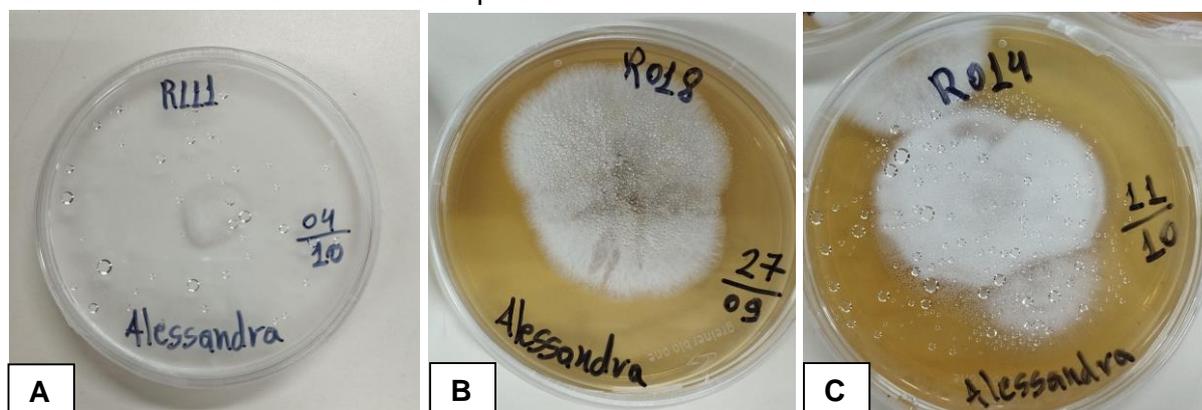
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. MICRORGANISMOS

Os três fungos avaliados foram selecionados após demonstrarem capacidade de eliminação da ATZ no trabalho de Bonassa (2021), onde houve eliminação de 46 %, 63 % e 68 % de ATZ nos cultivos dos fungos *P. lilacinum* CCMIBA_R014, *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 e *C. rosea* CCMIBA_R018, respectivamente. Porém, no trabalho de Bonassa (2021) o indicador de fitotoxicidade *A. cepa* (cebola), mostrou-se não tóxico para ATZ, indicando a necessidade de análise da toxicidade do processo de degradação com outros modelos biológicos.

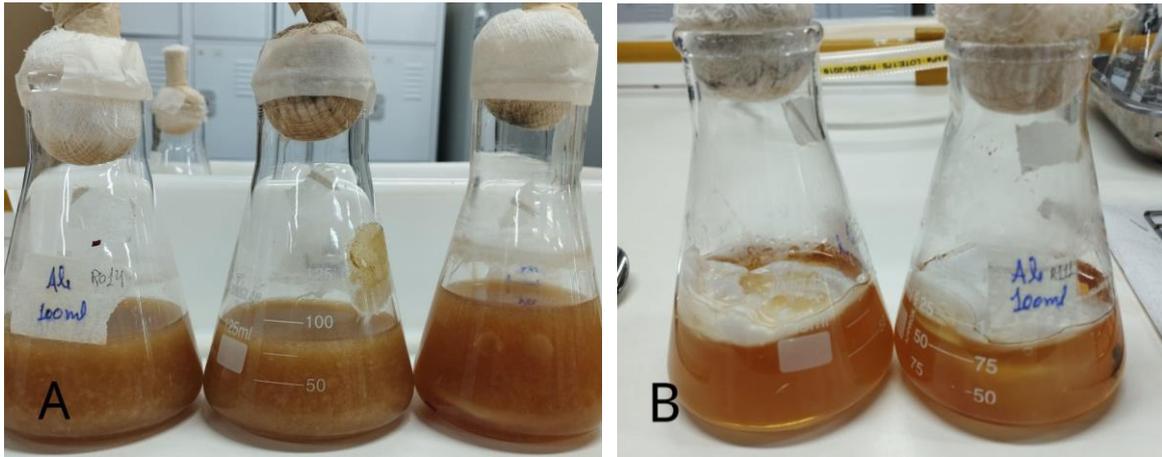
Inicialmente os fungos foram reativados da coleção para realização dos ensaios, o aspecto dos fungos após o cultivo em meio sólido por sete dias, a 28°C (Figura 6) demonstrou que o fungo *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 cresceu melhor nesse período, se comparado com os outros dois fungos, porém nada que indicasse mudanças fisiológicas das linhagens preservadas, impedindo as análises. Quanto à aparência dos fungos cultivados em meio líquido (Figura 7), não foi possível distinguir visualmente nenhuma diferença, sendo essa avaliada pela quantificação da biomassa.

Figura 6 - Aspecto morfológico dos fungos (A) *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111, (B) *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018 e (C) *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014 em meio de cultivo com extrato de malte e ágar após 7 dias. Todos os fungos apresentaram coloração branca, sendo que o fungo R111 cresceu sobre toda a placa, enquanto os fungos R018 e R014 cresceram mais no centro da placa.



Fonte: Autoria própria (2022).

Figura 7 - Aspecto morfológico dos cultivos dos fungos (A) *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014 e (B) *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 em meio líquido após dez dias.



Fonte: Autoria própria (2022)

Os fungos do gênero *Bjerkandera* sp. fazem parte do grupo dos fungos da podridão branca, com distribuição em todo o mundo, crescendo principalmente em troncos mortos de angiospermas (WANG *et al*, 2021) (Figura 8). Esse gênero pertence à divisão Basidiomycota, subdivisão Agaricomycotina, classe Agaricomycetes, ordem Polyporales, família Meruliaceae. Atualmente esse gênero possui apenas duas espécies: *Bjerkandera adusta* e *Bjerkandera fumosa* (JUNG *et al*, 2014). São caracterizados pelos basidiomas acinzentados e hifas monomíticas, possuindo apenas hifas generativas. Apresentam um importante papel ecológico, pois são fungos decompositores, sendo extremamente eficazes na degradação da lignina e de poluentes ambientais. Devido a esses fatores, o interesse para aplicação desses fungos na biorremediação vem crescendo (RECH, 2017; WESTPHALEN *et al*, 2015).

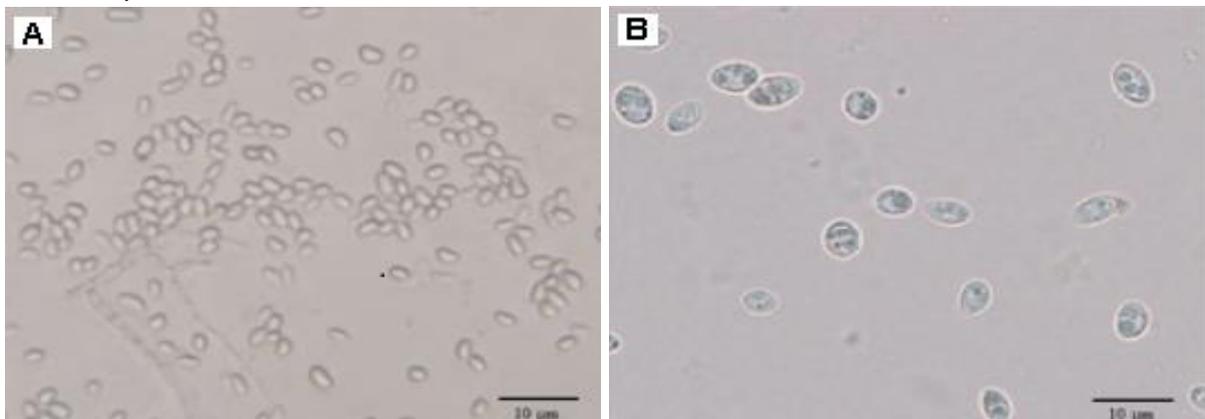
Figura 8 - *Bjerkandera* sp.



Fonte: Rech (2017)

Clonostachys rosea, anteriormente inserido no gênero *Gliocladium*, que através de dados de morfologia, ecologia e sequência de DNA, foi reclassificado e inserido no gênero *Clonostachys*, é um fungo amplamente distribuído, comum em regiões tropicais, temperadas, subárticas e desérticas, encontrado com maior frequência no solo, mas também pode estar associado a tecidos de diferentes tipos de plantas (SUN *et al*, 2020). Esse fungo apresenta dois tipos de esporos, conídios e clamidósporos (Figura 9), os conídios têm formato assimétrico, são curvados e podem apresentar massa de conídios de coloração branca, laranja-clara ou verde. Os clamidósporos possuem paredes celulares espessas e são geralmente produzidos em ambientes hostis, pois são mais resistentes. Esses esporos foram associados ao biocontrole de muitos patógenos fúngicos de plantas, desempenhando um papel importante na atividade de controle biológico (SUN *et al*, 2019; MOREIRA, 2012)

Figura 9 - Microestruturas dos esporos produzidos por *C. rosea*. (A) Conídios; (B) Clamidósporos.

