

**TRATAMENTO DE SOLO AGRÍCOLA CONTAMINADO COM ATRAZINA POR  
FUNGOS FILAMENTOSOS IMOBILIZADOS EM CARVÃO ATIVADO**

**ADRIANA HEISS SIQUEIRA**

**TRATAMENTO DE SOLO AGRÍCOLA CONTAMINADO COM ATRAZINA POR  
FUNGOS FILAMENTOSOS IMOBILIZADOS EM CARVÃO ATIVADO**

**ADRIANA HEISS SIQUEIRA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do 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 Mestre em Ciências, área de concentração Biotecnologia.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos

ADRIANA HEISS SIQUEIRA

**TRATAMENTO DE SOLO AGRÍCOLA CONTAMINADO COM ATRAZINA POR FUNGOS  
FILAMENTOSOS IMOBILIZADOS EM CARVÃO ATIVADO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do 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 Mestre em Ciências, área de concentração Biociências.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos  
Orientadora  
UNILA

---

Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini  
Examinador  
UNILA

---

Dra. Carla Porto da Silva  
Examinadora  
*MS BIOSCIENCE*

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná, 28 de junho de 2024.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação  
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - PTI

S618

Siqueira, Adriana Heiss.

Tratamento de solo agrícola contaminado com atrazina por fungos filamentosos imobilizados em carvão ativado / Adriana Heiss Siqueira. - Foz do Iguaçu, PR, 2024.

88 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza. Pós-Graduação em Biociências. Foz do Iguaçu-PR, 2024.

Orientador: Rafaella Costa Bonugli Santos.

1. Biochar. 2. Solo - Biorremediação. 3. Solo - Imobilização. 4. Bioinoculante. 5. Agrotóxico. I. Santos, Rafaella Costa Bonugli. II. Título.

CDU 631.4

Com gratidão, dedico esse trabalho a Deus e a minha família, que são minha motivação e meu apoio.

## **AGRADECIMENTOS**

Gratidão a Deus por estar comigo em toda minha caminhada, me guiando, me fortalecendo e me dando sabedoria em todos os momentos.

Gratidão e honra aos meus pais por tudo que já fizeram por mim, por todo apoio que me dão e toda ajuda necessária para realizar meus sonhos.

Gratidão ao meu parceiro Jean Marcos, pois não existe amor mais dedicado que o seu e por ele eu agradeço. Sua amizade, seu companheirismo e sua dedicação me fortalecem e me enche de amor e alegria.

Gratidão a minha filha Olivia, que chegou em minha vida quase no final desse projeto e me deu força e motivação para seguir. Filha, você é a luz da minha vida, a minha maior felicidade, quero ser motivo de orgulho e exemplo para você. Gratidão e honra de ser sua mamãe.

Gratidão a minha orientadora Prof.a. Dra. Rafaella, primeiro por ter aceitado o convite para me orientar por essa estrada do mestrado, por todo conhecimento me passado, pela sua paciência e confiança em meu trabalho.

Gratidão a todos que participaram de alguma forma para que esse trabalho acontecesse.

*“Entrega o teu caminho ao Senhor; confia nele, e ele  
o fará.”*

Salmo 37:5

SIQUEIRA, Adriana Heiss. 2024. **Tratamento de solo agrícola contaminado com atrazina por fungos filamentosos imobilizados em carvão ativado**. Orientadores: SANTOS, Rafaella Costa Bonugli (orientadora). 88 f.. Dissertação de Mestrado - PPG-BC (Programa de Pós-Graduação em Biociências), UNILA (Universidade Federal da Integração Latino-Americana), Foz do Iguaçu.

## RESUMO

A atrazina, herbicida amplamente utilizado na agricultura brasileira, pode contaminar rios e aquíferos devido à sua persistência no solo. Fungos filamentosos tem potencial para degradar a atrazina, mas a extensão das áreas cultivadas torna essa técnica desafiadora. A biorremediação pode ser aprimorada com carvão ativado, cuja estrutura porosa favorece o crescimento de micro-organismos. Este trabalho teve como objetivo a produção de um bioinoculante composto pelos fungos *Clonostachys rosea* CCMIBA\_R018, *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA\_R014, e *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_R111 imobilizados no carvão ativado para o tratamento de solo contaminado com atrazina. A metodologia, em suma, foi delineada para: identificação da melhor condição de cultivo de cada fungo; avaliação do efeito do carvão ativado no desenvolvimento fúngico; imobilização individual dos fungos a partir de diferentes variações de cultivo; elaboração do bioinoculante a partir do consórcio dos fungos em carvão ativado; avaliação das enzimas Lacase, Manganês Peroxidase e Lignina Peroxidase; e avaliação da ação do inoculante em um sistema de microcosmos de solo agrícola contaminado com atrazina. Para cultivo foi selecionado o caldo Sabouraud Dextrose para os fungos *Clonostachys rosea* CCMIBA\_R018 e *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA\_R014 e caldo malte enriquecido com peptona e extrato de levedura para o fungo *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_R111. O pré-inóculo de cada fungo individualmente nos meios selecionados com a adição de carvão ativado (5 g), seguido pela incubação conjunta em mais 15 g de carvão ativado e adição de água peptonada 1 % (pH 7) no início do cultivo manteve a viabilidade de crescimento, resultando na melhor condição de consórcio após 21 dias a 28 °C. Apesar do potencial ligninolítico individual, foram observadas atividades significativas de lignina peroxidase quando combinadas, sugerindo efeitos sinérgicos. Os resultados após tratamento do solo revelaram uma redução de 34 % na concentração de atrazina no solo esterilizado e uma redução de 66 % no solo não esterilizado, demonstrando a eficácia em condições reais de solo. Além disso, mais de 30 fatores do solo foram analisados, destacando diferenças significativas em 12 parâmetros, especialmente um aumento nos níveis de fósforo e enxofre, melhorando a fertilidade do solo. Em conclusão, o consórcio fúngico, combinado com carvão ativado, apresenta uma abordagem inovadora de biorremediação, beneficiando a saúde e a produtividade do solo. Esse processo é particularmente inovador, pois a maioria dos bioinoculantes não aborda o tratamento de poluentes.

**Palavras-chave:** biochar; biorremediação; imobilização; bioinoculante; agrotóxico.

SIQUEIRA, Adriana Heiss. 2024. **Treatment of agricultural soil contaminated with atrazine by filamentous fungi immobilized on activated charcoal**. Advisors: SANTOS, Rafaela Costa Bonugli Santos (advisor). 88 s.. Master's thesis (Master's degree) - PPG-BC (Graduate Program in Biosciences), UNILA (Federal University of Latin American Integration), Foz do Iguaçu.

## ABSTRACT

*Atrazine, a herbicide widely used in Brazilian agriculture, can contaminate rivers and aquifers due to its persistence in the soil. Filamentous fungi are capable of degrading atrazine, but the vast area of agricultural land presents a challenge for this technique. Bioremediation can be enhanced with activated carbon, whose porous structure favors the growth of microorganisms. This study aimed to produce a bioinoculant composed of the fungi Clonostachys rosea CCMIBA\_R018, Purpureocillium lilacinum CCMIBA\_R014, and Bjerkandera sp. CCMIBA\_R111 immobilized on activated carbon for the treatment of soil contaminated with atrazine. The methodology, in short, was designed to: identify the best cultivation condition for each fungus; evaluate the effect of activated carbon on fungal development; individual immobilization of fungi from different cultivation variations; preparation of the bioinoculant from the consortium of fungi on activated carbon; evaluation of the enzymes Laccase, Manganese Peroxidase and Lignin Peroxidase; and evaluation of the inoculant action in a microcosm system of agricultural soil contaminated with atrazine. For cultivation, the Sabouraud Dextrose broth was selected for the fungi Clonostachys rosea CCMIBA\_R018 and Purpureocillium lilacinum CCMIBA\_R014 and malt broth enriched with peptone and yeast extract for the fungus Bjerkandera sp. CCMIBA\_R111. The pre-inoculum of each fungus individually in the selected media with the addition of activated carbon (5 g), followed by joint incubation in another 15 g of activated carbon and addition of 1% peptone water (pH 7) at the beginning of the cultivation maintained the growth viability, resulting in the best consortium condition after 21 days at 28 °C. Despite their individual ligninolytic potential, significant lignin peroxidase activities were observed when combined, suggesting synergistic effects. The results after soil treatment revealed a 34% reduction in atrazine concentration in sterilized soil and a 66% reduction in non-sterilized soil, demonstrating efficacy under real soil conditions. In addition, more than 30 soil factors were analyzed, highlighting significant differences in 12 parameters, especially an increase in phosphorus and sulfur levels, improving soil fertility. In conclusion, the fungal consortium, combined with activated carbon, presents an innovative approach to bioremediation, benefiting soil health and productivity. This process is particularly innovative, since most bioinoculants do not address pollutant treatment.*

**Keywords:** biochar; bioremediation; immobilization; bioinoculant; agrototoxic.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrativo, representando a formação do solo e dos horizontes do solo.....	19
Figura 2 - Representação dos micro e macro-agregados do solo.....	21
Figura 3 - Impacto causado por intensificação do manejo agrícola nos solos.....	24
Figura 4 - Molécula de atrazina ( $C_8H_{14}ClN_5$ ).....	27
Figura 5 - Esquema ilustrativo da dinâmica dos defensivos químicos no sistema: solo-água-atmosfera.....	29
Figura 6 - Figura representando o ciclo do carbono natural e quando o ciclo é transformado em biocarvão.....	34
Figura 7 - Imagem de microscopia eletrônica do carvão ativado puro, apresentando sua porosidade, macro e micro poros.....	35
Figura 8 - Imagem de microscopia eletrônica mostrando hifas fúngica (estruturas alongadas e finas) cobrindo e penetrando as estruturas porosas do carvão ativado.....	36
Figura 9 - Esquema ilustrativo do ensaio de cinética de crescimento fúngico em meio líquido.....	39
Figura 10 - Esquema ilustrativo do ensaio de imobilização no carvão ativado.....	40
Figura 11 - Esquema ilustrativo do preparo do inoculante.....	42
Figura 12 - Esquema ilustrativo do ensaio de tratamento do solo agrícola contaminado com atrazina a partir da adição do inoculante em microcosmos.....	45
Figura 13 - Exemplo do resultado do ensaio de avaliação do crescimento fúngico no carvão ativado.....	50
Figura 14 - Diluição seriada e plaqueamento em meio sólido do consórcio após 10 dias de incubação em meio sólido.....	55
Figura 15 - Consórcios TI1 (a) e TI2 (b) após 21 dias de cultivo (triplicata).....	56
Figura 16 - Pré-inóculos dos fungos <i>Clonostachys rosea</i> CCMIBA_R018, <i>Purpureocillium lilacinum</i> CCMIBA_R014, e <i>Bjerkandera</i> sp. CCMIBA_R111.....	86

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de crescimento da biomassa fúngica cultivada a 28°C e 140 rpm por até 17 dias.....	48
Gráfico 2 - Ensaio de imobilização no carvão ativado a partir do meio de cultivo líquido. .	51
Gráfico 3 - Ensaio de imobilização no carvão ativado a partir do meio de cultivo líquido. .	52
Gráfico 4 - Peso seco (biomassa) dos consórcios fúngicos (figura 11).....	54
Gráfico 5 - Gráfico de dosagem das enzimas Lac, LiP e MnP.....	57
Gráfico 6 - Atividade das enzimas Lac, LiP e MnP dos sobrenadantes dos ensaios de imobilização no carvão ativado.....	58
Gráfico 7 - Concentração (mg/kg) de atrazina nas amostras coletadas dos microcosmos após 24 dias de incubação.....	59
Gráfico 8 - Peso total dos ensaios de imobilização (incluindo o peso do frasco de incubação) durante 21 dias.....	88

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Meios de cultivos usados para a cinética de crescimento dos fungos Clonostachys rosea CCMIBA_R018, Purpureocillium lilacinum CCMIBA_R014, e Bjerkandera sp. CCMIBA_R111.....	39
Tabela 2 - Ensaio de imobilização individual dos fungos no carvão ativado.....	41
Tabela 3 - Preparo do ensaio com microcosmos em bandejas contendo solo agrícola esterilizado ou não, atrazina comercial, inoculante ou não.....	45
Tabela 4 - Resultados das análises físico-químicas do solo dos microcosmos EM1, EM1c, EM2 e EM2c após 24 dias de incubação em casa de vegetação.....	62
Tabela 5 - Resultado da análise estatística.....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
Al	Alumínio
As	Arsenio
ATZ	Atrazina
B	Boro
C	Carbono
C. Org. Tot.	Carbono orgânico total
Ca	Cálcio
CCMIBA	Coleção de Cultura de Micro-organismos de Importância Biotecnológica e Ambiental
Cd	Cadmo
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Cr	Cromio
CTC	Capacidade de Troca de Cátions
Cu	Cobre
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E1	Ensaio de imobilização 1
E2	Ensaio de imobilização 2
E3	Ensaio de imobilização 3
E4	Ensaio de imobilização 4
Fe	Ferro
g	Grama
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
H+	Hidrogênio
H <sub>2</sub> O	Água
Hg	Mercúrio
IQS	Índice de qualidade do solo
K	Potássio
Lac	Lacase
Lip	Lignina peroxidase
MA2	Malte ágar 2 %
Mat. Org.	Matéria orgânica
ME1	Microcosmo ensaio 1
ME1 <sup>C</sup>	Microcosmo ensaio 1 controle
ME2	Microcosmo ensaio 2
ME2 <sup>C</sup>	Microcosmo ensaio 2 controle
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Mg	Magnésio
mg/há	Miligrama por hectare
mg/L	Miligrama por litro
mL	Mililitros
mM	Milimolar

Mn	Manganês
MnP	Manganês peroxidase
MO	Materia orgânica
MO	Matéria orgânica
N	Nitrogênio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NaOH	Hidroxido de sódio
NGS	Sequenciamento de DNA de segunda geração
NH <sub>3</sub>	Amônia
NH <sub>3</sub>	Amoníaco
Ni	Nickel
nm	Nanomolar
NO	Óxido Nítrico
NO <sub>3</sub>	Nitrato
O <sub>2</sub>	Oxigênio
ONU	Organizações das nações unidas
P	Fósforo
Pb	Chumbo
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
PS II	Photosystem II
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotação por minuto
Se	Selenium
SOC	Carbono orgânico do solo
TI1	Tratamento inoculante 1
TI2	Tratamento inoculante 2
Zn	Zinco
μmol	Micromolar

## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>ÍNDICE DE GRÁFICOS.....</b>	<b>x</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
2.1 O solo e a agricultura.....	18
2.2 Práticas agrícolas e seus impactos.....	23
2.2.1 <i>Atrazina</i> .....	26
2.2.2 <i>Biorremediação</i> .....	30
2.2.3 <i>Biodegradação fúngica</i> .....	31
2.3 Inoculantes biológicos.....	32
2.3.1 <i>Carvão ativado (Biochar)</i> .....	32
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
3.1 Objetivo geral.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
4.1 Micro-organismos.....	38
4.2 Cinética de crescimento fúngico.....	38
4.3 Imobilização dos fungos no carvão ativado.....	39
4.4 Inoculante: consórcio fúngico imobilizado no carvão ativado.....	41
4.4.1 <i>Viabilidade do consórcio fúngico</i> .....	42
4.5 Atividade enzimática.....	43
4.6 Avaliação da capacidade de degradação da atrazina pelo inoculante e análise da qualidade do solo em microcosmos de solo agrícola.....	44
4.7 Análises estatísticas.....	45
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>47</b>
5.1 Identificação da melhor condição de cultivo de cada fungo.....	47
5.2 Imobilização no carvão ativado.....	49
5.3 Elaboração do inoculante: Consórcio fúngico em carvão ativado.....	53
5.4 Perfil ligninolítico dos fungos.....	56

5.5 Tratamento do solo agrícola contaminado com atrazina a partir do inoculante em um sistema de microcosmos.....	60
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>7 BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>65</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>86</b>
Apêndice A – Pré-inóculos dos fungos <i>Clonostachys rosea</i> CCMIBA_R018, <i>Purpureocillium lilacinum</i> CCMIBA_R014, e <i>Bjerkandera</i> sp. CCMIBA_R111.....	86
Apêndice B – Resultado da análise estatística.....	87
Apêndice C – Gráfico com peso total dos ensaios de imobilização.....	88

## 1 INTRODUÇÃO

O solo é um dos ecossistemas mais complexo conhecido, responsável por 98 % de todo alimento e matéria prima produzido no mundo e possui grande impacto na reserva de carbono (KOPITTKE *et al.*, 2019). Os micro-organismos decompositores encontrados no solo desempenham um papel crucial na promoção da saúde do solo. Os decompositores primários, em particular, desempenham uma função vital no processo de decomposição de compostos orgânicos. Eles desempenham um papel essencial na manutenção do funcionamento dos ecossistemas agrícolas e naturais, realizando tarefas como a ciclagem de nutrientes, o armazenamento de água, a desintoxicação do solo e a supressão de patógenos (HAGNER *et al.*, 2019).

As características físicas, químicas e biológicas do solo são importantes para o alcance de um ambiente saudável para os micro-organismos e plantas. No entanto, essas características estão sendo alteradas devido ao uso excessivo de defensivos químicos na agricultura (GOUDA *et al.*, 2018), o que leva à degradação do solo, caracterizada, especialmente, pela redução no fornecimento de nutrientes para o ecossistema. Estimativas indicam que 25 % dos solos já estejam severamente degradados e esse número continua a aumentar, apesar das medidas adotadas para sua preservação e restauração (CROSSLAND *et al.*, 2018). As práticas agrícolas impactam na qualidade do solo resultando no aumento da lixiviação, da erosão e na redução da retenção de gases de efeito estufa (SAINJU; WHITEHEAD; SINGH, 2003).

A atrazina (ATZ), um dos herbicidas mais comercializados na agricultura brasileira, é um pesticida de uso agrícola pós-emergencial e pré-emergencial que tem como alvo combater ervas daninhas e outras pragas que atingem as plantações (LYON, 1999). A ATZ possui baixa adsorção no solo e um grande potencial de contaminação de corpos d'água (DOS SANTOS *et al.*, 2023), devido, sobretudo, as suas propriedades físico-químicas que conferem baixa volatilidade, alto potencial de lixiviação, alta solubilidade e alta mobilidade nos solos (HENN *et al.*, 2020).

Estratégias de biorremediação têm sido desenvolvidas para eliminar diferentes poluentes ambientais, como os herbicidas, e recuperar ecossistemas aquáticos e terrestres severamente degradados (SOARES *et al.*, 2011). Os fungos, especialmente os fungos conhecidos como de podridão-branca (filo Basidiomycota) são exímios para biorremediação de solo contaminado com ATZ (SISTA KAMESHWAR; QIN, 2018). Além da ausência de contaminantes, um solo saudável, que pode resultar no aumento e

qualidade da produtividade agrícola, precisa ser livres de fitopatógenos e com recursos nutricionais disponíveis. Nesse sentido, os fungos além de degradar a ATZ podem ser considerados como uma excelente estratégia para o controle biológico e na reciclagem de nutrientes.

A eficiência da biorremediação pode ser aumentada através da adição de condicionadores específicos ao solo, como é o caso do carvão ativado, ou também chamado de biochar, um bio-estimulante para a atividade microbiológica que compõe o solo (FARIA, 2017). O carvão ativado é proveniente de resíduos biológicos carbonizados sob baixas condições de O<sub>2</sub> e o resultado é um material poroso e rico em carbono (BEESLEY *et al.*, 2011). A adição do carvão ativado no solo proporciona diversos benefícios como o aumento da atividade microbiológica, aumento da retenção de poluentes, liberação de nutrientes (GREGORY *et al.*, 2015), maior aeração e porosidade (FARIA, 2017).

Aliar as características do carvão ativado com os benefícios proporcionado pelos fungos filamentosos com potencial biotecnológico, visando a biorremediação do solo agrícola, é uma estratégia promissora para a produção de um inoculante fúngico. Inoculante é um insumo biológico com micro-organismos capazes de desempenhar atividades benéficas e necessárias para o desenvolvimento das plantas (OWEN *et al.*, 2015). A utilização de inoculante a base de fungos na agricultura é a opção com o melhor custo-benefício para a sustentabilidade do plantio, tanto a longo quanto em curto prazo (DE SOUZA; SCHLEMPER; STÜRMER, 2017). O objetivo desse trabalho foi à produção de um inoculante a base de fungos filamentosos com potencial biotecnológico, visando a biorremediação do solo de forma eficiente para aplicação em cultivos agrícolas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O solo e a agricultura

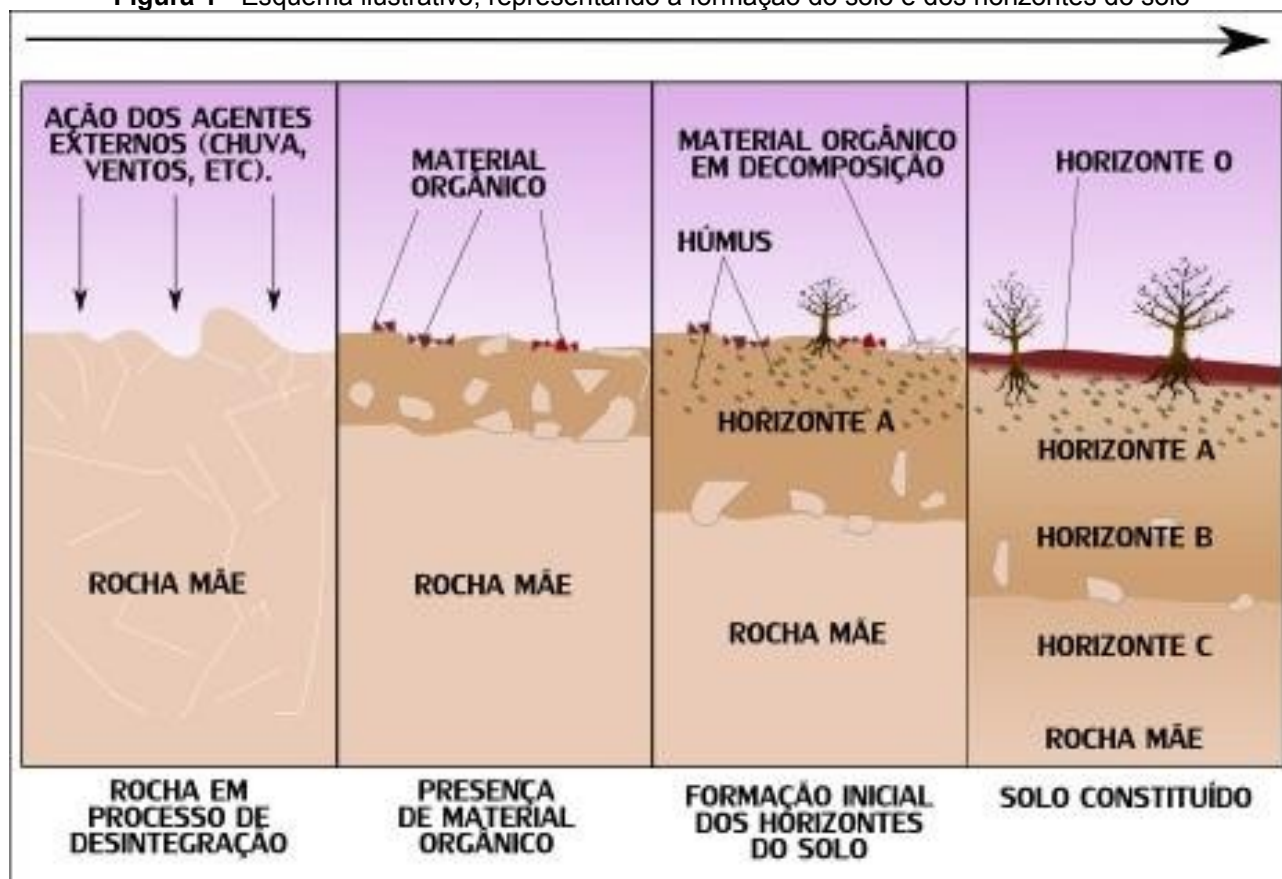
O solo é um sistema natural composto por minerais, matéria orgânica, organismos vivos, gás e água (NEEDELMAN, 20113). No solo acontece uma série de processos químicos, físicos e biológicos que são essenciais e vitais para todo o ecossistema. Nesses processos, os micro-organismos que compõe o solo são os principais condutores de nutrientes para as plantas, auxiliando na degradação da matéria orgânica, na clivagem para obtenção de nutrientes e também no sequestro e retenção de carbono. Sendo uma das principais funções do solo o transporte e armazenamento de água e gases (SOUTY-GROSSET; FABERI, 2018).

Machado, (2005) enfatiza que o maior compartimento de carbono ( $\text{CO}_2$ ) no ecossistema terrestre está presente no solo, contendo mais do que o dobro da quantidade de  $\text{CO}_2$  armazenado nos demais reservatórios como oceano e atmosfera. Fatores ambientais e fatores antrópicos, como a mudança climática, o desmatamento e a produção agrícola, interferem no processo de sequestro de  $\text{CO}_2$  pelo solo. O sequestro de  $\text{CO}_2$  e demais gases traços, ou também chamados de gases de efeito estufa, tem uma enorme importância para o equilíbrio do ecossistema, pois esses gases são radiativos e aumentam o “efeito estufa” (BATJES, 1996). De acordo com Resende *et al.*, (2015), os efeitos de erosão, decomposição, volatilização e lixiviação causam as maiores perdas de carbono no solo, entretanto os efeitos de humificação, agregação e sedimentação são os principais responsáveis pelo sequestro do carbono no solo. Outros estudos apontam que a biodiversidade do solo tem a capacidade de modificar os processos, tanto de entrada, como o de perda de carbono orgânico. Quando há uma elevada biodiversidade de micro-organismos no solo, há uma redução na perda de  $\text{CO}_2$  pelo solo, isso ocorre através da decomposição orgânica elevando a retenção de  $\text{CO}_2$  (CHEN *et al.*, 2018).

A formação do solo (Figura 1) ocorre de forma dinâmica e tridimensional. Os principais fatores que influenciam na sua formação são o material original, o clima, a matéria orgânica, a topografia e o tempo (EMBRAPA, 2006). A estrutura do solo é dividida em camadas, denominadas horizontes, localizados paralelos à superfície do solo. Essas camadas ou horizontes se diferenciam do material original ao longo dos anos como resultado da perda, da adição, da translocação e da transformação de matéria. Sendo os

horizontes o reflexo do intemperismo do substrato das rochas ou sedimentos de diversas naturezas (HUMBERTO GONÇALVES DOS SANTOS *et al.*, 2018).

**Figura 1** - Esquema ilustrativo, representando a formação do solo e dos horizontes do solo



Fonte: Pena, 2021.

A denominação da divisão dos horizontes, observado na figura 1, ocorre por meio das letras O, A, B, C e R. O horizonte O, é a camada superficial onde se encontram boas condições de drenagens (presente em áreas florestais e ausentes em áreas de pastagens); o horizonte A, é o horizonte mineral superficial ou abaixo do horizonte O, nele obtém-se uma grande atividade biológica e agrupamento da matéria orgânica bastante mineralizada, esta camada do solo possui maior interesse aos cultivos agrícolas; o horizonte B é camada mineral que se encontra abaixo do horizonte A, a origem do horizonte B ocorre através da decomposição do material original, contendo também argila, ou material orgânico dos horizontes acima, encontra-se protegido de variações superficiais e antrópicas; O horizonte C é uma camada mineral pouco afetado pelos processos pedogênicos (processo de formação dos solos), localizado abaixo dos horizontes A e B, é composto por resíduos da alteração primitiva das rochas de origem; O

horizonte R, é a camada consolidada de material mineral, é a rocha mãe (HOPPE; SCHUMACHER, 1997).

As rochas e os sedimentos são os materiais originais que darão origem ao solo, e o primeiro fator que deve ser considerado para a composição dos solos. As rochas influenciam nos atributos de composições químicas e minerais, também cor e textura do solo. Os sedimentos se formam através da intemperização das rochas e de processos erosivos, geralmente transportada e depositada no solo ao longo da paisagem (TULLIO, 2019). Por fim, a influência do tempo determina os processos de formação do solo e suas características de forma gradual, formando um solo “maduro” após muitos anos (HILLEL, 2008).