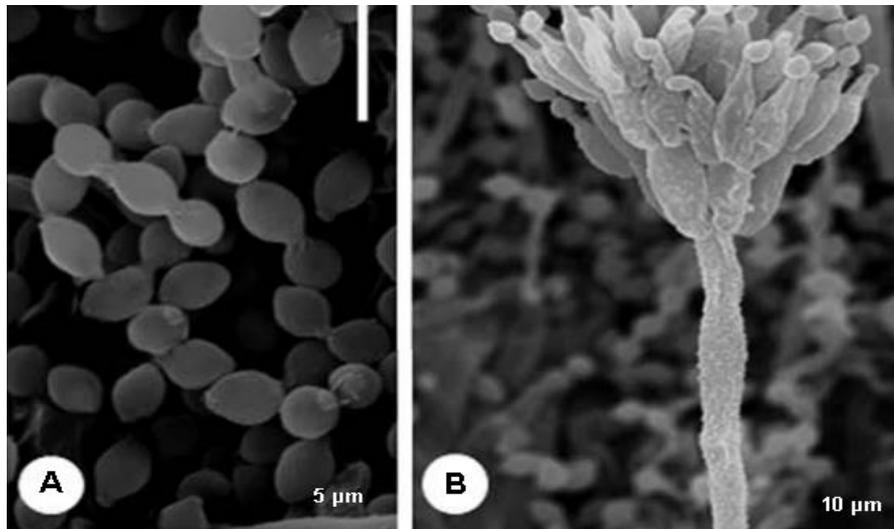


Fonte: Sun *et al* (2019)

Purpureocillium lilacinum é um fungo filamentoso, amplamente distribuído, comumente encontrado em solo agrícolas, vegetação em decomposição, em nematoides e insetos, pode causar infecção no homem e em outros vertebrados. Está inserido na divisão Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales e família Ophiocordycipitaceae (LUANGSA-ARD *et al*, 2011). *P. lilacinum* possui conidióforos de 4 a 6 µm de comprimento, com fiálides que possuem uma porção basal dilatada e em cujas extremidades se formam longas cadeias de conídios elípticos ou fusiformes, de parede lisa ou rugosa medindo de 2-3 por 2-4 µm (Figura 10). Os clamidósporos estão ausentes (LUANGSA-ARD *et al*, 2011). Em cultura, forma colônias circulares com uma camada basal sobre a qual se forma um micélio

aveludado ou flocoso. As colônias, inicialmente, apresentam coloração esbranquiçada e, em consequência da esporulação, adquirem uma coloração rosada à violeta na porção superior (PERDOMO *et al*, 2013).

Figura 10 - Microestrutura de *P. lilacinum* (A) conídios; (B) conidióforos

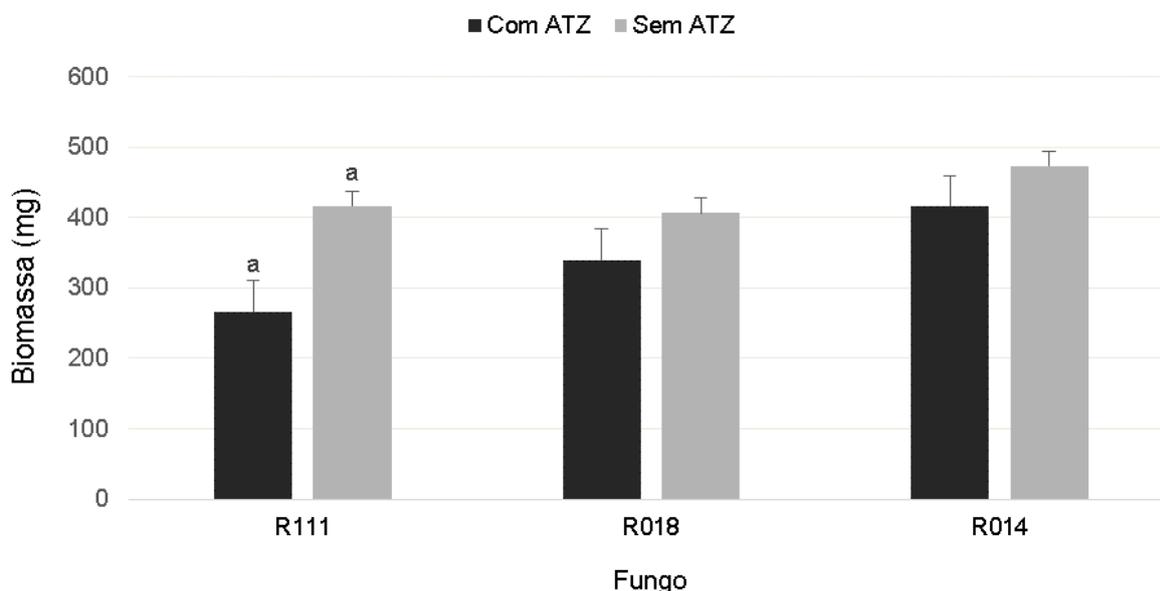


Fonte: Perdomo *et al* (2013)

5.2. BIOMASSA

Para verificar o impacto do crescimento dos fungos na presença ATZ, a produção de biomassa fúngica foi comparada na presença e na ausência de ATZ (Figura 11). Para os fungos *C. rosea* CCMIBA_R018 e *P. lilacinum* CCMIBA_R014, apesar da produção de biomassa ser menor na presença de ATZ, não houve diferença significativa em relação à biomassa produzida no controle (sem ATZ (anexo I)). No entanto, houve diferença estatística na taxa de crescimento para o fungo *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111, que cresceu menos na presença de ATZ, demonstrando que ela causa efeito negativo no crescimento do fungo, o valor de p significativo (0,01158) confirma a diferença entre os ensaios.

Figura 11 - Peso seco da biomassa fúngica produzida após incubação por 10 dias a 28°C e 150 rpm dos fungos *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111, *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018 e *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014. Médias seguidas da mesma letra apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,05$).



Fonte: Autoria própria (2022)

Os fungos do gênero *Bjerkandera* sp. são eficazes na remoção de poluentes perigosos e recalcitrantes, pois possuem a capacidade de secretar enzimas extracelulares, como lignina peroxidases (LiP), manganês peroxidases (MnP) e lacases (BARDI *et al*, 2017). Estudos relatam a eficácia desses fungos e de suas enzimas ligninolíticas na degradação de uma ampla gama de xenobióticos, incluindo hidrocarbonetos, fenóis, corantes, produtos farmacêuticos, efluentes têxteis, resíduos de fábricas de celulose e papel, pesticidas e inseticidas (ELLOUZE & SAYADI, 2016).

Estudos realizados por Bonassa (2021) utilizando o fungo *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 demonstraram médias similares entre o controle (291 mg) e o cultivo com ATZ (259 mg), confirmando o potencial desse gênero para a degradação da ATZ. Possivelmente, no presente trabalho o efeito da ATZ pode estar relacionado com alguma alteração fisiológica do cultivo fúngico, que deverá ser estudada em mais detalhe. Além disso, Dhiman *et al* (2020) relataram a eficiência do fungo *Bjerkandera adusta* na remoção da ATZ de até 92 %, em culturas líquidas em batelada, com diferentes parâmetros de pH, temperatura e concentração.

Além da ATZ, *Bjerkandera adusta* é eficiente na degradação de outros herbicidas, como clortoluron, isoproturon e diuron. Khadrani *et al* (1999) reportaram que esse fungo foi capaz de degradar 98 % de clorotoluron, 92 % de diuron e 88 %

de isotreturon em duas semanas, cultivados em meio com glicose a 24°C. *Bjerkandera* sp. também apresenta capacidade de biorremediar solos poluídos por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) (KOTTERMAN *et al*, 1998).

Esses estudos revelam que a capacidade de degradação da ATZ ou de outros compostos tóxicos pelos fungos do gênero *Bjerkandera* varia de acordo com as condições utilizadas nos experimentos, como temperatura, pH, meio de cultivo, concentração dos contaminantes e período de incubação. Estudos realizados por Rech e colaboradores (2020) relataram que a maior massa micelial produzida pelo fungo *Bjerkandera adusta* foi obtida a 24 °C, nos meios batata dextrose e extrato de malte, após incubação por 28 e 35 dias. Nosso resultado indica que apesar do potencial, a ATZ, impactou no crescimento, podendo ter interferido no processo de biodegradação. Nesse caso, avaliações futuras da concentração de ATZ no final do cultivo, bem como, avaliações de novas condições de cultivo são necessárias.

O fungo *C. rosea* CCMIBA_R018 apresentou uma média de crescimento semelhante entre o cultivo com ATZ e o controle, sem diferença estatística entre os ensaios, porém houve uma redução no crescimento com ATZ, que pode ser explicado pela variação entre as réplicas, pois *C. rosea* produz duas formas diferentes de esporos durante seu ciclo de vida: conídios e clamidósporos, que possuem tamanhos diferentes, e conseqüentemente, produzem biomassa com pesos diferentes, dificultando a análise através do peso seco (SUN *et al*, 2020).

C. rosea CCMIBA_R018 foi selecionado devido a sua característica no controle biológico de micoparasitas, atuando contra patógenos fúngicos de plantas, nematóides e insetos. *C. rosea* age contra os patógenos através da ativação de diversos mecanismos de controle biológico, como secreção de enzimas que degradam a parede celular, produção de metabólitos secundários e indução de resistência de plantas. As enzimas secretadas são principalmente quitinase, glucanase e proteases, que quebram as ligações glicosídicas e as ligações peptídicas, rompendo a parede celular dos micopatógenos. Já os metabólitos secundários produzidos, como antibióticos e toxinas, são responsáveis por influenciar o crescimento e o desenvolvimento de outros organismos. Enquanto a resistência das plantas é induzida por enzimas de defesa ou genes relacionados à defesa nas plantas (FATEMA *et al*. 2018; SUN *et al*, 2020).

Além disso, *C. rosea* também atua na biotransformação (FU *et al*, 2019), tem potencial para ser usado na produção de combustível, pois foi detectado a presença de hidrocarbonetos voláteis incluindo benzeno, heptano e octano nesse fungo (STROBEL *et al*, 2008), e é capaz de degradar resíduos plásticos. No trabalho de Urbanek *et al* (2017) relataram que *C. rosea* degradou 100% de filmes de amido e 52,91% de degradação de filmes de PCL, em 30 dias.