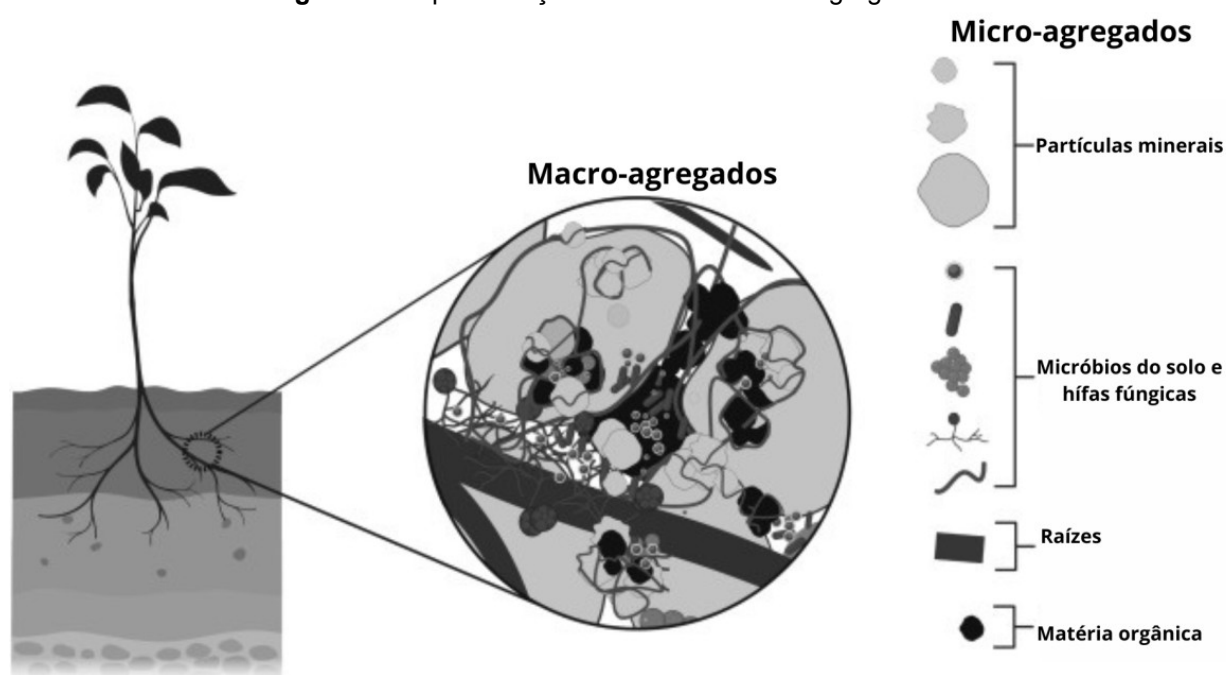
As características do solo influenciam no crescimento e repartição da vegetação em distintas áreas dos trópicos (MARTINS *et al.*, 2015). Um manto sob o solo, formado por restos de plantas mortas, como as folhas, os galhos e os troncos, denomina-se serapilheira, geralmente encontrado em abundância em solos florestais, sendo a principal fonte de retorno de nutrientes ao solo, especialmente em solos pobres de nutrientes, pois a serapilheira é uma rica fonte de micro-organismos que fornecem os nutrientes para esses locais (PIRES, 2006). O índice de qualidade dos nutrientes decompostos na serapilheira varia de acordo com o clima, relevo, umidade do ar, tipo de solo, entre outros (FREITAS *et al.*, 2015). Pothula *et al.*, (2019) demonstrou que solos florestais, os quais não tem interferência de ações antropogênicas, possuem uma ampla riqueza de micro-organismos benéficos para a saúde do solo, diferentemente de solos agrícolas, os quais são perturbados pelas ações antrópicas. Outros estudos apontam que a serapilheira tem uma enorme importância na retenção de carbono, mas principalmente elevadas taxas de nitrogênio (GUO *et al.*, 2016; SHENG *et al.*, 2019).

A distribuição espacial dos micro-organismos presentes no solo varia de acordo com questões nutricionais e questões químicas-físicas do solo, porém sabe-se que a grande atividade biológica está presente entre 0 a 20 cm de profundidade, juntamente onde concentra-se a maior parte de matéria orgânica (FRANCISCO; QUEIROZ, 2018). A agregação de fragmentos minerais do solo (argila, areia, entre outros) e a matéria orgânica, formam micro e macro-agregados (SESSITSCH *et al.*, 2001), e a composição da maioria dos solos são por micro agregados os quais os micro-organismos ocupam sítios especializados, formando comunidades complexas (WILPISZESKI *et al.*, 2019).

A formação do solo possuiu espaços com poros, matéria orgânica e mineral, a figura 2 representa a formação de agregação do solo, formada por segmentos maiores

(agregados) a partir de estruturas menores (argila, silte), que se agregam devido a interação entre os minerais, a água e especialmente os micro-organismos (TOMA; BOAS; MOREIR, 2017), os micróbios e as hifas fúngicas também participam da formação da agregação, através da secreção de substâncias que são importantes para a união das partículas, quanto mais estável for o agregado menor será a difusão de O<sub>2</sub> através dos micro poros, como consequência a biodegradação aeróbica (BERTINI; AZEVEDO, 2022).

**Figura 2** - Representação dos micro e macro-agregados do solo



**Fonte:** Adaptado de (BERTINI; AZEVEDO, 2022).

Existe uma ampla variedade de micro-organismos, tanto abaixo do solo quanto acima, colonizando as plantas. Os micro-organismos que colonizam o solo próximo às raízes das plantas, são categorizados como rizosféricos. O termo rizosfera compreende uma pequena região do solo ao redor das raízes que são influenciadas pelos organismos vivos e secreções radiculares (VISHWAKARMA *et al.*, 2020). A rizosfera causa um grande impacto no crescimento das plantas, através da sua dinâmica nutricional, sendo a chave para o aumento do desenvolvimento das plantas e o funcionamento do ecossistema. (PHILIPPOT *et al.*, 2013).

Para um solo saudável, é necessário que tenha uma rica biodiversidade, ou seja, várias espécies de micro-organismos vivendo no local. Compreende-se por ser um solo saudável, aquele onde a planta consiga crescer e produzir, sem doenças, pragas ou sem

a necessidade de uso de defensivos químicos para sobreviver, florescer ou produzir (Qi *et al.*, 2019). Recursos como oxigênio e nitrogênio no solo, também são importantes para um solo saudável (CORREA *et al.*, 2019).

A agricultura envolve plantação, criação de animais e o cultivo da terra para oferecer fibras, alimentos e medicamentos. Ela também fornece outros produtos necessários para melhorar a vida e o sustento. Os solos agrícolas ocupam cerca de 37% da superfície da Terra (NRIAGU, 2019) A agricultura é classificada com base no tipo de cultura cultivada, escala de cultivo, intensidade, nível de mecanização, combinações de gado e também como a produção agrícola é distribuída. A agricultura industrializada ou plantações comerciais cobrem grandes áreas de terra. Mesmo se praticada em um terreno menor, a atividade tem alto valor comercial, envolvendo o cultivo de safras tropicais como chá, borracha, café, coco, cacau, uva, maçã, especiarias, laranja, abacate, manga, grãos e óleos. As regiões tropicais com densas populações e alta pluviosidade são as áreas onde se pratica a agricultura de subsistência intensiva, como arroz, trigo, feijão e outros grãos (GCSE, 2008). A ciência do solo agrícola estuda a composição química, física, biológica e mineralógica dos solos em sua relação com a agricultura. Cientistas de solo agrícola desenvolvem métodos que irão melhorar o uso do solo e aumentar a produção de safras de alimentos e fibras. Eles conduzem pesquisas em irrigação e drenagem, cultivo, classificação de solo, nutrição de plantas, fertilidade do solo e outras áreas.

A definição de qualidade do solo foi descrita pela primeira vez por Doran & Parkin, (1994) sendo a habilidade de o solo trabalhar dentro dos seus limites naturais do ecossistema e de amparar a fertilidade da planta enquanto restringe a degradação do solo. Entre os fatores biológicos, físicos e químicos existe um conjunto de elementos para definir o índice de qualidade do solo, conhecidos pela sigla IQS (Indicadores de Qualidade do Solo): textura do solo, profundidade (horizonte e da raiz da planta), densidade, permeabilidade e retenção da água, retenção de carbono e também da matéria orgânica, material original, temperatura do solo, conteúdo de carbono e nitrogênio orgânico total, pH do solo, condução de eletricidade, quantificação de minerais que compõe o solo, biomassa microbiana e também em relação ao carbono total, respiração do solo. Esses indicadores devem ser correlacionados com as funções do solo: capacidade regulatória de retenção do fluxo de água e, de elementos químicos; promover e manter o desenvolvimento das raízes das plantas; sustentar um ambiente biológico apropriado; e

responder ao manejo, combatendo à degradação do solo (UKALSKA-JARUGA; SMRECZAK; SIEBIELEC, 2020).

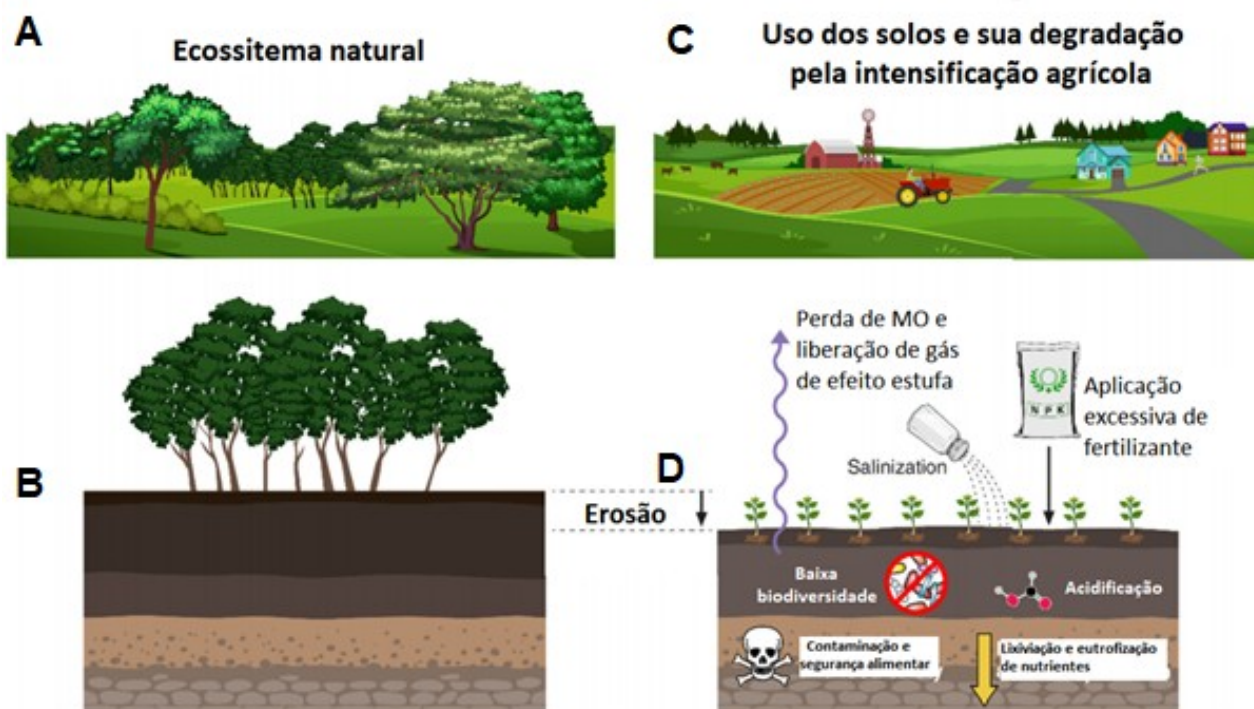
Para um desenvolvimento ideal do plantio, o solo deve conter 45% de minerais, 5% de elementos orgânicos, 25% de gases e 25% de líquido, além dessas percentagens, o solo deve conseguir suprimentos necessários para dispor os nutrientes às plantas, não pode conter agentes tóxicos em excesso e também ter uma boa porosidade, para facilitar o movimento da água do ar, e a respiração das raízes, sendo também a atividade biótica importante, e por fim uma boa drenagem (GIONGO; CUNHA, 2010).

## **2.2 Práticas agrícolas e seus impactos**

O crescimento global está causando grandes mudanças no meio ambiente, principalmente na agricultura, onde o uso excessivo de pesticidas químicos esta ocasionando uma grande pressão no ecossistema (BITTENCOURT, 2010). Os organismos responsáveis pela decomposição da matéria orgânica das plantas são muito sensíveis aos defensivos químicos, contendo metais pesados e demais agentes químicos, mas também são sensíveis aos excessos de nutrientes, como o nitrogênio, que são liberados pelas agroindústrias. Assim, a grande exposição desses decompositores aos agentes químicos, altera a biodiversidade do solo. (BEAUMELLE; DE LAENDER; EISENHAUER, 2020).

A interferência humana no manejo do solo, principalmente na produção agrícola, está alterando de forma negativa a capacidade dos solos exercerem suas funções dentro do ecossistema (Figura 3) (KOPITTKE *et al.*, 2019). De acordo com os dados apresentados pelo ELD Initiative, (2015) (ELD é uma iniciativa global que visa aumentar a conscientização sobre os benefícios da gestão sustentável da terra e as consequências econômicas da degradação da terra), 44% dos cultivos globais localizam-se em terras áridas, e 52% das terras agrícolas são afetadas de forma moderada ou severamente. Em um estudo feito por 600 pesquisadores de 60 países diferentes mostrou que 30% das terras em todo o mundo estão degradadas, e essa degradação ocorre através da exploração por parte do ser humano e também pelas mudanças climáticas (DIAS, 2017). A principal forma de degradação do solo no Brasil ocorre pela erosão hídrica, tendo como consequências perda de água, de matéria orgânica e nutrientes no solo, e aumento dos custos tanto para o produtor quanto para o consumidor final (DECHEN *et al.*, 2015).

**Figura 3** - Impacto causado por intensificação do manejo agrícola nos solos



**Nota explicativa:** Ao lado direito as imagens **A** e **B**, com um ecossistema natural, sem interferências antrópicas. **2.A** apresentam-se árvores e plantas saudáveis e **2.B** apresenta-se o solo e seus horizontes também saudáveis. Ao lado direito observa-se as imagens **C** e **D**, apresentando o que ocorre quando há interferência da agricultura no solo: como aplicações excessivas de fertilizantes, onde há a diminuição da biodiversidade do solo, aumento a acidificação, perda de matéria orgânica e também liberação dos gases de efeito estufa, contaminando também a segurança alimentar através da redução da lixiviação e aumento da poluição de corpos d'água gerados pela eutrofização. A intensificação das práticas agrícolas está elevando a degradação do solo, através da perda de matéria orgânica. A excessiva aplicação de fertilizantes eleva a erosão, e a longo prazo, essa degradação resulta em sérios danos a todo meio ambiente e a saúde humana (KOPITKE *et al.*, 2019b).

**Fonte:** Adaptado de (KOPITKE *et al.*, 2019).

O estudo de Nie e colaboradores (2019) evidenciou que a erosão do solo causada pelo preparo da terra para a agricultura, leva a variações do estoque de carbono e também de nitrogênio. Diversos processos têm influência no ciclo do carbono, como por exemplo, a estrutura do solo e a organização física dos poros. A estrutura física e química do solo está em constante desenvolvimento, impulsionada por transformações como o clima e o manejo da terra (MEURER *et al.*, 2020).

Erosão hídrica é o escorrer de frações do solo através da água, como a chuva e o vento, onde o ideal seria essa água permear no solo e não escorrer por ele, arrastando-o como acontece na maioria de terras agrícolas (FERNANDO, 2020). Uma das principais ameaças ao solo é causada pela erosão e os principais fatores que geram a erosão do solo, são as mudanças climáticas e mau uso da terra. Existem vários processos distintos

que geram a erosão do solo, como as chuvas (erosão hídrica) e ventos (erosão eólica), sendo a hídrica a principal causa de erosão. A agricultura é um dos principais fatores de erosão hídrica, devido ao manejo da terra e uso de defensivos químicos (GUERRA *et al.*, 2020).