Assim como *C. rosea* CCMIBA_R018, o fungo *P. lilacinum* CCMIBA_R014, não apresentou diferença estatística entre os ensaios, indicando que o fungo cresce na presença de ATZ tanto quanto na ausência dela. Resultado diferente do reportado por Bonassa (2021), que indicou sensibilidade ao herbicida. Essa variação, como no caso do fungo *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111, deve-se provavelmente a sensibilidade de fisiologia devido a pequenas variações no meio de cultivo, fotoperíodo e condições de incubação.

P. lilacinum tem atraído grande interesse para aplicação no biocontrole, pois é uma espécie entomopatogênica, atuando no controle biológico de nematoides. É classificado como parasita oportunista de ovos, cistos e nematoides adultos, produz enzimas extracelulares que degradam proteínas e quitinas presentes nos ovos e no corpo desses nematoides (KHAN *et al*, 2004).

Spinelli *et al* (2021) reportaram que *P. lilacinum* é um grande candidato para a remediação do herbicida glifosato, pois foi capaz de degradar 80 % da concentração inicial de glifosato e utilizá-lo como fonte de fósforo (P). Além disso, *P. lilacinum* já foi relatado como tolerante a vários outros herbicidas com ingredientes ativos, como pendimetalina, petoxamida, clomazone, clortoluron e imazamox (ONDRÁČKOVÁ *et al*, 2019). Também possui a capacidade de bioissorção e remediação de metais pesados como cádmio (Cd), cromo (Cr) e chumbo (Pb) (XIA *et al*, 2015; SHARMA & ADHOLEYA, 2011; ZUCCONI *et al*, 2003).

P. lilacinum CCMIBA_R014 e *C. rosea* CCMIBA_R018 cresceram bem na presença de ATZ, ou seja, foram capazes de quebrar a molécula deste herbicida, porém, isso não garante a degradação completa do composto e nem a diminuição da sua toxicidade.

5.3. FITOTOXICIDADE

Inicialmente, o sobrenadante de cada tratamento foi colocado sem filtrar, no entanto, houve muito crescimento fúngico nas placas que inibiram o crescimento das sementes (Figura 12), dessa forma, optou-se pela filtragem do sobrenadante antes da sua adição aos ensaios.

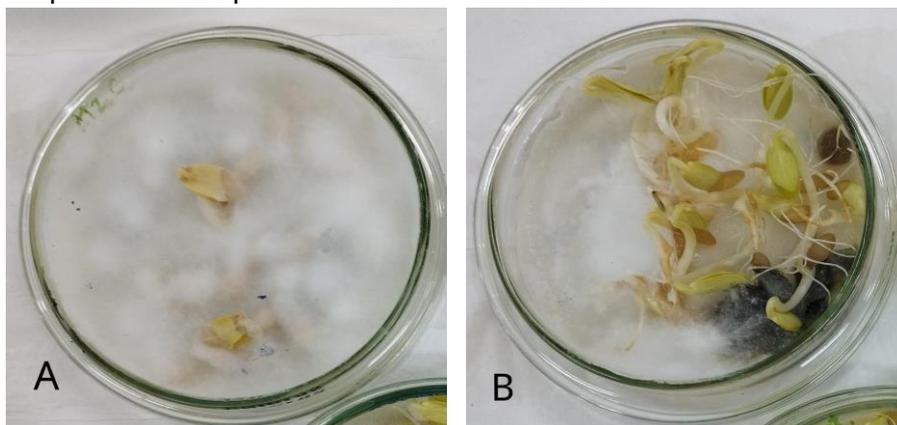
Figura 12 - Crescimento fúngico nos ensaios com *C. sativus*. Os pontos brancos sobre o papel filtro são micélios fúngicos.



Fonte: Autoria própria (2022)

Após a filtragem, os ensaios com *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 ainda apresentaram crescimento fúngico em algumas placas, o que pode ter contribuído com a menor germinação das sementes. Além disso, houve contaminação do ar, pois microrganismos cresceram no controle do tratamento, onde havia apenas ATZ e meio (Figura 13).

Figura 13 - Crescimento fúngico nos ensaios com *C. sativus*. (A) placa onde foi usado o sobrenadante que continha fungo cultivado em meio com ATZ. (B) placa onde foi usado o sobrenadante que continha apenas ATZ e meio.



Fonte: Autoria própria (2022)

Algo que poderia ter sido feito para impedir o crescimento fúngico nas placas seria fazer o uso de antifúngico, mas para isso seria necessário fazer um teste para verificar se ele inibiria ou não o crescimento e a germinação das sementes. Uma outra possibilidade é avaliar a incubação das sementes em temperaturas mais baixas, que minimizaria o crescimento fúngico.

Para o fungo *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014 não houve crescimento fúngico em nenhuma das placas de petri, porém no controle negativo do tratamento ocorreu o aparecimento de manchas avermelhadas nas três réplicas (Figura 14) acredita-se que isso tenha ocorrido pois a ATZ degradou ou reagiu com algum composto do metabolismo secundário da planta.

Figura 14 - Controle negativo do tratamento nos ensaios com *C. sativus* mostrando a presença de um composto colorido após germinação.



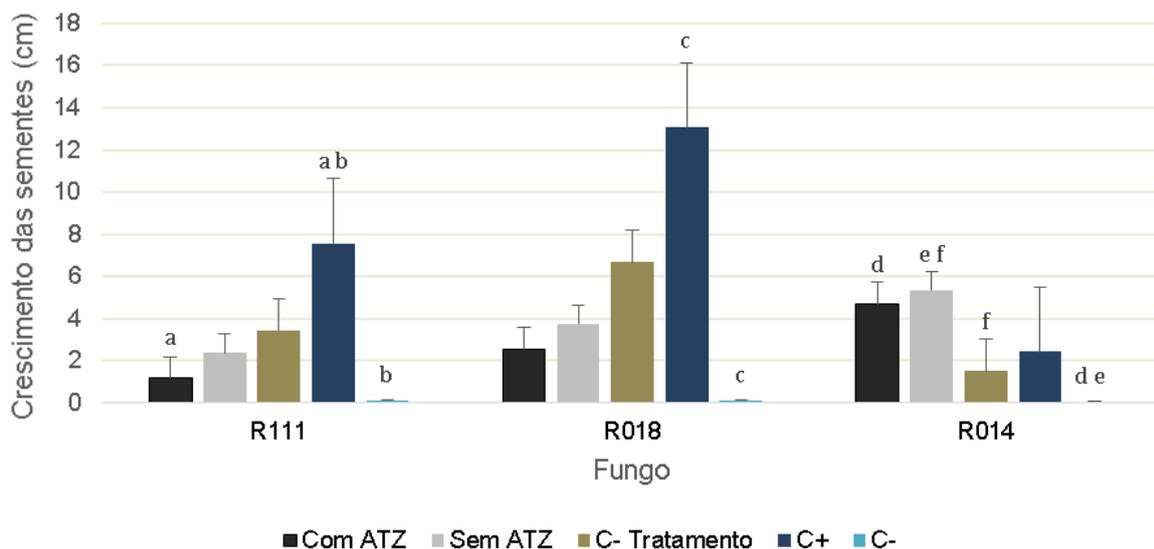
Fonte: Autoria própria (2022)

Para o fungo *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018 também não houve crescimento do fungo nas placas, mas houve um grande crescimento das sementes na presença da ATZ não tratada (C- tratamento). Isso pode ter ocorrido pois a ATZ comercial possui emulsificantes, espessantes, dispersantes e conservantes na sua formulação que podem ter permitido o grande crescimento das sementes nesse controle (BONASSA, 2021) e diminuído naturalmente sua toxicidade. Além disso, para esse fungo foi utilizado sementes de *C. sativus* de outra marca, que também pode ser a causa para o maior crescimento das sementes nesse controle. Todas as figuras dos bioensaios com *Cucumis sativus* para os três fungos estão presentes no Anexo III.

Os resultados do crescimento das sementes nos tratamentos estão expressos na Figura 15, sendo o “controle positivo” o cultivo da semente em água, o “controle

negativo” o cultivo com ZnSO₄ e o “controle negativo tratamento” o ensaio controle do cultivo fúngico (meio de cultura e ATZ, sem fungo).

Figura 15 - Média do crescimento das sementes (cm) após tratamento com ATZ usando os fungos *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111, *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018 e *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014. Para o controle negativo do tratamento (C-Tratamento) as sementes foram incubadas apenas com o meio de cultivo com ATZ, sem fungo. O controle positivo (C+) é a incubação das sementes com água destilada e o controle negativo (C-) com sulfato de zinco (ZnSO₄) (0,05 M). Médias seguidas da mesma letra indicam diferença significativa entre si de acordo com o teste de Tukey (p<0,05)



Fonte: Autoria própria (2022)

Na comparação entre os controles e os tratamentos (Figura 15), *C. rosea* CCMIBA_R018 não apresentou diferença estatística entre os ensaios e o controle positivo ou o controle negativo, ou seja, seu sobrenadante permitiu o crescimento da semente, assim como a água. Porém, acredita-se que a ausência de diferença estatística com o controle negativo se deve ao crescimento da semente no ensaio “controle negativo tratamento”, sem cultivo fúngico, como reportado anteriormente.

O fungo *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 apresentou diferença estatística entre o cultivo com ATZ e o controle positivo, isto indica que a degradação da ATZ pelo fungo interferiu negativamente no desenvolvimento da semente, isto é, a ATZ e ou a quebra da molécula de ATZ se tornou mais tóxica que a própria ATZ. Em adição, também houve um menor crescimento no ensaio com o fungo cultivado sem a presença de ATZ, se comparado com a ATZ não tratada. Além disso, *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 foi o fungo que apresentou menor produção de biomassa, ou seja,

pode não ter degradado completamente a ATZ e os compostos restantes se tornarem tóxicos.

Já o fungo *P. lilacinum* CCMIBA_R014 apresentou diferenças estatísticas em relação ao controle negativo, demonstrando que possivelmente o ensaio com ATZ degradada pelo fungo não é tóxica para o crescimento das sementes de pepino.

Além das análises de germinação das sementes (Figura 15), a eficiência da biodegradação é melhor avaliada através dos cálculos de toxicidade dos ensaios. Os cálculos para o percentual de toxicidade dos ensaios com fungos cultivados na presença e ausência de ATZ (Tabela 2), comprovam que a ATZ degradada pelo fungo *P. lilacinum* CCMIBA_R014 não foi tóxica para as sementes, com 0 % de toxicidade. Já os fungos *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 e *C. rosea* CCMIBA_R018 apresentaram toxicidade acima de 80 %, sem diferenças estatísticas com o controle negativo.

Tabela 2 - Percentual de toxicidade (%) dos ensaios após período de incubação das sementes de *C. sativus* com os tratamentos fúngicos: *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111, *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018 e *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014, com e sem ATZ. Para o controle negativo do tratamento (C- Tratamento) as sementes foram incubadas apenas com o meio de cultivo com ATZ, sem fungo, e o controle negativo (C-) com sulfato de zinco (ZnSO₄) (0,05 M). Médias seguidas da mesma letra indicam diferença significativa entre si de acordo com o teste de Tukey (p<0,05).

Fungo	Com ATZ	Sem ATZ	C- Tratamento	C-
R111	84,70	68,57	54,43	98,39
R018	80,47	71,22	48,96	99,08
R014	0 a	0 bc	38,94 c	97,18 ab

A porcentagem de toxicidade do ensaio sem tratamento fúngico da ATZ (C-tratamento) indica que possivelmente houve degradação da molécula para os fungos *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 e *C. rosea* CCMIBA_R018 pois a toxicidade dos tratamentos (85 % e 81 %, respectivamente) foi maior que o controle (54 % e 49 %, respectivamente) (tabela 2), isso indica alteração da molécula, gerando possivelmente os compostos tóxicos discutidos anteriormente.

Em adição, os ensaios sem adição de ATZ, só com crescimento fúngico também foram avaliados quanto ao percentual de toxicidade e os dados encontrados foram interessantes. É possível detectar também uma alta taxa de toxicidade. Isso

indica que os metabólitos secundários dos fungos podem ser naturalmente tóxicos para a *C. sativus*. Avaliando apenas o crescimento das sementes (Figura 15), esse perfil não é claro, porém ao calcular a taxa de toxicidade foi detectado esse padrão. Esse resultado pode explicar também por que não houve diminuição da toxicidade de ATZ por esses fungos. Neste sentido, *C. sativus*, pode ser um excelente indicador quando o composto é avaliado como única molécula na solução. Neste ensaio, que possui uma mistura de metabólitos secundários, *C. sativus* se mostrou altamente sensível à presença de outros compostos.

É conhecido que os fungos produzem metabólitos que são capazes de interferir no crescimento das sementes. Os fungos basidiomicetos, como *Bjerkandera* sp., além de possuir enzimas que degradam materiais lignocelulósicos, produzem outros compostos como produto do metabolismo secundário, incluindo ácidos graxos insaturados, peptídeos, compostos redutores de Fe³⁺, álcool veratrílico e ácidos carboxílicos, como o ácido oxálico, responsável por acidificar o meio, além de atuar sobre a parede celular de plantas sequestrando cálcio, desestruturando as microfibras e aumentando sua porosidade (SANTOS, 2016; AGUIAR & FERRAZ, 2011).

Um estudo realizado por Neto *et al* (2020) buscando avaliar o efeito fitotóxico da aplicação de metabólitos secundários do fungo *Phoma dimorpha*, com potencial herbicida, sobre a germinação e o crescimento de *C. sativus* e outras plantas bioindicadoras, demonstrou uma inibição de 100 % na germinação das sementes, devido a inibição de enzimas respiratórias e enzimas envolvidas na via das pentoses fosfato (ZOHAIB *et al*, 2016). Resultado semelhante foi obtido por Pes (2015) que avaliou os efeitos dos metabólitos secundários de *Diaporthe* sp, fungo fitopatogênico, sobre *C. sativus*, relatando que os metabólitos inibiram a germinação das sementes em 100 %. Essa inibição pode estar relacionada aos terpenóides, produzido por diversos fungos endofíticos, que tem funções hormonais nas plantas, capazes de impedir o crescimento das sementes e atuar no transporte de moléculas através da membrana, outra hipótese é a inibição da biossíntese de aminoácidos essenciais pela enzima acetolactato sintase (CASTRO *et al*, 2001).

Foi relatado a presença de flavonoides, esteroides e triterpenos nos extratos de *Bjerkandera adusta* analisados por cromatografia de Camada Delgada (CCD) que tiveram variação em sua composição química dependendo das condições de cultivo. A massa micelial do fungo foi extraída com os solventes hexano, clorofórmio, acetato

e metanol PA. Apenas o extrato hexano se mostrou tóxico para a *Artemia salina*, um microcrustáceo de água salgada empregada em testes de toxicidade, após 24 horas (RECH, 2017).

Outro modelo vegetal que pode ser usado para avaliar a toxicidade da ATZ após o tratamento fúngico é a cebola (*Allium cepa*), que mostrou uma inibição de crescimento de 100 % com ATZ não tratada, e reduziu para 55 % de inibição com a ATZ tratada pelo fungo *Aspergillus niger* após 72 horas. Foi discutido que essa diferença em relação ao controle (0 %) se deve ao fato de os herbicidas triazínicos se acumularem nas pontas de crescimento rompendo os cromossomos das células vegetais (PAULINO *et al*, 2017).

Um estudo realizado para selecionar espécies bioindicadoras sensíveis a ATZ, demonstrou que o tomate (*Solanum lycopersicum*) e o rabanete (*Raphanus sativus*) apresentaram o nível mais alto de sensibilidade (MARCHESAN *et al*, 2011). Outro modelo vegetal sensível a ATZ é a alface (*Lactuca Sativa*) que se mostrou um bom indicador de toxicidade, reduzindo a germinação e o crescimento exponencialmente conforme a concentração de ATZ aumenta (MACENA *et al*, 2017).

Por fim, a ATZ é uma molécula constituída por um anel aromático e clorotriazinas que podem ser degradados por microrganismos. No entanto, a degradação da atrazina não ocorre pela ação exclusiva de uma espécie microbiana isolada, este processo necessita de diversidade biológica. Em um ambiente poluído diversas comunidades de microrganismos coexistem e compartilham substratos comuns podendo gerar interações sinérgicas, e a reprodução destas comunidades, encontradas no ambiente contaminado, por meio dos consórcios microbianos possibilita uma maior eficácia na degradação dos poluentes (LIMA *et al*, 2011). Desta forma, para melhorar a eficiência da biorremediação da ATZ, o próximo passo é avaliar o consórcio dos três fungos estudados neste trabalho e verificar a fitotoxicidade dos metabólitos produzidos nessa degradação.

6. CONCLUSÃO

O fungo *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014 quando cultivado na presença de ATZ apresentou os melhores resultados, tanto para a produção de biomassa quanto para as análises de fitotoxicidade, demonstrando que, provavelmente, este fungo foi capaz de degradar a ATZ e que os metabólitos gerados desta degradação não foram tóxicos para as sementes de *C. sativus*. O fungo *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018 também apresentou uma boa produção de biomassa na presença da ATZ, porém as análises de fitotoxicidade mostraram um alto percentual de inibição das sementes. *Bjerkandera* sp. CCMIBA_R111 não apresentou resultados favoráveis, visto que teve um crescimento significativamente menor na presença de ATZ, e se mostrou tóxico para as sementes de pepino.

O crescimento das sementes de *C. sativus* foi inibido pela presença dos fungos nos ensaios, pois os tratamentos que continham o fungo cultivado na ausência e na presença da ATZ se mostraram mais tóxicos que o tratamento que continha apenas ATZ, exceto para *P. lilacinum* CCMIBA_R014, que não foi afetado pela presença do fungo. Portanto, o uso de outro indicador de toxicidade pode ser uma alternativa para os estudos com esses fungos.

Estudos subsequentes devem ser realizados visando um consórcio com os três fungos atuando em conjunto, podendo ser uma opção para a degradação completa da ATZ, pois estes fungos apresentam potencial para aplicação na biorremediação deste herbicida.

7. REFERÊNCIAS

ABIGAIL, E. A.; LAKSHIMI, V.; DAS, N. Biodegradation of atrazine by *Cryptococcus laurentii* isolated from contaminated agricultural soil. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 2, n. 3, p. 450–457, 2012.

ACAYABA, R.D. et al. Occurrence of pesticides in waters from the largest sugar cane plantation region in the world. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 28, n. 8, p. 9824-9835, 2021.

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729-1738, 2011.

BARBOSA, R. M. et al. **Eficiência do pepino como modelo em bioensaios de fitotoxicidade**. In: Resumos Expandidos do I CONICBIO / II CONABIO / VI SIMCBIO. Recife: Universidade Católica de Pernambuco, 2013.