Por outro lado, o uso de pesticidas agrícolas tem uma grande importância no rendimento da colheita e também na economia mundial, correspondendo anualmente à aproximadamente três milhões de toneladas de agrotóxico utilizados em todo o mundo (PESHIN; DHAWAN, 2009). O aumento do uso dos pesticidas ocorreu após a Segunda Guerra Mundial, com objetivo de destruir e/ou evitar as pragas, e também reduzir as perdas dos rendimentos da colheita (TUDI *et al.*, 2021). Aproximadamente 1/3 de todo produto agrícola produzido, foi em função do uso de defensivos agrícolas. Entretanto, o uso desordenado e generalizado eleva as preocupações com o meio ambiente e com a saúde humana e animal. A contaminação do solo por defensivos químicos tem como principais preocupações o desempenho do solo, a biodiversidade do solo e a segurança do alimento (SILVA *et al.*, 2019).

Os efeitos causados pelo uso em excesso e desordenado de pesticidas, são prejudiciais para todo o ecossistema, pois causam toxicidade não apenas no solo, mas também às águas e ao ar. A aplicação dos pesticidas segue pela fotodegradação e absorção pela planta (através de suas folhas, caule ou frutos), ou pela sorção do solo, ao chegar ao solo ocorrem diversos processos de decomposição química e biológica. A absorção de resíduos de pesticidas ocorre através do xilema, chegando até as partes internas das plantas, gerando alguns efeitos venenosos ao solo e a planta, como alta produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), oxidação por estresse, prejuízos ao DNA, bloqueio fotossintético, necrose até a torção das folhas ocasionando a morte da planta (ALENGEBAWY *et al.*, 2021). Filimon (2015) demonstrou que os danos causados ao solo consistem na redução dos micro-organismos na terra, mudanças bioquímicas e também a diminuição da abundância da microbiota do solo. YANG (2019) mostrou que a agricultura e o uso de defensivos químicos, estão envolvidos na redução do carbono orgânico e na biomassa presente no solo, isso acontece através da aceleração da degradação de matéria orgânica, os quais dificultam a respiração.

O tratamento de solos agrícolas com agrotóxicos é preocupante, pois os danos que esses agentes químicos causam ao solo são prejudiciais tanto para a saúde humana quanto de todo o ecossistema, mesmo os pesticidas a base de glifosato, que são os menos nocivos ao meio ambiente, porém um dos mais utilizados no mundo podem causar

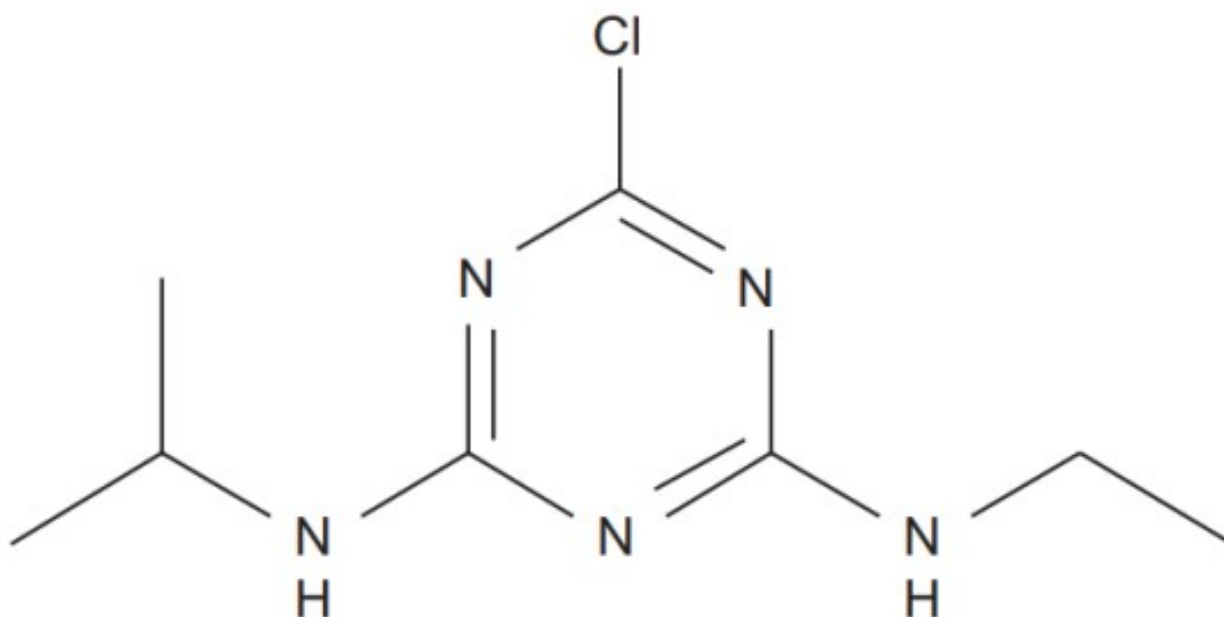
danos de longo prazo, tanto ao solo quanto à microbiota e rizosfera (SCHLATTER *et al.*, 2017). Sabatier e colaboradores (2014) analisaram que resíduos de agrotóxicos provocam alterações de armazenamento do solo, causando a liberação de outro pesticida remanescente, como o diclorodifeniltricloroetano (DDT). Análises feitas por Cadwalader e colaboradores (2012), mostraram que mesmo após 50 anos sem o uso de pesticidas à base de arseniato de chumbo em solo da cidade de Bedford nos Estados Unidos resíduos foram encontrados em riachos próximos, como consequências de um solo com alta erosão, elevando o transporte de sedimentos mesmo anos depois.

Um solo de qualidade, defini a sua capacidade de degradar e desintoxicar agentes químicos, uma vez que o fatores como pH do solo, microbiota, matéria orgânica tempo de retenção do agrotóxico e o clima, são importantes para o solo conseguir decompor esses pesticidas (ERGUVEN; DEMIRCI, 2020; TUDI *et al.*, 2021).

Análises de Yale (2017) demonstrou que um solo tratado uma ou duas vezes apenas pelo herbicida atrazina, possui uma degradação acelerada comparado com solos tratados mais de duas vezes com o mesmo herbicida, indicando que há retenção desse composto químico pelo solo, com a redução do pH do solo, causando sua difícil degradação. Solos não tratados com o herbicida, porém com pH baixo demonstraram também a não degradação do herbicida. (SYAFRUDIN *et al.*, 2021).

### 2.2.1 Atrazina

Atrazina (2-cloro-4-etilenodiamino-6-isopropilamino-striazina) (figura 4) é um herbicida triazínico, classificado pela União Internacional de Química Pura e Aplicada – IUPAC: 6-chloro-4-N-ethyl-2-N-propan-2-yl-1,3,5-triazine-2,4-diamine (JAVARONI; LANDGRAF; REZENDE, 1999), abreviado como ATZ, de aspecto sólido e pulveroso, aparenta ser coberto por um pó branco, instável em lugares com altas temperaturas e de fácil solubilidade (32 mg/L) em solventes orgânicos (HE *et al.*, 2019). Sua composição é polar e fracamente básica, possui um anel heterocíclico correspondente à sua estabilidade. Podendo ser solúvel em alguns solventes orgânicos como acetona, éter, clorofórmio, benzeno, acetato de etila e etanol (TOLLER, 2019).

**Figura 4** - Molécula de atrazina ( $C_8H_{14}ClN_5$ )

Fonte: Adaptado de (HANSEN *et al.*, 2013).

O uso do herbicida atrazina foi introduzido na década de 50, e se tornou o mais utilizado mundialmente, porém nos anos 90 alguns países da Europa restringiram severamente o uso desse herbicida devido à sua alta contaminação na água, em 2004 a ATZ foi definitivamente proibido em toda Europa (JABLONOWSKI; SCHÄFFER; BURAUDEL, 2011). Dentre os defensivos químicos (inseticidas, herbicidas e fungicidas) os herbicidas são os mais comercializados no Brasil (SINDIVEG, 2020). Os herbicidas podem ser produzidos por agentes biológicos como fungos ou serem compostos químicos, e a função dos herbicidas é reduzir ou eliminar espécies específicas, por exemplo, ervas daninhas. Um herbicida eficaz precisa ser detido pelas folhas, adentrar e transpor a cutícula, conseguir se movimentar ao redor das células, adentrar e ultrapassar a membrana celular, atingir o sítio de ação (o qual normalmente são enzimas), para se ligar a enzima e ocasionar a inibição da mesma. A classificação dos herbicidas ocorre através do seu mecanismo de ação, a ATZ faz parte do grupo 5 pois tem como princípio ativo a inibição do fotossistema (PS) II (ROMAN *et al.*, 2005) sendo um produto altamente tóxico para algas e outros animais como peixes e sapos, também persistente no meio ambiente (GARDEN *et al.*, 2018).

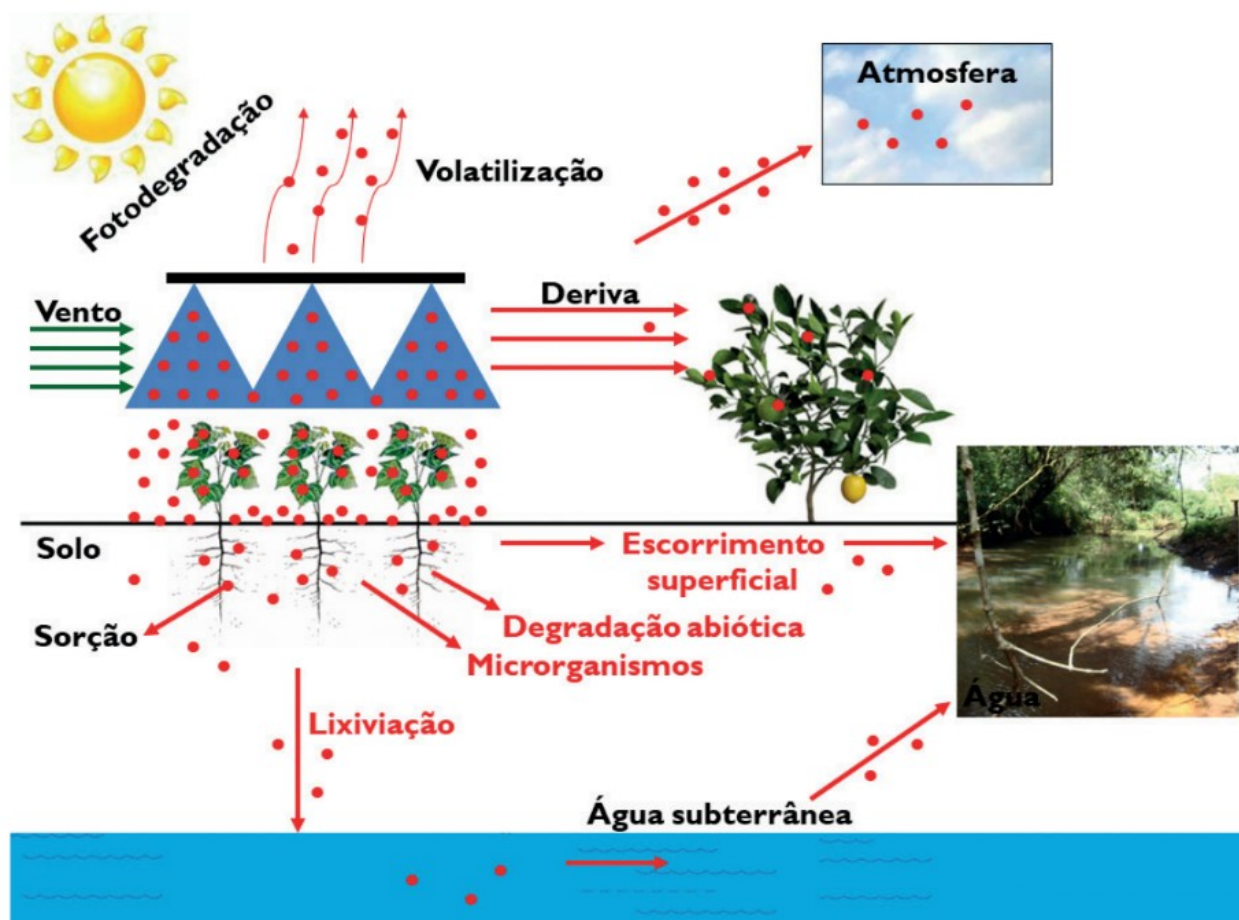
O fotossistema II é importante durante a fotossíntese, pois envolve as enzimas e processos responsáveis pela transferência de elétrons da água para a forma reduzida de oxidação (NADPH) gerando trifosfato de adenosina (ATP) (MÜH; ZOUNI, 2020). Isso

ocorre através da absorção de luz pelas clorofilas, que estão contidas nas membranas tilacoides dos cloroplastos e essas membranas possuem dois diferentes tipos de fotossistema (I e II). O PS II é um sistema feofitina-quinona, quando esse sistema é excitado, elétrons são impulsionados e oxidam  $H_2O$  em  $NADP^+$  produzindo  $O_2$ , a denominação desse processo é chamado de fotossíntese oxigenada (NELSON; COX, 2014). Os herbicidas de triazina se ligam a proteína D1, contida na membrana dos tilacoides, mudando a plastoquinona de posição, ocasionando na inibição de ATP e NADPH (WILKINSON *et al.*, 2015), impedindo a fotossíntese e levando a planta a morte.

Os principais danos causados pela ATZ para os animais estão relacionados com a toxicidade e desregulação endócrina. Foi demonstrado por Walker; Kramer; Lassiter, (2018) que a desregulação endócrina em peixes zebra expostos a diferentes concentrações de ATZ, levou a diminuição da sobrevivência, aumento dos batimentos cardíacos, retardo das vértebras e deficiência craniofacial. Estudos de Chen; Song; Zhang, (2013), em camundongos machos, foi visto que a exposição à ATZ inibiu a imunidade desses camundongos, tanto na via celular quanto na via humoral, com altas liberações de citocinas IL-4, IFN- $\gamma$  e NO (IL-4 e IFN- $\gamma$  são citocinas pró-inflamatórias e o NO (óxido nítrico) é um radical livre gasoso). Em outro estudo, esse conduzido por, Hayes *et al.*, (2010), em sapos machos africanos demonstrou que a ATZ mesmo em baixas concentrações, pode feminizar sapos, apresentando a desregulação hormonal. Além desses estudos demonstrados em animais, Sanderson *et al.*, (2000) descobriram que a ATZ também está envolvida na desregulação hormonal em seres humanos, elevando as transcrições de CYP19 (enzima aromatase).

Uma das características da ATZ é sua facilidade de se movimentar pelo solo com uma frequente detecção em águas superficiais, podendo alcançar os lençóis freáticos com uma concentração tóxica muito acima dos limites permitidos (JABLONOWSKI; SCHÄFFER; BURAUDEL, 2011). Existem três processos que acontecem com o herbicida após seu despejo no solo, e podem ser observados na figura 5, onde os pontos vermelhos representam o herbicida: o herbicida pode ser desviado do alvo, sendo transportado através da deriva, da volatilização, da lixiviação e ou do escoamento superficial; outro processo é a transformação do herbicida, podendo ser transformação química, microbiológica ou através da fotodegradação, em todos esses meios ocorre à degradação do herbicida e seu resultado são  $CO_2$ ,  $H_2O$ ,  $NH_3$  e outros íons inorgânicos no solo; e por fim, o herbicida pode ficar retido no solo e não estar disponível no meio líquido para ser absorvido pelas plantas (alvo ou não) (SOUZA, 1982), mantendo sua estrutura.

Figura 5 - Esquema ilustrativo da dinâmica dos defensivos químicos no sistema: solo-água-atmosfera



Fonte: Souza, 1982.

Outras características da ATZ são a baixa solubilidade em água e baixo coeficiente de partição de sorção do solo (SENE *et al.*, 2010), ocasionando na longa retenção de sedimentos de ATZ pelo solo (BARCHANSKA *et al.*, 2017). Estudos de Barchanska *et al.*, (2017); Lin *et al.*, (2018); Radosevich; Traina; Tuovinen, (1995); e Souza, (1982) demonstram a importância da degradação da ATZ do meio ambiente e, principalmente a importância para esse processo.

Métodos utilizados visando remover ou reduzir os resíduos de ATZ do meio ambiente são estudados e desenvolvidos. Esses métodos podem ser físico-químico, baseado no efeito de adsorção e geralmente é utilizado o carvão ativado, métodos químicos, que normalmente utilizam-se compostos fortemente oxidativos para degradação, método biológico, que se utilizam micro-organismos como bactérias e fungos para a biotransformação do herbicida atrazina, e por fim, várias tecnologias combinada material-célula também estão sendo desenvolvidas (HE *et al.*, 2019).

### 2.2.2 Biorremediação

De acordo com a ONU, (2019) a população mundial pode chegar até quase 10 bilhões de habitantes em 2050, e com o aumento populacional também aumenta a demanda por alimentos e a poluição ambiental, gerando uma interferência de forma negativa na vida do homem e dos animais. Para reduzir os danos ao meio ambiente, medidas precisam ser tomadas e os métodos ecológicos como as tecnologias biológicas, estão entre as principais estratégias, como a biorremediação, uma medida ecológica, muito eficiente e de baixo custo (OJUEDERIE; BABALOLA, 2017). A biorremediação é uma tecnologia segura e sustentável para reparo de locais poluídos (MEGHARAJ; NAIDU, 2017).

A biorremediação é caracterizada pela utilização de micro-organismos e suas enzimas, para a remoção (degradação, desintoxicação, mineralização ou transformação) de poluentes do ambiente. Usualmente estão envolvidos os componentes da respiração e adaptação, mas também é frequente o uso de componentes do ciclo de carbono e do ciclo redox de metais (KRZMARZICK *et al.*, 2018). Para o processo de degradação por biorremediação, algumas variáveis devem ser consideradas, como por exemplo, a natureza do poluente, o local de aplicação, profundidade, políticas ambientais, entre outros (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016).

Existem dois tipos de biorremediação, *in situ* (requer preparo e manejo do solo) e *ex situ* que requer a retirada do material para ser tratado em outro lugar (KAPLEY; PUROHIT, 2009; ZHANG; WU; REN, 2020). As técnicas *in situ*, geralmente, são mais utilizadas quando comparado com as técnicas *ex situ*, pois a biorremediação no local evita que, ao transferir o material contaminado, esse material não contamine outros lugares, e também diminui o custo com técnicas *in situ*, pois não há necessidade de escavação e transporte (SHARMA *et al.*, 2018).

Uma classificação de micro-organismos envolvidos nos processos de biorremediação foi proposta por Vidali (2001) onde podemos citar microrganismos aeróbicos que utilizam oxigênio para a biodegradação, destacando microrganismos aeróbicos; bactérias anaeróbicas que promovem a degradação na ausência de oxigênio; fungos ligninolíticos, como por exemplo, os fungos de podridão branca, esses conseguem promover a degradação de uma extensa variedade de poluentes resistentes ou tóxicos; e micro-organismos metilotróficos, que são bactérias aeróbicas que crescem convertendo metano para obtenção de carbono e energia.

A escolha do microrganismo certo é muito importante para a biorremediação, ou seja, bactérias ou fungos que possuem a fisiologia ideal e o metabolismo ideal para degradar o contaminante, e que os produtos finais sejam inócuos (JUWARKAR; SINGH; MUDHOO, 2010). De acordo com Dzionek; Wojcieszynska; Guzik, (2016), a taxa de biodegradação a partir de micro-organismos depende do seu estado fisiológico, pois são sensíveis aos fatores ambientais, e uma das formas de melhorar a resistência desses organismos é utilizando técnicas de imobilização como adsorção, vinculado em uma superfície, floculação, aprisionamento e encapsulamento.

Um grande número de poluentes, tanto derivados de fontes industriais ou resíduos de agrotóxicos, tem sido detectado em solos agrícolas. Genchi, G, Carocci, A, (2020) demonstraram que o cádmio presente no solo tem uma meia vida de 25-30 anos e se acumula nas plantas, e a ingestão de plantas contaminadas por cádmio pode causar diversos tipos de câncer. Outro estudo feito por Chen *et al.*, (2019) apontou 32 locais no leste Chinês, com presenças de metais pesados no solo agrícola. São diversos os tipos de poluentes encontrados no solo, como plásticos (WANNER, 2021), agrotóxicos como o diclorodifeniltricloroetano (DDT) (MALUSÁ *et al.*, 2020) e petróleo (ZHANG; WU; REN, 2020).

A contaminação por esses agentes químicos no meio ambiente gera sérias preocupações, tornando-se essencial a sua descontaminação. Inúmeras técnicas de biodegradação são utilizadas para esse fim, sendo as principais: biodegradação bacteriana, biodegradação fúngica e biodegradação enzimática (JAVAID; ASHIQ; TAHIR, 2016). Em nosso planeta existe uma abundância de fungos e, várias espécies ainda não foram identificadas. Os fungos compõem aproximadamente 75% do micro-organismos presente no solo, e possuem uma facilidade para se adaptar em vários tipos de ambientes, por isso são muito promissores em estratégias de biorremediação, pois possuem características ecológicas únicas (OSTREM LOSS; YU, 2018).

### 2.2.3 Biodegradação fúngica

Os fungos possuem uma grande importância e contribuição para o desenvolvimento do ecossistema, decompondo a matéria orgânica para a obtenção de nutrientes (DIGHTON, 2003). Estudos com fungos estão sendo muito promissores na biodegradação, alguns grupos fúngicos possuem em sua parede celular diversos grupos funcionais que lhe conferem alta capacidade de bioabsorção (DHANKHAR; HOODA, 2011),

enquanto outros são excelentes biodegradadores. Outras características dos fungos são o fácil crescimento em ambientes poluídos, facilmente cultivados e manipulados em laboratórios, e a grande maioria dos fungos não são patológicos (ZAPANA-HUARACHE *et al.*, 2020).

Alguns fungos do filo Basidiomycota, conhecidos como fungos de podridão branca, conseguem degradar moléculas complexas por meio de dois sistemas enzimáticos, sendo um extracelular, o qual envolve enzimas ligninolíticas, e outro intracelular, que envolve o sistema do citocromo P-450 monoxigenase e epóxido hidrolase (SISTA KAMESHWAR; QIN, 2018). Os fungos de podridão branca são assim categorizados por decompor a madeira, sendo os únicos que conseguem degradar a lignina (polímero pertencente à parede vegetal) e polissacarídeos na biomassa vegetal. A especialização dos fungos de podridão branca é a degradação de compostos aromáticos, e isso lhes confere um aspecto branco que é característico da madeira que está em decomposição (SISTA KAMESHWAR; QIN, 2018).

Camacho Morales *et al.*, (2017) demonstraram através da avaliação de seis linhagens de três espécies de fungos de podridão branca *Polyporus tricholoma*, *Cilindrobasidium laeve* e *Deconica citrispora* a degradação do herbicida Paraquat com níveis de 32, 26, 47%, respectivamente, no 12º dia de cultivo na presença do xenobiótico. Mougín *et al.*, (1994) utilizaram fungo de podridão branca *Phanerochaete chrysosporium* em estudo para a biotransformação da ATZ, e obtiveram 48% de redução do herbicida na fase de crescimento do micélio fúngico. Em um estudo realizado por Elgueta *et al.*, (2016), através de uma imobilização do fungo *Anthracoxyllum discolor*, os autores conseguiram observar a redução da meia-vida da atrazina. Recentemente o trabalho de Henn *et al.*, (2020), analisou a redução de ATZ por três linhagens de fungos do filo *Basidiomycota* *Pluteus cubensis* SXS320, *Gloelophyllum striatum* MCA7 e *Agaricales* MCA17 em meio de crescimento líquido, e observaram a degradação de atrazina por esses fungos em 30%, 37% e 38% respectivamente. Todos esses estudos demonstraram o grande potencial e importância da utilização de fungos para a biodegradação de herbicidas, como a atrazina, que é um herbicida de difícil degradação.

## 2.3 Inoculantes biológicos

### 2.3.1 Carvão ativado (Biochar)

Bioinoculante ou inoculante é um insumo biológico com microrganismos capazes de desempenhar atividades benéficas e necessárias para o desenvolvimento das plantas (SZYMAŃSKA *et al.*, 2021). O aumento do interesse na agricultura de baixo insumo nos últimos anos tem visto o crescente desenvolvimento e uso de inoculantes biológicos comerciais (bactérias e / ou fungos) para aumentar a mobilização de nutrientes essenciais, especialmente fósforo (P), e aumentar sua disponibilidade para as plantas de cultivo (OWEN *et al.*, 2015). Há muito uso intercambiável e confuso de termos como bioinoculante, biofertilizante e bio-amenizante na literatura. Owen e colaboradores (2014) propõem uma classificação hierárquica em que cada um é um grupo separado e exclusivo sob uma classificação generalizada de 'Bio-recursos'. Bio-recursos podem ser definidos como qualquer material orgânico aplicado ao solo para melhorar a qualidade do solo, o fornecimento de nutrientes e crescimento da planta. Em síntese: bio-amenizante são aditivos orgânicos brutos reciclados diretamente no solo, por exemplo, carvão ativado e podem conter micro-organismos estimulantes que fornecem um suprimento secundário de nutrientes; biofertilizantes são produtos que pode conter micro e macro nutrientes para plantas (fornecimento de nutrientes primários) ou componentes orgânicos específicos que, direta ou indiretamente, estimulam a atividade microbiana; e bioinoculantes são cepas individuais ou consórcios de micróbios adicionados para acelerar a decomposição microbiana e a liberação de nutrientes (OWEN *et al.*, 2015).

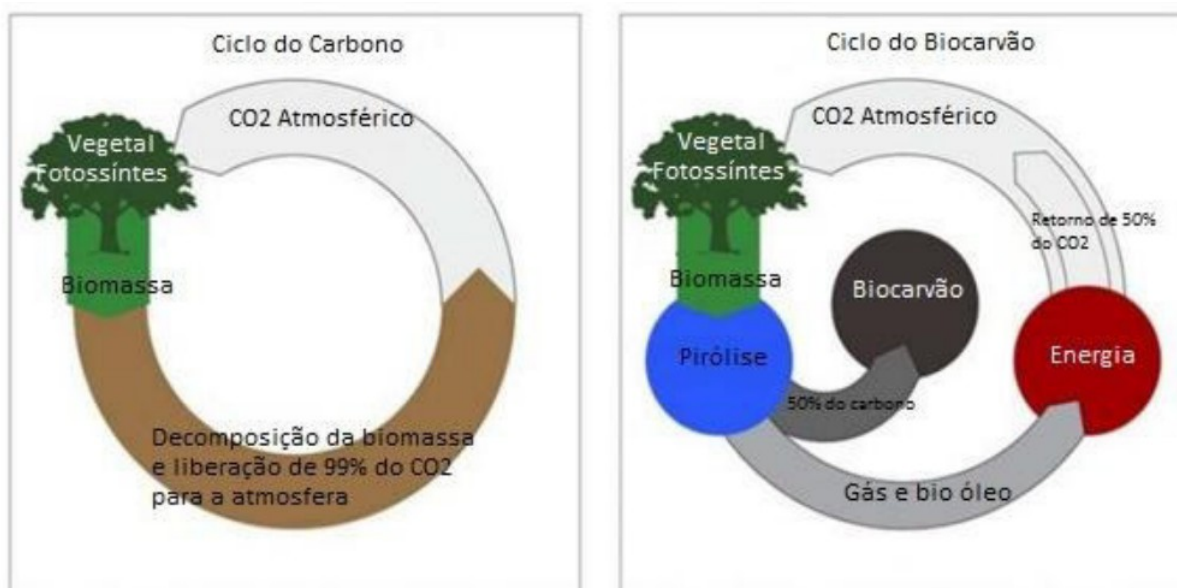
Visando melhorar a qualidade do solo o uso de condicionadores agregados ao solo melhora as características físico-químicas e biológicas, como é o caso do carvão ativado. O carvão ativado é obtido através da pirólise de diferentes compostos, que podem ser de matéria-prima animal ou vegetal em diferentes temperaturas (entre 450 °C e 700 °C) (FARIA, 2017b). A formação do carvão ativado envolve um rearranjo dos átomos de carbono que aumenta a porosidade do produto, aumentando a capacidade de trocas de cátions (CTC) e adsorção de nutrientes. Após adicionar o carvão ativado no solo, estudos mostram alterações como um aumento de pH, CTC e também de carbono orgânico e adsorção de herbicidas em sua superfície, entretanto, também diminuiu as perdas por lixiviação (TRAZZI *et al.*, 2018).

O carvão ativado como um subproduto valioso da pirólise da biomassa pode ser usado como bio-amenizante adicionado ao solo condicionando a correção do solo é considerada uma rota aplicável globalmente para lidar com a mudança climática e a degradação do solo por sequestro de carbono, reduzindo as emissões de gases de efeito estufa no solo e aumentando a retenção de nutrientes no solo (OWEN *et al.*, 2015).

Os solos agrícolas têm grande potencial para sequestrar C, melhorando a prática de gestão agrícola (Lal, 2004). No entanto, em longo prazo, na ausência de entradas de fertilizantes, o esgotamento dos nutrientes disponíveis pode limitar a formação de matéria orgânica estável (Kirkby *et al.*, 2011) e o acúmulo de C no solo (Lu *et al.*, 2011). A aplicação de C derivado de planta alóctone, geralmente na forma de composto ou carvão ativado, mostrou aumentar os estoques de C do solo em vários estudos (por exemplo, Sohi *et al.*, 2010). A alta área de superfície do carvão ativado poroso pode aumentar a capacidade de retenção de nutrientes do solo e pode prevenir a mineração de carbono orgânico do solo (SOC), bem como aumentar a entrada de serapilheira com C:N mais alto que irá favorecer o crescimento copiotrófico (organismo encontrado em ambientes ricos em nutrientes) e proteger os estoques de SOC (MACDONALD *et al.*, 2018) (Fig. 5).