BARDI, Alessandra. et al. Recalcitrant compounds removal in raw leachate and synthetic effluents using the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. **Water**, v. 9, n. 11, p. 824, 2017.

BEDELL, J.P.; FERRO, Y.; BAZIN, C.; PERRODIN, Y. Selection of a halophytic plant for assessing the phytotoxicity of dredged seaport sediment stored on land. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, n. 1, p. 183–194, 2014.

BELANGER, R. M. et al. Acute Atrazine Exposure has Lasting Effects on Chemosensory Responses to Food Odors in Crayfish (*Orconectes virilis*). **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 70, n. 2, p. 289-300, 2016.

BELANGER, R. M. et al. Diminished Conspecific Odor Recognition in the Rusty Crayfish (*Orconectes rusticus*) Following a 96-h Exposure to Atrazine. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 99, n. 5, p. 555-560, 2017.

BONASSA, Giuliana Rahmeier. **Seleção de fungos para o desenvolvimento de bioinoculante para biorremediação de solos agrícolas impactados com atrazina**. 2021. 63p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2021.

BRAGANÇA, I. et al. Phytotoxicity of pyrethroid pesticides and its metabolite towards *Cucumis sativus*. **Science of The Total Environment**, v. 619-620, p. 685-691, 2018.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. **Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, [...] e a**

fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, ano 139, n. 5, p. 1-12, 8 jan. 2002.

BRASIL. Portaria N° 518, de 25 de março de 2004. **Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.** Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005.

BRITT, Adrian. et al. The effects of atrazine on the microbiome of the eastern oyster: *Crassostrea virginica*. **Scientific reports**, v. 10, 2020.

CARBONERAS, B.; VILLASEÑOR, J.; FERNADEZ-MORALES, F. J. Modelling aerobic biodegradation of atrazine and 2,4-dichlorophenoxy acetic acid by mixedcultures. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 1044-50, 2017.

CARVALHO, Fernando P. Pesticides, environment and food safety. **Food and Energy Security**, v. 6, n. 2, p. 48–60, 2017.

CASTRO, H. G. et al. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários.** Visconde do Rio Branco: Suprema, 2001.

CUI, J. et al. Deciphering and engineering photosynthetic cyanobacteria for heavy metal bioremediation. **Sci. Total Environ.**, v. 761, 2021.

DEVESA-REY, R.; MOLDES, A.B.; DÍAZ-FIERROS, F.; BARRAL, M.T. Toxicity of Anllóns River Sediment Extracts Using Microtox and the Zucconi Phytotoxicity Test. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 80, p. 225–230, 2008.

DHIMAN, N.; JASROTIA, T.; SHARMA, P.; et al. Immobilization interaction between xenobiotic and *Bjerkandera adusta* for the biodegradation of atrazine. **Chemosphere**, v.257, 127060, 2020.

Dux, J. P., Stalzer, R. F. **Managing Safety in the Chemical Laboratory.** New York: Van Nostrand Reinhold, 1988.

EHRSAM, M; KNUTIE, S. A; ROHR, J. R. The herbicide atrazine induces hyperactivity and compromises tadpole detection of predator chemical cues. **Environ Toxicol Chem**, v. 35, n. 9, p. 2239-44, 2016.

ELGUETA, S. et al. Immobilization of the white-rot fungus *Anthracoxyllum discolor* to degrade the herbicide atrazine. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 104, 2016.

ELLOUZE, M.; SAYADI, S. White-rot fungi and their enzymes as a biotechnological tool for xenobiotic bioremediation. In **Management of Hazardous Wastes**; InTech: Rijeka, Croatia, 2016.

ESCUADERO, L. B.; QUINTAS, P. Y.; WUILLOUD, R. G.; et al. Recents advances on elemental biosorption. **Environmental Chemistry Letters**, v.17, p.409-27, 2019.

FALANGA, Annarita. et al. Ecotoxicity Evaluation of Pristine and Indolicidin-coated Silver Nanoparticles in Aquatic and Terrestrial Ecosystem. **International journal of nanomedicine**, v. 15, p. 8097-8108, 2020.

FANTIN, A. C. M. et al. **Teste de sensibilidade em sementes de Rúcula (*Eruca sativa*) e Alface (*Lactuca sp.*) em contato com diferentes concentrações do pesticida Glifosato**. Limeira: UNICAMP-CESET, 2009.

FARIA, R. A. **Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por *Ceriporiopsis subvermispora***. 102p. Dissertação (mestrado em ciências) - Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

FARIAS, Gabriele Santana. **Fungos basidiomicetos de solos de recuo da geleira Collins (Antártica): caracterização taxonômica e aplicação ambiental**. 77 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2022.

FATEMA,, U. et al. Functional analysis of polyketide synthase genes in the biocontrol fungus *Clonostachys rosea*. **Sci Rep**. v. 8, n.1, 2018.

FERNANDES, Ana Flavia Tonelli. et al. Impact of Atrazine Exposure on the Microbial Community Structure in a Brazilian Tropical Latosol Soil. **Microbes and environments**, v. 35, n. 2, 2020.

FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

FORADORI, C. D. et al. Atrazine inhibits pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release without altering GnRH messenger RNA or protein levels in the female rat. **Biology of reproduction**, v. 88, n. 1, 2013.

FU, Shao-Bin. et al. Two new echinocystic acid derivatives catalyzed by filamentous fungus *Gliocladium roseum* CGMCC 3.3657. **Nat Prod Res**. v. 33, n. 13, 2019.

GAGNETEN, A. M. et al. **Informe técnico-científico sobre el uso e impactos del herbicida atrazina en Argentina**. 1a ed - Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Programa Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD); Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de la Nación, 2021.

GONÇALVES, C. R.; DELABONA, P. S. Strategies for bioremediation of pesticides: challenges and perspectives of the Brazilian scenario for global application – A review. **Environmental Advances**, v. 8, 2022.

GONÇALVES JR, A. C.; LUCHESE, E. B.; LENZI, E. Avaliação da fitodisponibilidade de cádmio, chumbo e crômio, em soja cultivada em latossolo vermelho escuro tratado com fertilizantes comerciais. **Química Nova**, v. 23, n. 2, 2000.

HAYES, Tyrone B. et al. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 10, p. 4612-7, 2010.

HE, Huijun. et al. A Review on Recent Treatment Technology for Herbicide Atrazine in Contaminated Environment. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 24, 2019.

HENN, Caroline. et al. Biodegradation of atrazine and ligninolytic enzyme production by basidiomycete strains. **BMC microbiology**, v. 20, 2020.

HIMANEN, M.; PROCHAZKA, P.; HANNINEN, K.; OIKARI, A. Phytotoxicity of low-weight carboxylic acids. **Chemosphere**, v. 88, n. 4, p. 426-431, 2012.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil. Relatório de comercialização de agrotóxicos 24 de fevereiro de 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Ambiente, trabalho e câncer: aspectos epidemiológicos, toxicológicos e regulatórios** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2021.

JAVARONI, R. C. A. et al. Comportamento dos herbicidas atrazina e alaclor aplicados em solo preparado para o cultivo de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 22, n. 1, 1999.

JIANG, Z. et al. Removal of atrazine by biochar-supported zero-valent iron catalyzed persulfate oxidation: Reactivity, radical production and transformation pathway. **Environmental Research**, v. 184, 2020.

JUNG, P. E.; FONG, J. J.; PARK, M. S.; OH, S-Y; KIM, C.; LIM, Y. W. Sequence Validation for the Identification of the White-Rot Fungi *Bjerkandera* in Public Sequence Databases. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, n.10, p.1301–1307, 2014.

KAMAZ, Mohanad. et al. Atrazine Removal from Municipal Wastewater Using a Membrane Bioreactor. **International journal of environmental research and public health**, v. 17, n. 7, 2020.

KHADRANI, A.; SEIGLE-MURANDI, F.; STEIMAN, R.; VROUMSIA, T. Degradation of three phelyurea herbicides (chlortoluron, isoproturon and diuron) by micromycetes isolated from soil. **Chemosphere**, v.38, p. 3041-3050, 1999.

KHAN, A., et al. Effects of Paecilomyces lilacinus protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of Meloidogyne javanica juveniles. **Biological Control**, v. 31, n. 3, p. 346-352, 2004.

KIM, S. et al. Influence of metal oxide particles on soil enzyme activity and bioaccumulation of two plants. **J Microbiol Biotechnol**, v. 23, n. 9, p. 1279-1286, 2013.

KOHATSU, M.Y.; JESUS, T.A.; COELHO, L.H.G.; PEIXOTO, D.C.; POCCIA, G.T.; HUNTER, C. Fitotoxicidade de água superficial da Região Metropolitana de São Paulo utilizando bioensaio com Sinapis alba. **Acta Brasiliensis**, v. 2, p. 58-62, 2018.

KOTTERMAN, Michiel JJ; VIS, Eric H.; FIELD, Jim A. Successive mineralization and detoxification of benzo [a] pyrene by the white rot fungus Bjerkandera sp. strain BOS55 and indigenous microflora. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 8, p. 2853-2858, 1998.

KRUGER, E. L. et al. Persistence and degradation of [14C] atrazine and deisopropilatrazine as affected by soil depth and moisture conditions. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.12, p.1959-1967, 1993.

KRYUCHKOVA, Y. V. et al. Isolation and characterization of a glyphosate-degrading rhizosphere strain, Enterobacter cloacae K7. **Microbiol. Res.**, v. 169, n. 1, p. 99-105, 2014.

KUNDRÁT, J.T.; GYULAI, I.; SIMON, E.; MIZSEI, E.; BRAUN, M.; TÓTHMÉRÉSZ, B. Study of the effects of high levels of nutrients on Seed germination and root elongation. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 26, n. 4, p. 1585-1590, 2017.

LI, Y. S. et al. The Effect of Exposure to Atrazine on Dopaminergic Development in Pubertal Male SD Rats. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol**, v. 104, n. 5, p. 184-189, 2015.

LIMA, D. F.; OLIVEIRA, O. M. C.; CRUZ, M. J. M. Utilização dos fungos na biorremediação de substratos contaminados por petróleo: estado da arte. **Cadernos de Geociências**, v. 8, n. 2, 2011.

LOOS R. et al. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. **Water research**, v. 44, n. 14, p. 4115-4126, 2010.

LOPES, Raquel Oliveira. et al. Atrazine, desethylatrazine (DEA) and desisopropylatrazine (DIA) degradation by *Pleurotus ostreatus* INCQS 40310. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 38, p. 415-430, 2020.

LUANGSA-ARD, Jennifer et al. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. **FEMS microbiology letters**, v. 321, n. 2, p. 141-149, 2011.

LUO, Shuwen. et al. Accelerated atrazine degradation and altered metabolic pathways in goat manure assisted soil bioremediation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 221, 2021.

MACENA, D. A. et al. Teste de fitotoxicidade do composto atrazina: bioensaio utilizando como organismo teste a *Lactuca sativa*. **Colloquium Vitae**, v. 9, p. 07 -13, 2017.

MARCHESAN, E. D. et al. Seleção de espécies bioindicadoras para uso em bioensaios de lixiviação e persistência de atrazina no solo. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 21, p. 47-54, 2011.

MARINHO, G. et al. Potential of the filamentous fungus *Aspergillus niger* AN400 to degrade atrazine in wastewaters. **Biocatal Agric Biotechnol**, v. 9, p. 162-167, 2017.

MATIAS, T. P. et al. Aspectos envolvidos na biodegradação da atrazina sob diferentes condições de oxirredução. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, 2021.

MIN, K. et al. Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 392, n. 2, p. 279-86, 2001.

MOREIRA, Gláucia Mara. **Caracterização de espécies de *Clonostachys* e avaliação do parasitismo a *Botrytis cinerea***. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MOSA, Kareem A. et al. Copper Nanoparticles Induced Genotoxicity, Oxidative Stress, and Changes in Superoxide Dismutase (SOD) Gene Expression in Cucumber (*Cucumis sativus*) Plants. **Frontiers in plant science**, v.9, p. 872, 2018.

MOUGIN, C. et al. Biotransformation of the herbicide atrazine by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl Environ Microbiol**, v. 60, p. 705–708, 1994.

NETO, J. R. C. et al. Efeito de metabólitos secundários produzidos por *Phoma dimorpha* sobre a germinação e crescimento de sementes de diferentes espécies vegetais. **Acta Iguazu**, v.9, n.2, p. 109-121, 2020.

NGUYEN, L. N. et al. Removal of pharmaceuticals, steroid hormones, phytoestrogens, UV-filters, industrial chemicals and pesticides by *Trametes versicolor*: Role of biosorption and biodegradation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 88, p. 169-75, 2014.

NICODEMO, Sinara Cybelle Turibio e Silva. **Potencial de biodegradação de atrazina por *Bacillus megaterium* CCT 7935 e *Penicillium chrysogenum* NRRL 807 para biorremediação de solos contaminados**. 160 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2021.

ONDRÁČKOVÁ, E.; SEIDENGLANZ, M.; ŠAFÁŘ, J. Effect of seventeen pesticides on mycelial growth of *Akanthomyces*, *Beauveria*, *Cordyceps* and *Purpureocillium* strains. **Czech Mycology**, v. 71, n. 2, p. 123-135, 2019.

PASCHOAL, Adilson D. **Pragas, agrotóxicos e a crise ambiente: Problemas e soluções**. 2.ed. Expressão Popular, 2019.

PAULINO, R. S. et al. **Estudo do efeito da toxicidade em *Allium cepa* de solução aquosa contaminada com os pesticidas atrazina e metil paration após tratamento biológico fúngico**. In: 29 Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental - ABES. São Paulo: Congresso ABES, 2017.

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

PERDOMO, Haybrig, et al. Polyphasic Analysis of *Purpureocillium Lilacinum* Isolates from Different Origins and Proposal of the New Species *Purpureocillium Lavendulum*. **Mycologia**, v. 105, p. 151–61, 2013.

PEREIRA, Samanta V. **Degradação da atrazina pelo processo UV/H₂O₂ e ozônio, identificação dos intermediários e avaliação de atividade estrogênica**. 2011. 168 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

PERELO, L. W. Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. **J. Hazard. Mater.**, v. 177, p. 81-89, 2010.

PES, M. P. **Metabólitos secundários obtidos de *Diaporthe* sp. aplicados para o controle de plantas daninhas**. 58p. Dissertação (Mestrado em engenharia agrícola) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

PILEGGI, M.; PILEGGI, S. A. V.; SADOWSKY, M. J. Herbicide bioremediation: from strains to bacterial communities. **Heliyon**, v. 6, n. 12, 2020.

RECH, K. S. et al. Optimisation of *Bjerkandera adusta* culture conditions for the production of α - α -trehalose. **Natural Product Research**, v. 35, n. 21, p. 4206-4209, 2020.

RECH, K. S. **Caracterização e otimização de cultivo dos fungos *Bjerkandera adusta*, *Rhizoctonia* sp. e *Suillus* sp., estudo químico e avaliação das atividades biológicas de extratos de *Bjerkandera adusta***. 2017. 159p. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

ROCCUZZO, S.; BECKERMAN, A.P.; TROGL, J. New perspectives on the bioremediation of endocrine disrupting compounds from wastewater using algae-, bacteria- and fungi-based technologies. **Int. J. Environ. Sci. Technol.**, v. 18, n. 1, p. 89-107, 2021.

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

ROMAN, L. V. et al. **Como funcionam os herbicidas : da biologia à aplicação**. 21. ed. Passo Fundo: Gráfica Editora Berthier, 2005.

RUSSART, K. L.; RHEN, T. Atrazine alters expression of reproductive and stress genes in the developing hypothalamus of the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. **Toxicology**, v. 29, p.366-367, 2016.

SANGI, Diego P. et al. Benzoxazoles as novel herbicidal agents. **Pest Management Science**, v. 75, n. 1, p. 262-269, 2019.

SANTOS, D. R. et al. Pesticide degrading bacteria in aquatic environment: bioprospecting and evaluation of biotechnological potential. **Electron. J. Chem.**, v. 8, n. 4, 2016.

SANTOS, G. O. F. **Avaliação do tratamento de efluentes do banho de tingimento de indústria têxtil por fungos basidiomicetos em biorreatores**. 2016. 174 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

SASS, J. B.; COLANGELO A. European Union bans atrazine, while the United States negotiates continued use. **Int J Occup Environ Health**, v. 12, n. 3, 2006.

SERVIN, A. D. et al. Synchrotron micro-XRF and micro-XANES confirmation of the uptake and translocation of TiO₂ nanoparticles in cucumber (*Cucumis sativus*) plants. **Environ Sci Technol**, v. 46, n. 14, p. 7637-7643, 2012.

SHARMA, S.; ADHOLEYA, A. Detoxification and accumulation of chromium from tannery effluent and spent chrome effluent by *Paecilomyces lilacinus* fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 2, p. 309-317, 2011.

SOLOMON, K. R. et al. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. Annual Review. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 15, n.1 p. 31-76, 1996.

SOUZA, R. M. et al. Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: A review. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 135, p. 22-37, 2020.

SPINELLI, V. et al. Glyphosate-Eating Fungi: Study on Fungal Saprotrophic Strains' Ability to Tolerate and Utilise Glyphosate as a Nutritional Source and on the Ability of *Purpureocillium lilacinum* to Degrade It. **Microorganisms**, v. 9, n. 11, 2021.

ST CLAIR, Coy R.; FULLER, Claire A. Atrazine Exposure Influences Immunity in the Blue Dasher Dragonfly, *Pachydiplax longipennis* (Odonata: Libellulidae). **Journal of insect science**, v. 18, n. 5, 2018.

STRADTMAN, Sydney C.; FREEMAN, Jennifer L. Mechanisms of Neurotoxicity Associated with Exposure to the Herbicide Atrazine. **Toxics**, v. 9, n. 207, 2021.

STROBEL, G. A. et al. The production of myco-diesel hydrocarbons and their derivatives by the endophytic fungus *Gliocladium roseum* (NRRL 50072). **Microbiology (Reading)**, v. 154, 2008.

SUN, Z.-B. et al. Biology and applications of *Clonostachys rosea*. **Journal of applied microbiology**, v. 129, n. 3, p. 486-495, 2020.

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

SZEWCZYK, Rafal. et al. Atrazine biodegradation by mycoinsecticide *Metarhizium robertsii*: Insights into its amino acids and lipids profile. **Journal of Environmental Management**, v. 262, 2020.

TAI, J. K. A. C. et al. Developmental atrazine exposure in zebrafish produces the same major metabolites as mammals along with altered behavioral outcomes. **Neurotoxicology and teratology**, v. 85, 2021.

TAN, Hongli. et al. Prenatal exposure to atrazine induces cryptorchidism and hypospadias in F1 male mouse offspring. **Birth defects research**, v.113, n. 6, p. 469–484, 2021.