A aplicação do carvão ativado no solo tem uma variedade de benefícios, podendo melhorar a taxa fotossintética da folha, agregando melhorias físico-químicas, com o acúmulo de gases do efeito estufa (HUANG *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2021), Na figura 6, ao lado esquerdo da imagem representa o Ciclo do Carbono natural, onde as plantas retiram da atmosfera o CO<sub>2</sub> para fotossíntese e ao morrerem e se decompor o CO<sub>2</sub> retorna para a atmosfera, já ao lado direito da figura 6 o esquema representa o Ciclo do Biocarvão, quando a biomassa é pirolisada e produz o biocarvão que retém 50% do carbono e a outra metade é transformada em produtos renováveis como gás e bio óleo antes de retornar para a atmosfera (INC., 2011).

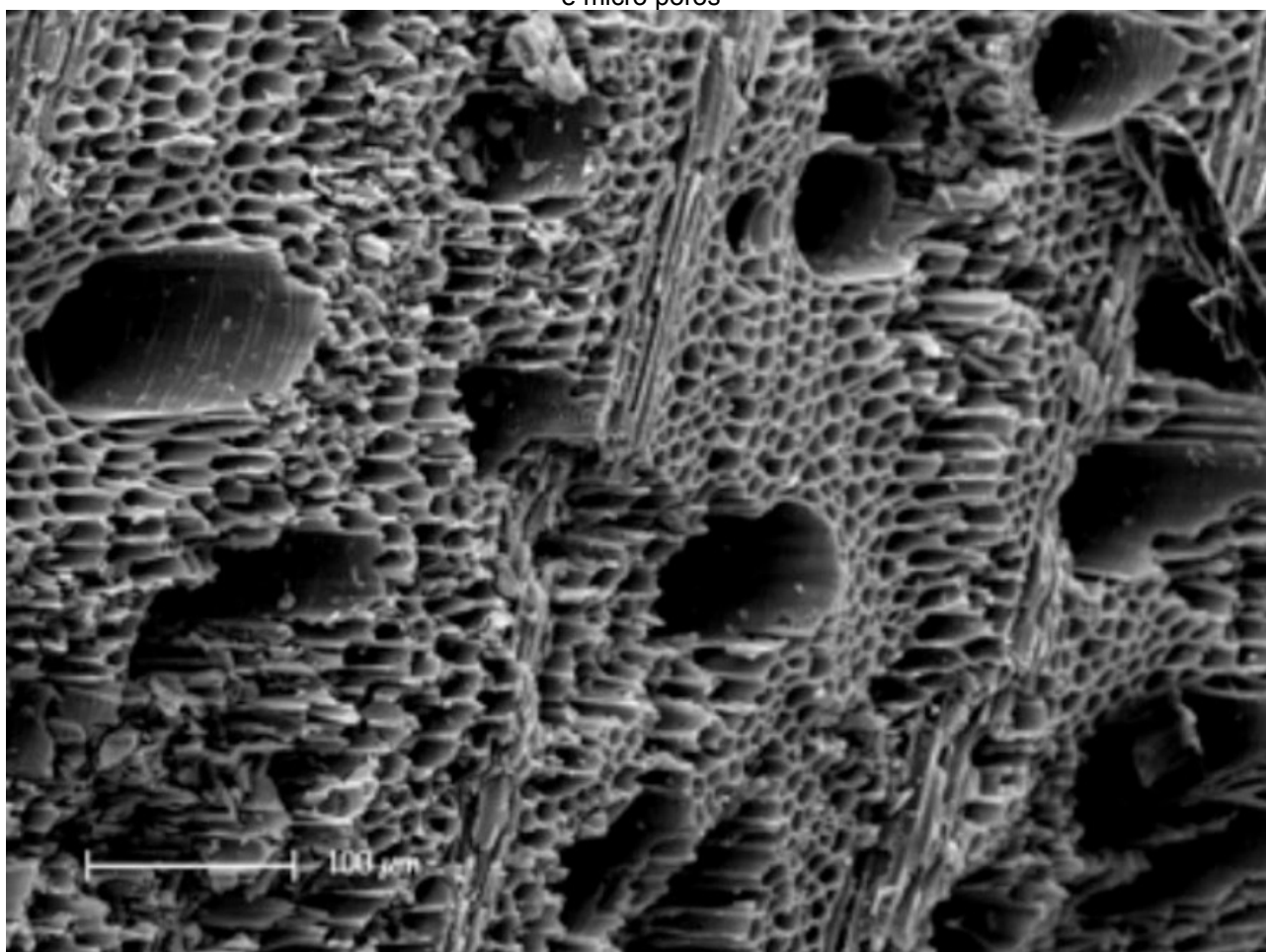
**Figura 6** - Figura representando o ciclo do carbono natural e quando o ciclo é transformado em biocarvão



Fonte: Adaptado de INC, 2011.

Em síntese, os maiores benefícios da utilização do carvão ativado nas terras agrícolas se deve ao fato do carvão ativado possuir uma estrutura porosa, como apresentado na figura 7, macro e micro poros de carvão ativado através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (o que aumenta a aeração e respiração do solo) e de sua grande área de superfície, o que favorece de forma que o carvão ativado consegue reter água e nutriente no solo, como uma esponja (JAMES, 2016). Essas características do carvão ativado também podem favorecer na inoculação de microrganismos.

**Figura 7** - Imagem de microscopia eletrônica do carvão ativado puro, apresentando sua porosidade, macro e micro poros

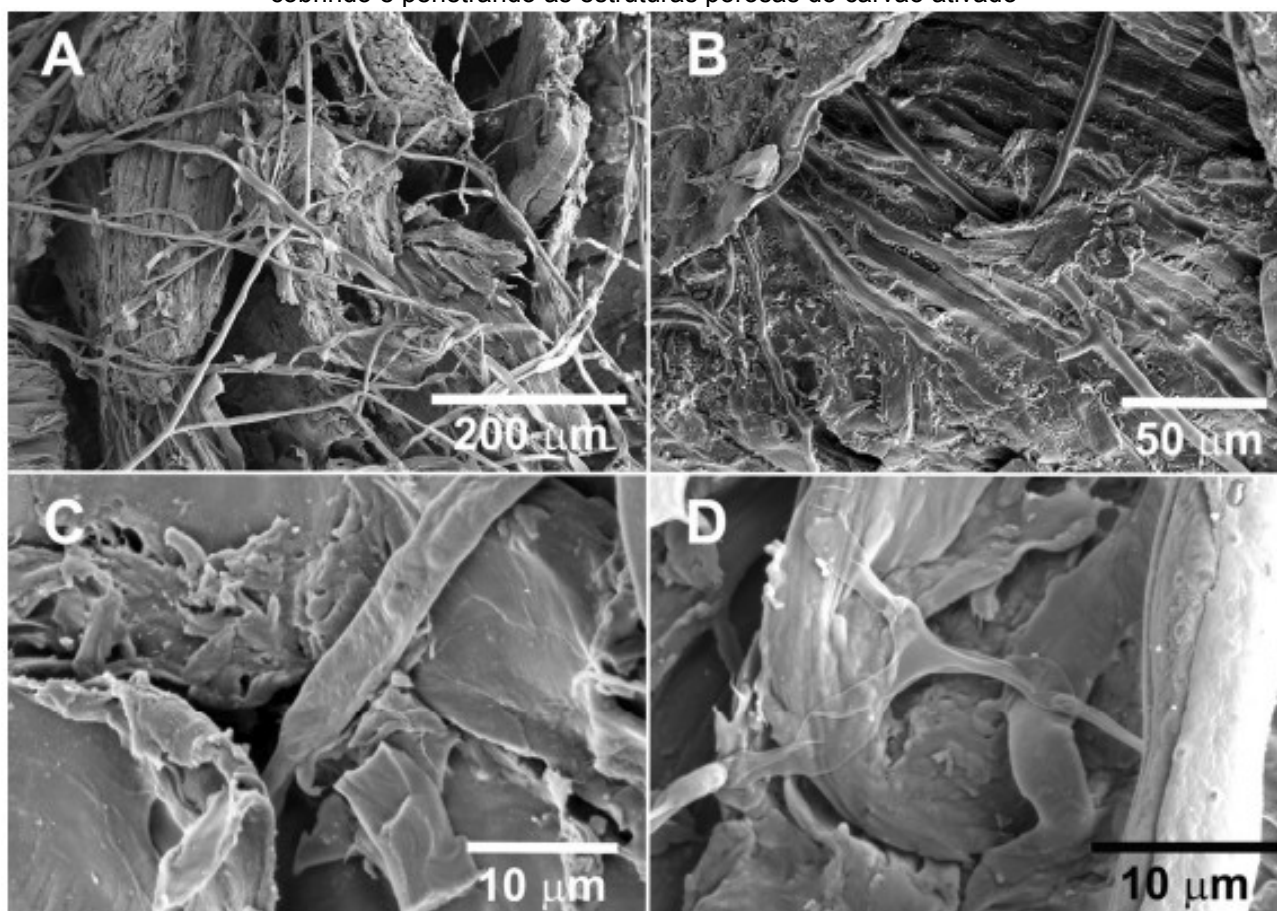


**Fonte:** Adaptado de James, 2016.

Existem vários materiais que são utilizados como suporte para fungos e bactérias em processos de biorremediação, como materiais não inertes, como por exemplo, o carvão ativado e resíduo lignocelulósicos. O carvão ativado utilizado como suporte para micro-organismos como fungos pode ser observado na figura 8 (A e B) hifas fúngica (estruturas finas e alongadas) pela superfície do carvão ativado e por dentro dos poros, (C

e D) adentrando e se fixando com força aos poros do carvão ativado (HAMMER *et al.*, 2014). O carvão ativado pode fornecer locais mais ativos para a adsorção de contaminantes, também proporciona uma alta estabilidade durante o processo de biodegradação (PEREIRA; SERBENT; SKORONSKI, 2021), sendo uma estratégia interessante de biorremediação.

**Figura 8** - Imagem de microscopia eletrônica mostrando hifas fúngicas (estruturas alongadas e finas) cobrindo e penetrando as estruturas porosas do carvão ativado



Fonte: Adaptado de Hammer *et al.*, 2014.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

O presente projeto teve como objetivo a associação de fungos filamentosos com atividades de biodegradação da atrazina, potencial de controle biológico e produção de enzimas ligninolíticas ao carvão ativado para desenvolvimento de um inoculante biológico para biorremediação de solos agrícolas.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- obter concentrações adequadas da biomassa fúngica para inoculação no carvão ativado;
- avaliar a viabilidade dos fungos, tanto individualmente como em consórcio, no carvão ativado;
- desenvolver um inoculante biológico a utilizando o consórcio fúngico imobilizado no carvão ativado;
- mensurar a atividade ligninolíticas dos fungos nos pré-inóculos, em imobilizações individuais e no consórcio; e
- avaliar a capacidade de degradação da atrazina e qualidade do solo após a aplicação do inoculante em microcosmos de solo agrícola.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Micro-organismos

Esse trabalho integra o 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, sub-projeto intitulado “Seleção de Fungos para o Desenvolvimento de Bioinoculante para Biorremediação de Solos Agrícolas Impactos com Atrazina” foram selecionados três fungos pertencentes à Coleção de Cultura de Micro-organismos de Importância Biotecnológica e Ambiental – CCMIBA, do laboratório de Bioquímica e Microbiologia da UNILA: *Clonostachys rosea* CCMIBA\_R018, *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA\_R014, e *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_R111. Esses fungos foram escolhidos devido aos potenciais de produção de enzimas ligninolíticas, controle biológico de fitopatógenos e capacidade de degradação da ATZ. No trabalho de Bonassa (2021) *C. rosea* CCMIBA\_R018 resultou em 68 % de degradação de atrazina, e *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_R111 em 63 % e *P. lilacinum* CCMIBA\_R014, 46 %. Para a elaboração do consórcio e inoculação no carvão ativado, é essencial que os isolados possam crescer em conjunto, sem inibição mútua. Assim, os fungos selecionados foram submetidos ao teste de antagonismo paralelamente a este projeto pelo grupo de pesquisa. Neste estudo, os fungos foram reativados em placas de Petri com meio de cultura extrato de malte ágar 2% (MA2) por dez dias a 28°C.

### 4.2 Cinética de crescimento fúngico

Para avaliar a cinética de crescimento dos fungos e determinar a fase log para obtenção da maior quantidade de biomassa os fungos foram cultivados em MA2 durante 10 dias, após três discos de micélio fúngico (aproximadamente 5 mm) foram adicionados a 25 mL de meio de cultura líquido (tabela 1).

**Tabela 1** - Meios de cultivos usados para a cinética de crescimento dos fungos *Clonostachys rosea* CCMIBA\_R018, *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA\_R014, e *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_R111

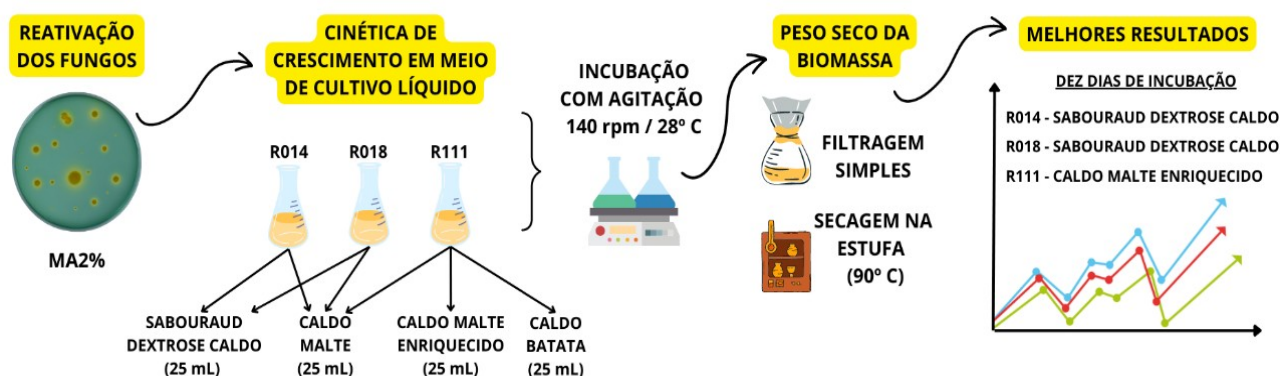
Fungo	Caldos de cultivo ensaiados		
<i>C. Rosea</i>	Caldo Malte	Sabouraud dextrose caldo	
<i>P. lilacinum</i>	Caldo Malte	Sabouraud dextrose caldo	
<i>Bjerkandera</i> sp.	Caldo Malte	Caldo de batata	Caldo Malte enriquecido

**Nota explicativa:** Para o preparo do Caldo Malte foi utilizado 20 g/L de extrato de malte em água deionizada (RODRÍGUEZ *et al.*, 2011); Para o caldo Sabouraud dextrose foi utilizado 10 g/L de peptona e 20 g/L de dextrose em água deionizada (ODDS, 1991); Para o Caldo de batata foram utilizados 200 g/L de batata em infusão e 20 g/L de dextrose, em água deionizada (SUGANO; MATSUSHIMA; SHODA, 2006); e por fim para o Caldo Malte enriquecido foram utilizados 20 g/L de dextrose, 10 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de levedura em água deionizada (LAURITSEN; KOTIAHO; LLOYD, 1993).