TREU, R.; FALANDYSZ, J. Mycoremediation of hydrocarbons with basidiomycetes-a review. **J. Environ. Sci. Health B**, v. 52, n. 3, p. 148-155, 2017.

TOMEI, M. C.; DAUGULIS, A. J. Ex situ bioremediation of contaminated soils: An overview of conventional and innovative technologies. **Crit. Rev. Environ. Sci.**, v. 43, n. 20, p. 2107-2139, 2013.

URBANEK, A. K. et al. Isolation and characterization of Arctic microorganisms decomposing bioplastics. **AMB Express**. v. 7, n. 1, 2017.

URBANIÁK, Magdalena. et al. Effects of soil amendment with PCB-contaminated sediment on the growth of two cucurbit species. **Environmental science and pollution research international**, v. 27, n. 9, 2020.

WALKER, B. S.; KRAMER A. G.; LASSITER, C. S. Atrazine affects craniofacial chondrogenesis and axial skeleton mineralization in zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicol Ind Health**. v. 34, n. 5, p. 329-338, 2018.

WANG, Chao-Ge; VLASÁK, Josef; DAI, Yu-Cheng. Phylogeny and diversity of *Bjerkandera* (*Polyporales*, *Basidiomycota*), including four new species from South America and Asia. **MycoKeys**, v. 79, p. 149, 2021.

WANG, Xiaodong. et al. Validation of germination rate and root elongation as indicator to assess phytotoxicity with *Cucumis sativus*. **Chemosphere**, v. 44, p. 1711-1721, 2001.

WEBER, G. J. et al. Transcriptome alterations following developmental atrazine exposure in zebrafish are associated with disruption of neuroendocrine and reproductive system function, cell cycle, and carcinogenesis. **Toxicological sciences**, v. 132, n. 2, p. 458–466, 2013.

WESTPHALEN, M. C.; TOMSOVSKY, M.; KOUT, J.; GUGLIOTTA, A. M. *Bjerkandera* in the Neotropics: phylogenetic and morphological relations of *Tyromyces atroalbus* and description of a new species. **Mycological Progress**, v.14, n.100, p.1-8, 2015.

WIRBISKY, Sara E; FREEMAN, Jennifer L. Atrazine exposure elicits copy number alterations in the zebrafish genome. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 194, p. 1-8, 2017.

WIRBISKY-HERSHBERGER, S. E. et al. Atrazine exposure decreases the activity of DNMTs, global DNA methylation levels, and dnmt expression. **Food Chem Toxicol**. v. 109, p. 727-734, 2017.

XIA, Lu. et al. A Comparative Study on the Biosorption of Cd²⁺ onto *Paecilomyces lilacinus* XLA and *Mucoromycote* sp. XLC. **Int J Mol Sci**. v. 16, n. 7, 2015.

YANG, Fengshan. et al. Effects of Atrazine on Chernozem Microbial Communities Evaluated by Traditional Detection and Modern Sequencing Technology. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, p. 1832, 2021.

YANG, Li. et al. Enantioselective Separation of 4,8-DHT and Phytotoxicity of the Enantiomers on Various Plant Species. **Molecules**, v. 21, n. 4, p. 528, 2016.

ZINI, L. B.; GUTTERRES, M. Chemical contaminants in Brazilian drinking water: a systematic review. **Journal of Water & Health**, v. 19, n. 3, p. 351-369, 2021.

ZOHAIB, A.; ABBAS, T.; TABASSUM, T. Weeds cause losses in field crops through allelopathy. **Not Science Biological**, v.8, p.47-56, 2016.

ZUCCONI, L. et al. Lead resistance, sorption and accumulation in a *Paecilomyces lilacinus* strain. **Biology and Fertility of Soils**, v. 37, p. 17-22, 2003.

8. ANEXOS

ANEXO I - Resultados dos testes ANOVA e testes de Tukey

Tabela - Resultados do teste ANOVA para a biomassa do fungo CCMIBA_R111

	Soma de quadrados	df	Quadrado médio	F	p (valor)
Entre grupos:	33750	1	33750	19,47	0,01158
Dentro dos grupos:	6933,33	4	1733,33		
Total:	40683,3	5			

Tabela - Resultados do teste ANOVA para a biomassa do fungo CCMIBA_R018

	Soma de quadrados	df	Quadrado médio	F	p (valor)
Entre grupos:	6666,67	1	6666,67	0,5263	0,5083
Dentro dos grupos:	50666,7	4	12666,7		
Total:	57333,3	5			

Tabela - Resultados do teste ANOVA para a biomassa do fungo CCMIBA_R014

	Soma de quadrados	df	Quadrado médio	F	p (valor)
Entre grupos:	4816,67	1	4816,67	0,2323	0,655
Dentro dos grupos:	82933,3	4	20733,3		
Total:	87750	5			

Tabela - Resultados do teste de Tukey para o crescimento das sementes na presença do fungo CCMIBA_R111. * Indica diferença significativa entre os ensaios ($p < 0,05$).

	Com ATZ	Sem ATZ	C- Tratamento	C+	C-
Com ATZ		0,9651	0,7521	0,04534*	0,9805
Sem ATZ	0,9023		0,9779	0,1208	0,7622
C- Tratamento	1,696	0,7938		0,2706	0,4534
C+	4,743	3,841	3,047		0,01959*
C-	0,7667	1,669	2,463	5,51	

Tabela - Resultados do teste de Tukey para o crescimento das sementes na presença do fungo CCMIBA_R018. * Indica diferença significativa entre os ensaios ($p < 0,05$).

	Com ATZ	Sem ATZ	C- Tratamento	C+	C-
Com ATZ		0,9967	0,7745	0,08419	0,9557
Sem ATZ	0,4798		0,9194	0,1406	0,8396
C- Tratamento	1,635	1,156		0,4252	0,4045
C+	4,177	3,698	2,542		0,02923*
C-	0,9661	1,446	2,602	5,143	

Tabela - Resultados do teste de Tukey para o crescimento das sementes na presença do fungo CCMIBA_R014. * Indica diferença significativa entre os ensaios ($p < 0,05$).

	Com ATZ	Sem ATZ	C- Tratamento	C+	C-
Com ATZ		0,9573	0,05821	0,2406	0,006636*
Sem ATZ	0,9559		0,02043*	0,08911	0,002519*
C- Tratamento	4,516	5,472		0,8699	0,6288
C+	3,169	4,125	1,347		0,1996
C-	6,526	7,482	2,011	3,357	

Tabela - Resultados do teste ANOVA para o percentual de toxicidade dos ensaios com *Cucumis sativus*, na presença do fungo CCMIBA_R111 ($p < 0,05$).

	Soma de quadrados	df	Quadrado médio	F	p (valor)
Entre grupos:	0,617493	3	0,205831	1,703	0,2431
Dentro dos grupos:	0,96687	8	0,120859		
Total:	1,58436	11			

Tabela - Resultados do teste ANOVA para o percentual de toxicidade dos ensaios com *Cucumis sativus*, na presença do fungo CCMIBA_R018 ($p < 0,05$).

	Soma de quadrados	df	Quadrado médio	F	p (valor)
Entre grupos:	0,444435	3	0,148145	1,028	0,4303
Dentro dos grupos:	1,15299	8	0,144124		
Total:	1,59743	11			

Tabela - Resultados do teste ANOVA para o percentual de toxicidade dos ensaios com *Cucumis sativus*, na presença do fungo CCMIBA_R014 ($p < 0,05$).

	Soma de quadrados	df	Quadrado médio	F	p (valor)
Entre grupos:	10,2147	3	3,4049	9,006	0,006059
Dentro dos grupos:	3,02462	8	0,378077		
Total:	13,2393	11			

Tabela - Resultados do teste de Tukey para o percentual de toxicidade dos ensaios com *Cucumis sativus*, na presença do fungo CCMIBA_R014. * Indica diferença significativa entre os ensaios ($p < 0,05$).

	Com ATZ	Sem ATZ	C- Tratamento	C-
Com ATZ		0,9292	0,09758	0,0215*
Sem ATZ	0,8486		0,04188*	0,009692*
C- Tratamento	3,859	4,707		0,7092
C-	5,389	6,238	1,531	

ANEXO II – Tabelas adicionais

Tabela - Peso seco da biomassa fúngica produzida após incubação por 10 dias a 28°C e 150 rpm. Variação entre as réplicas para o fungo *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018 na presença da ATZ.