**Fonte:** da autora, 2024.

Os ensaios foram realizados em triplicata, incluindo os controles negativos (meio de cultivo sem fungo), e incubados em agitação a 140 rpm a 28 °C por: quatro, sete, nove, dez, onze e dezessete dias, conforme a figura 9.

**Figura 9** - Esquema ilustrativo do ensaio de cinética de crescimento fúngico em meio líquido



**Nota explicativa:** Para obtenção do peso seco, após incubação, nos dias indicados, os ensaios foram filtrados em papel filtro, e secos na estufa a 90° C até o peso constante. O peso seco da biomassa foi expresso em gramas (g).

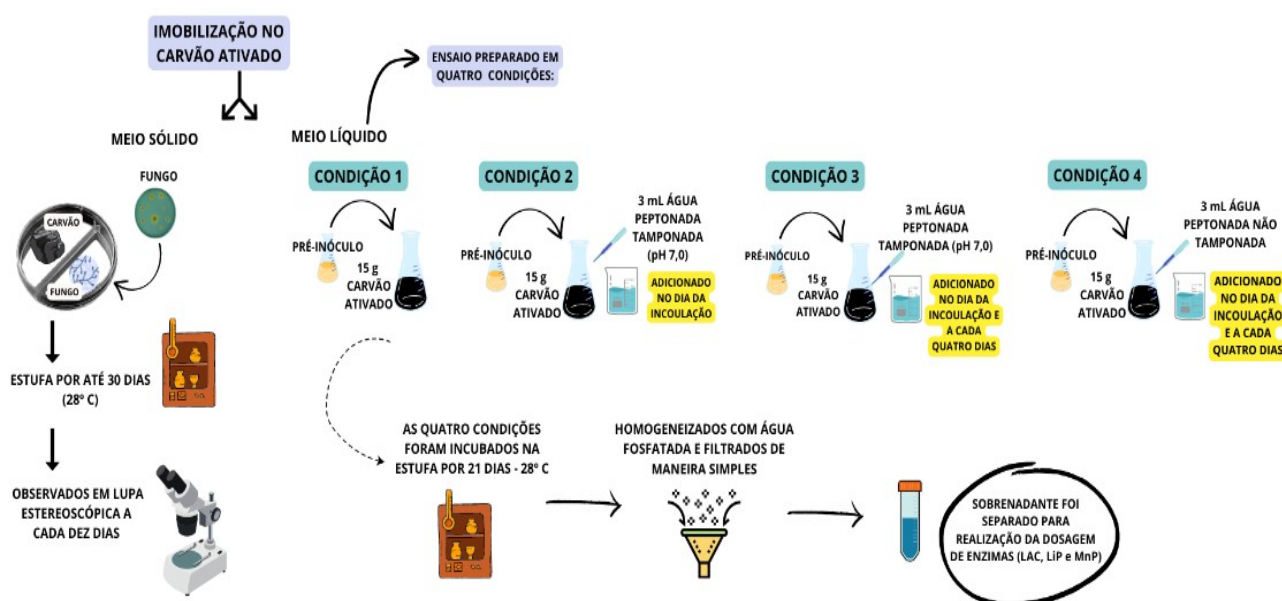
**Fonte:** da autora, 2024.

### 4.3 Imobilização dos fungos no carvão ativado

Para testar a imobilização fúngica no carvão ativado foram realizados dois ensaios, um em meio sólido e outro em meio líquido (em quatro condições diferentes), de acordo com a figura 10. Para ambos os ensaios utilizamos o carvão ativado comercial Biochar Brasil (adubo orgânico em pó, componentes: Nitrogênio, Fósforo, Ferro, Cobre, Potássio, Cálcio, Zinco, Manganês, Magnésio, Enxofre, Boro e Sódio, não inflamável e sem nitrato de amônia).

O ensaio em meio sólido foi baseado na metodologia de Hammer *et al.*, (2014). Individualmente, em triplicata, os fungos crescidos em MA2 foram inoculados em uma metade da placa de Petri contendo MA2 e na outra metade o meio de cultura foi retirado e foi adicionado 5 g de carvão ativado previamente autoclavado, as placas foram incubadas na estufa a 28° C por 30 dias. A cada dez dias foram avaliados usando estereoscópio se houve crescimento das hifas fúngicas para a metade contendo carvão ativado.

**Figura 10** - Esquema ilustrativo do ensaio de imobilização no carvão ativado



Fonte: da autora, 2024.

O ensaio em meio líquido foi baseado na metodologia apresentada por Eelgueta *et al.*, (2016), a partir da biomistura, ou seja, pellets de fungo (pelotas de micélio) crescidos em meio líquido e aderidos ao carvão ativado. Os pré-inóculos para os ensaios foram preparados individualmente conforme definido a partir da adição de 3 discos de 5 mm do micélio (previamente crescido em MA2 por dez dias) em Erlenmeyer contendo 25 mL do meio líquido (caldo sabouraud dextrose para *C. rosea* CCMIBA\_R018 e *P. lilacinum* CCMIBA\_R014 e caldo malte enriquecido para *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_R111) (Apêndice A e Figura 16). Os ensaios foram realizados em triplicata, incluindo os controles negativos (meio de cultivo sem fungo), e incubados em agitação a 140 rpm a 28 °C por 10 dias. Após, os ensaios foram filtrados em papel filtro e o sobrenadante dos pré-inóculos armazenados para a análise da atividade enzimática. A biomassa obtida foi usada para imobilizar os fungos individualmente no carvão ativado conforme a figura 10, em quatro condições (Tabela 2):

**Tabela 2** - Ensaio de imobilização individual dos fungos no carvão ativado

Condição / Ensaio de imobilização	Carvão ativado (15 g)	Biomassa fúngica	Agente umidificante (3 mL)	Repetição da umidificação
<b>Condição 1 / E1</b>	Sim	Sim	Não	Não
<b>Condição 2 / E2</b>	Sim	Sim	Água peptonada 1 % (pH 7,0)	Não
<b>Condição 3 / E3</b>	Sim	Sim	Água peptonada 1 % (pH 7,0)	Sim (a cada 4 dias)
<b>Condição 4 / E4</b>	Sim	Sim	Água peptonada 1 %	Sim (a cada 4 dias)

**Fonte:** da autora, 2024.

Todos os ensaios (EI.1, EI.2, EI.3 e EI.4) foram incubados na estufa BOD a 28° C com fotoperíodo por 21 dias. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e com seus respectivos controles negativos (componentes da imobilização sem a adição da biomassa fúngica).

Para avaliar a quantidade de biomassa que foi adicionada em cada condição de imobilização, um lote (réplicas) de cada pré-inóculo, de cada fungo, foi preparado e a biomassa foi seca (conforme item 4.2) para obtenção do peso seco antes da imobilização.

No final os ensaios imobilizados foram lavados e homogeneizados com solução de fosfato (7,1 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), filtrados em papel filtro, o sobrenadante separado para avaliação enzimática e a biomassa seca para obtenção do peso seco final (após imobilização).

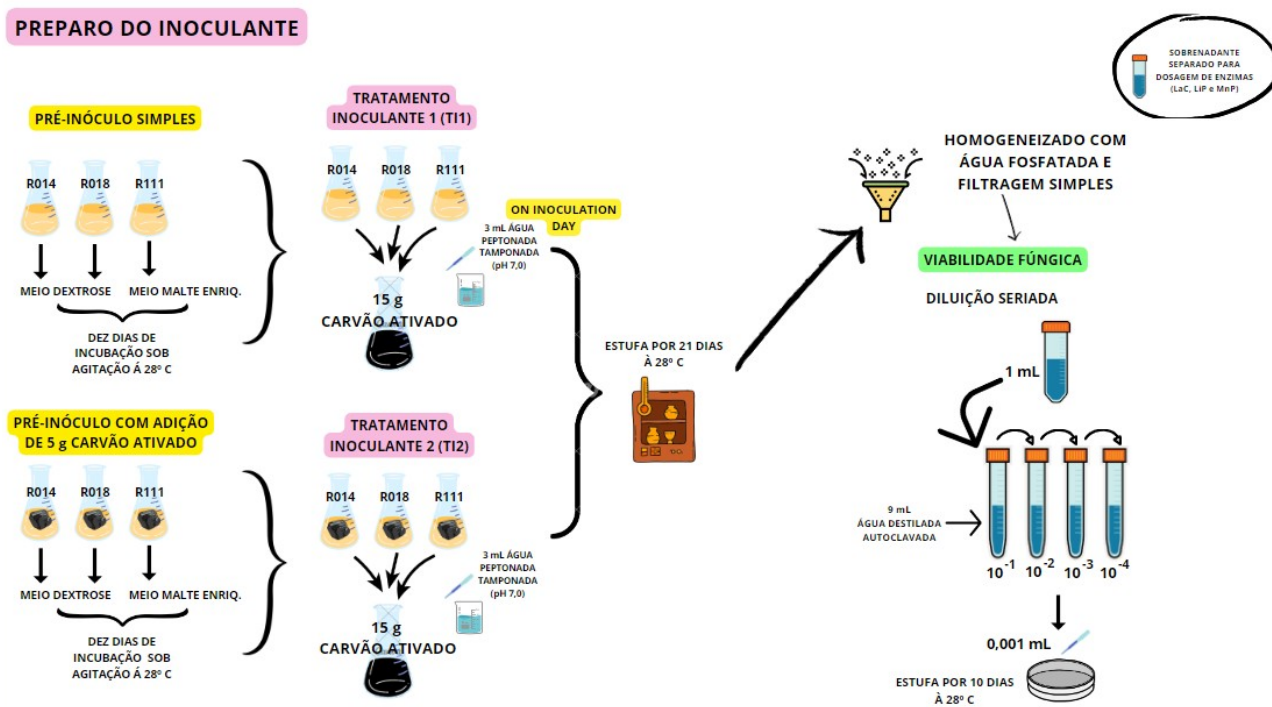
#### 4.4 Inoculante: consórcio fúngico imobilizado no carvão ativado

O inoculante consistiu na imobilização dos três fungos juntos em carvão ativado. Assim, os fungos foram inicialmente cultivados individualmente em duas condições, com e sem carvão ativado (Figura 11).

O pré-inóculo simples (denominado tratamento inoculante 1, TI1) foi preparado conforme o item 4.3, adicionando três discos de micélio fúngico a 25 mL de meio de cultura líquido de cada fungo e incubados sob agitação por dez dias.

No pré-inóculo com carvão ativado (denominado tratamento inoculante 2, TI2), também foi adicionado três discos de micélio a 25 mL de seus respectivos meios de cultura líquido (definidos no item 4.2) com adição de 5 g de carvão ativado autoclavado.

**Figura 11** - Esquema ilustrativo do preparo do inoculante



Fonte: da autora, 2024.

Os ensaios em triplicadas foram incubados sob agitação (28° C, 140 rpm) por dez dias, após foram filtrados com papel filtro e a biomassa filtrada utilizamos para o preparo dos consórcios, sendo:

Consórcio TI1– Uma réplica da biomassa filtrada de cada fungo do pré-inóculo simples (TI1) foi adicionada a 15 g de carvão ativado com 3 mL de água peptonada 1% tamponada (pH 7,0).

Consórcio TI2 – Uma réplica da biomassa filtrada de cada fungo do pré-inoculado com carvão ativado (TI2) foi adicionada a 15 g de carvão ativado com 3 mL de água peptonada 1% tamponada (pH 7,0).

Todos os consórcios foram realizados com quatro réplicas e incubados a 28° C por 21 dias. Após, três réplicas foram lavadas com solução de fosfato (7,1 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7,1), filtradas em papel filtro e o sobrenadante separado para as análises enzimática e da biomassa seca para obtenção do peso seco do inoculante. Uma réplica de cada consórcio foi utilizada para determinar a viabilidade fúngica (item 4.4.1).

#### 4.4.1 Viabilidade do consórcio fúngico

Para a avaliação da viabilidade fúngica de cada tratamento (TI1 e TI2), após a incubação de 21 dias, uma réplica do tratamento foi diluída em 100 mL de solução salina (NaCl 0,9%). As amostras foram homogeneizadas por 10 minutos em agitador magnético e em seguida realizou-se a diluição seriada, transferindo inicialmente 1 ml da solução para um tubo de ensaio contendo 9 ml de solução salina, correspondendo a diluição  $10^{-1}$ . Deste 1 mL foi transferido para um novo tubo de ensaio contendo 9 ml de solução salina e assim sucessivamente até a quarta diluição ( $10^{-4}$ ). Para a semeadura, 100  $\mu$ L de cada diluição foram plaqueados com auxílio da alça de Drigalski em meio de cultura sólida MA2 e Sabouraud dextrose ágar (triplicata para cada diluição). As placas foram incubadas por dez dias e o crescimento acompanhando diariamente.

#### 4.5 Atividade enzimática

Durante a execução dos experimentos dos itens 4.3 (pré-inóculo e EI1, EI2, EI3 e 4) e 4.4 (pré-inóculos, TI1 e TI2; e consórcio TI1 e consórcio TI2) os sobrenadantes dos ensaios foram separados para avaliação das enzimas lacase (lac), lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP). Todos os procedimentos foram realizados em triplicata e como controle negativo da reação foi utilizado o meio de cultivo sem crescimento fúngico (BUSWELL; CAI; CHANG, 1995). As atividades das enzimas foram determinadas através da equação (equação 1) descrita por Baltierra-Trejo; Márquez-Benavides; Sánchez-Yáñez, (2015). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que oxidou 1  $\mu$ mol do substrato por minuto.

$$U L^{-1} = \frac{(\Delta A)(V_t)(D_f)(10^6)}{(t)(\epsilon)(d)(V_s)}$$

Onde:

U: Atividade enzimática

$\Delta A$ : Absorbância final - absorbância inicial.

$V_t$ : Volume total da reação (mL).

t: Tempo de reação (min).

$\epsilon$ : Coeficiente de extinção molar ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ou  $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

d: Percurso óptico (1 cm).

Vs: Volume de amostra (mL).

Df: Fator de diluição.

$10^6$ : Fator de correção ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ )

A atividade da lacase foi determinada espectrofotometricamente usando ABTS (2,2'-azino-di [3-etilbenzo-tiazolin-sulfonato]) como substrato a 420 nm ( $\epsilon = 3,6 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) antes e após a incubação a 37 °C por 10 minutos do sobrenadante na solução enzimática. Para a solução enzimática foi utilizado 600  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio (0,1 mol/L; pH 4,5), 1200  $\mu\text{L}$  da solução enzimática de cada ensaio e 200  $\mu\text{L}$  de ABTS (0,03%) (BALDRIAN, 2009).

A atividade da LiP foi determinada pela metodologia descrita por Arora e Gill (2001), a partir da oxidação do álcool veratrílico (substrato) à aldeído veratrílico. A reação consiste na mistura de 1 mL de tampão tartarato de sódio (125 mM; pH 3), 500  $\mu\text{L}$  de álcool veratrílico 10 mM, 500  $\mu\text{L}$  de solução de peróxido de hidrogênio 2 mM e 500  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático. O início da reação será dado pela adição de peróxido de hidrogênio e a solução incubada a 25° C por 5 minutos. A absorbância foi lida em 310 nm antes e após a incubação.