	R111		R018		R014	
Réplica	Com ATZ	Sem ATZ	Com ATZ	Sem ATZ	Com ATZ	Sem ATZ
A	300	410	410	380	510	570
B	200	410	450	410	240	320
C	300	430	160	430	500	530
Média	266,67	416,67	340,00	406,67	416,67	473,33

Tabela - Média do crescimento das sementes (cm). Médias seguidas da mesma letra indicam diferença significativa entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)

Réplica	Com ATZ	Sem ATZ	C- Tratamento	C+	C-	
R111	A	2,05±1,68	2,12±2,11	0,93±1,14	11,69±6,51	0,08±0,04
	B	0,52±0,68	0,54±0,78	6,02±2,52	7,43±4,36	0,12±0,1
	C	0,91±1,49	4,48±3,22	3,41±2,0	3,60±3,32	0,17±0,12
	Média	1,16±1,49 a	2,38±2,78	3,45±2,85	7,57±5,85 ab	0,12±0,1 b
R018	A	2,10±1,56	5,12±2,43	9,45±1,97	2,42±1,05	0,13±0,08
	B	3,45±2,93	3,84±2,83	5,71±4,4	19,57±4,68	0,18±0,07
	C	2,10±2,08	2,31±2,48	4,83±3,57	17,18±4,45	0,05±0,05
	Média	2,55±2,33	3,76±2,81	6,66±3,94	13,06±8,51 c	0,12±0,08 c
R014	A	6,37±3,3	6,55±4,0	0,38±0,91	2,45±1,25	0,05±0,05
	B	3,17±2,46	3,16±2,84	1,48±2,18	2,65±2,06	0,06±0,05
	C	4,52±3,9	6,38±3,93	2,61±2,93	2,23±1,64	0,09±0,07
	Média	4,69±3,51 d	5,36±3,93 ef	1,49±2,31 f	2,44±1,65	0,07±0,06 de

ANEXO III - Ensaio de fitotoxicidade

Figura - Ensaio de fitotoxicidade com *Cucumis sativus* na presença do fungo *Bjerkandera* sp.CCMIBA_R111. (A, B, C) fungo cultivado na presença de ATZ; (D, E, F) fungo cultivado sem ATZ; (G) controle positivo; (H) controle negativo; (I) Controle negativo do tratamento (ATZ e meio).

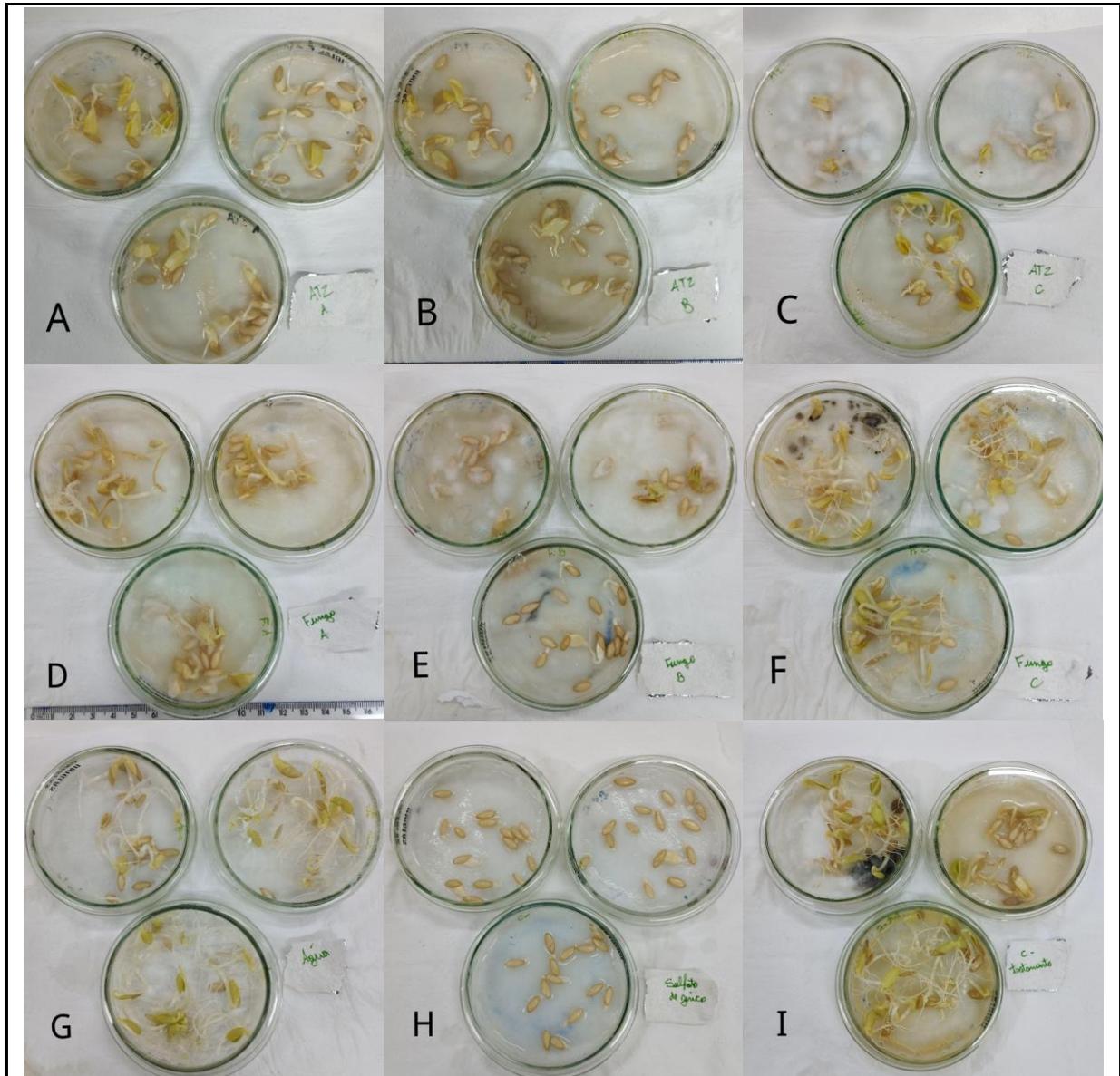


Figura - Ensaio de fitotoxicidade com *Cucumis sativus* na presença do fungo *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018. (A, B, C) fungo cultivado na presença de ATZ; (D, E, F) fungo cultivado sem ATZ; (G) controle positivo; (H) controle negativo; (I) Controle negativo do tratamento (ATZ e meio).

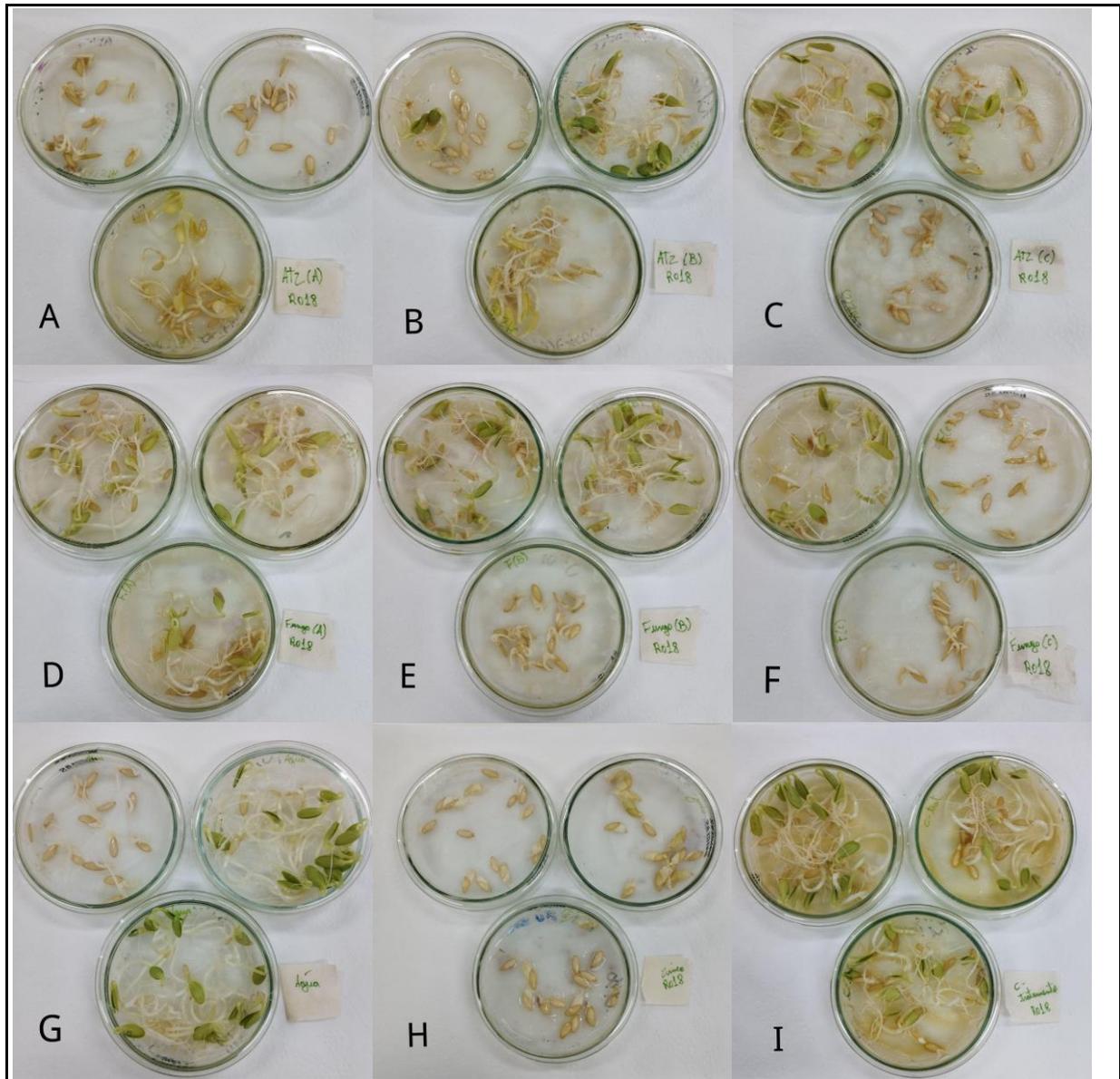


Figura - Ensaio de fitotoxicidade com *Cucumis sativus* na presença do fungo *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014. (A, B, C) fungo cultivado na presença de ATZ; (D, E, F) fungo cultivado sem ATZ; (G) controle positivo; (H) controle negativo; (I) Controle negativo do tratamento (ATZ e meio).