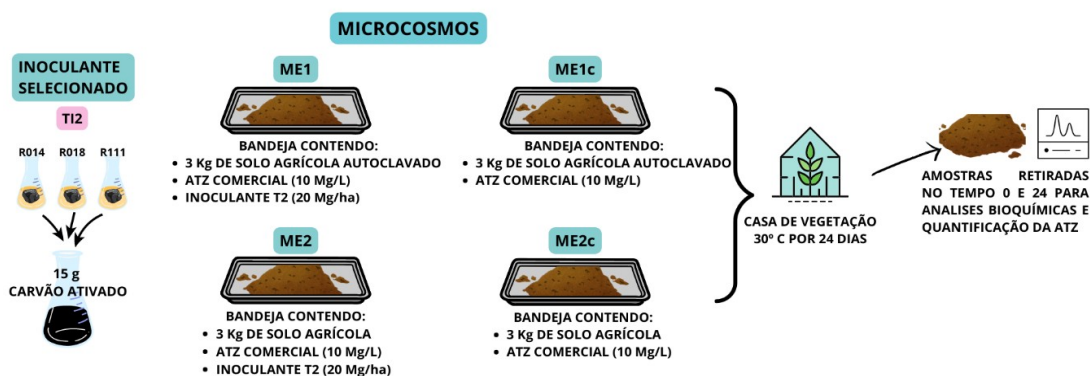
A determinação de MnP foi realizada a partir da oxidação de vermelho de fenol na presença de manganês e peróxido de hidrogênio. Foi realizada uma solução de 0,5 mL de extrato enzimático, 0,1 mL de vermelho de fenol 0,01%, 0,1 mL de lactato de sódio 0,25 M, 0,2 mL de albumina bovina 0,5%, 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{MnSO}_4$  2 mM e 50  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio em tampão succinato de sódio (20 mM; pH 4,5). A solução foi lida em espectrofotômetro a 610 nm antes e após a incubação a temperatura ambiente, durante 5 minutos. Após incubação a reação foi interrompida pela adição de 40  $\mu\text{L}$  de NaOH (2 M) antes da leitura (KHINDARIA; GROVER; AUST, 1994).

#### **4.6 Avaliação da capacidade de degradação da atrazina pelo inoculante e análise da qualidade do solo em microcosmos de solo agrícola**

O ensaio selecionado para a avaliação do inoculante foi o consórcio TI2. Assim, o ensaio foi repetido para obtenção de quantidades suficientes para a avaliação no sistema de microcosmos de solo agrícola. O ensaio em microcosmos foi realizado conforme Wang *et al.*, (2018) e Lima *et al.*, (2020) com modificações (figura 12).

Para a montagem dos microcosmos foi coletado previamente solo de um cultivo agrícola da região de Foz do Iguaçu (25°26'38.5"S 54°31'01.8"W). O solo foi distribuído em bandejas de poliestireno de 29,6 cm por 43,5 cm (corresponde a 0,1288 m<sup>2</sup>). Em todos os tratamentos foi utilizado 3 kg de solo agrícola e o inoculante TI2 adicionado na concentração de 20 mg/ha (1 mg/há, correspondendo a 100 g por m<sup>2</sup>), assim de acordo com o tamanho das bandejas a adição foi de 12,87 g do inoculante. Os microcosmos foram contaminados com 10 mg/L de atrazina comercial, adquirida como doação, que continha na composição 900 g/kg atrazina. Assim, os microcosmos foram elaborados em triplicatas nas seguintes condições (Tabela 3):

**Figura 12** - Esquema ilustrativo do ensaio de tratamento do solo agrícola contaminado com atrazina a partir da adição do inoculante em microcosmos



Fonte: da autora, 2024.

**Tabela 3** - Preparo do ensaio com microcosmos em bandejas contendo solo agrícola esterilizado ou não, atrazina comercial, inoculante ou não

ENSAIO	Solo agrícola (3 kg)	Atrazina (20 mg/ha)	Inoculo (12,87 g)
ME1	Esterilizado	Sim	Sim
ME1c	Esterilizado	Sim	Não
ME2	Não esterilizado	Sim	Sim
ME2c	Não esterilizado	Sim	Não

Fonte: da autora, 2024.

Todas as bandejas foram incubadas em casa de vegetação por 24 dias com temperatura estável em 30° C e fotoperíodo de 12 h. As amostras foram coletadas assim que incubados (T1) e após 24 dias (T2) e enviadas para análise da concentração de ATZ (Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, GC-MS) e dos fatores físicos e químicos do solo (pH, matéria orgânica, total N, total C orgânico, total P, razão C/N, Ca, Mg, K, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>3</sub>), como prestação de serviço.

## 4.7 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, seguida por teste de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para cumprimento dos objetivos proposto a metodologia executada, em suma, foi delineada para:

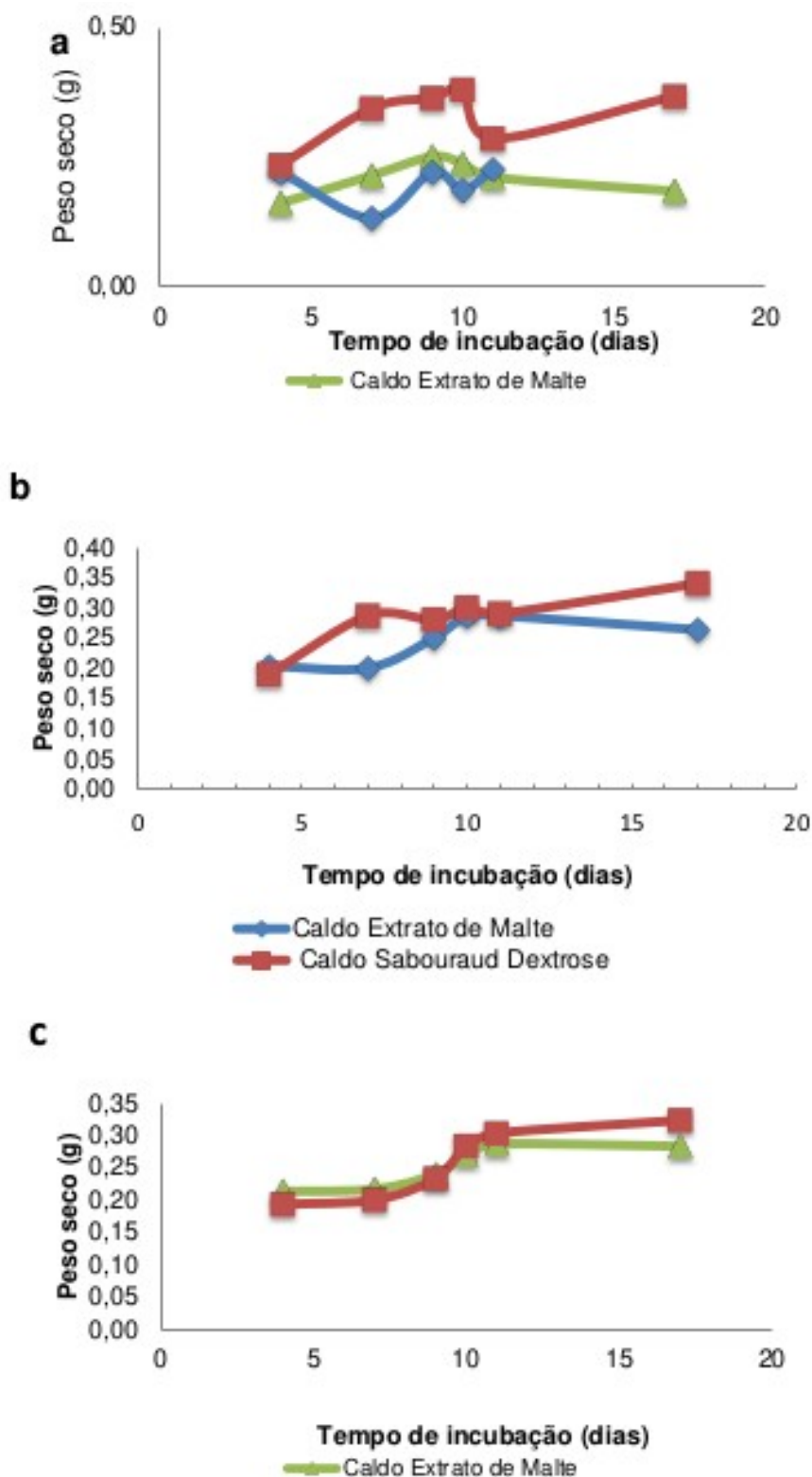
- I. identificação da melhor condição de cultivo de cada fungo: cinética do crescimento em diferentes meios de cultura;
- II. avaliação da sensibilidade dos fungos à imobilização no carvão ativado e avaliação do efeito do condicionante no desenvolvimento fúngico: imobilização sólida e em meio líquido (denominados ensaios EI1, EI2, EI3 e EI4);
- III. elaboração do inoculante: Consórcio dos fungos em carvão ativado (denominados ensaios TI1 e TI2);
- IV. avaliação do perfil ligninolíticos dos fungos isolados e no inoculante: atividade das enzimas Lac, LiP e MnP; e
- V. avaliação da ação do inoculante em um sistema de microcosmos (denominados ensaios ME1 e ME2).

### 5.1 Identificação da melhor condição de cultivo de cada fungo

Os fungos *Clonostachys rosea* CCMIBA\_R014, *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA\_R018, e *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_R111 foram avaliados em diferentes meios de cultura para definição da condição (meio de cultivo e tempo de incubação) que resultasse no melhor crescimento (gráfico 1).

Os fungos *Clonostachys rosea* CCMIBA\_R014 e *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA\_R018 apresentaram a maior biomassa, 0,30 g e 0,28 g, respectivamente, e crescimento constante com o caldo Sabouraud Dextrose em dez dias de incubação a 28° C sob agitação (140 rpm). Assim, para esses fungos o caldo Sabouraud dextrose foi escolhido para a continuidade do projeto. O meio Sabouraud Dextrose foi concebido por Sabouraud para o cultivo de fungos, especialmente os associados a espécies clínicas (MERZ WG; ROBERTS GD, 1995), é considerado um meio enriquecido devido à sua elevada concentração de dextrose como fonte de carbono e peptona como fonte de nitrogênio, principalmente. Esse meio é particularmente propício para o isolamento de fungos, uma vez que possui um pH baixo, o que o torna altamente adequado para a identificação morfológica, uma vez que estimula a produção de esporos e pigmentos característicos dos fungos (DAS *et al.*, 2010).

**Gráfico 1** - Curva de crescimento da biomassa fúngica cultivada a 28°C e 140 rpm por até 17 dias



**Nota explicativa:** (a) *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_R111 em diferentes meios; (b) *Clonostachys rosea* CCMIBA\_R014 em caldo de malte e *sabouraud*; (c) *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA\_R018 em caldo de malte e *sabouraud*

**Fonte:** da autora, 2024.

*Bjerkandera* sp. CCMIBA\_R111 exibiu maior concentração de massa micelial com o Extrato de Malte enriquecido com peptona e extrato de levedura (dez dias de incubação a 28° C, peso seco de 0,38 g). Os meios de cultura enriquecidos com substâncias complexas (extratos de carne, malte e levedura) permitem o crescimento de diversos micro-organismos (FILHO; OLIVEIRA, 2007). Um estudo sobre condições de crescimento de uma cepa do fungo *Bjerkandera* foi conduzido por KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA; RYBCZYŃSKA-TKACZYK, (2020), os meios de cultura que se destacaram no estudo foram os ricos em componentes orgânicos naturais, e as necessidade nutricionais foram carbono e nitrogênio orgânico. Então, para aumentar a fonte de nitrogênio orgânico ao meio de cultura, foi adicionado extrato de levedura e peptona (BROZZOLI *et al.*, 2009), o que resultou na maior quantidade de biomassa produzida.

## **5.2 Imobilização no carvão ativado**

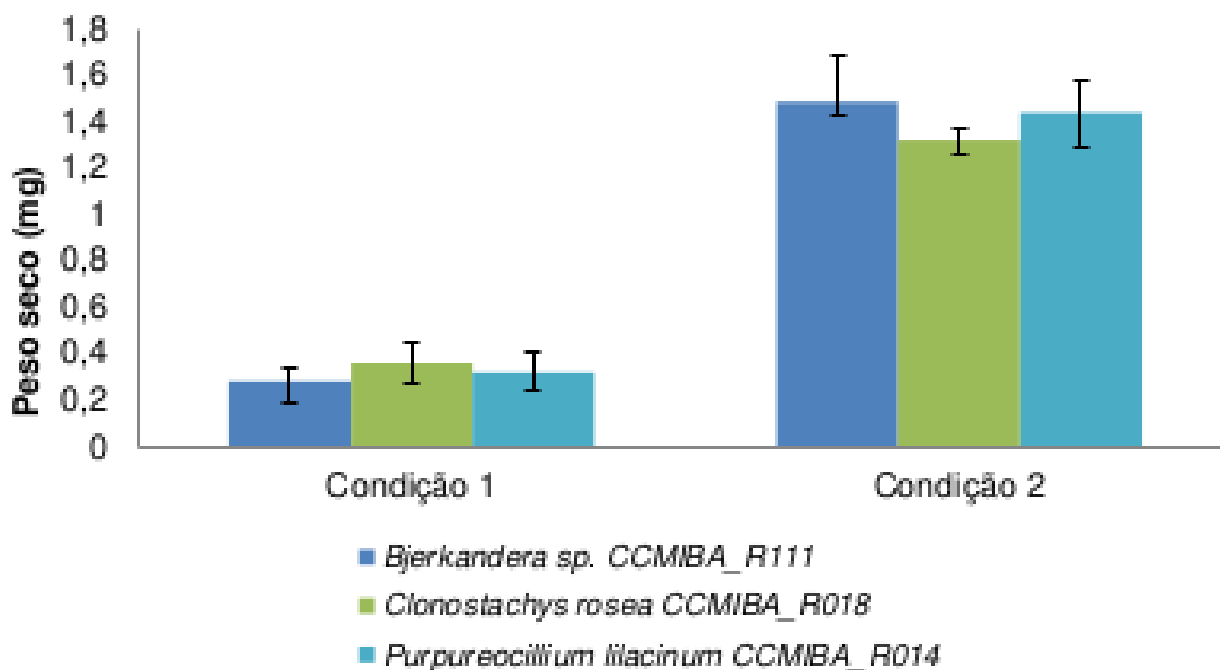
A capacidade de crescimento no carvão ativado foi avaliada conforme Hammer *et al.*, (2014) em meio sólido, porém nenhum fungo foi capaz de continuar o crescimento sobre o carvão ativado (Figura 13). Após alguns dias de incubação, observou-se que o carvão ativado estava excessivamente seco, o que possivelmente prejudicou o desenvolvimento esperado. Neste sentido, o ensaio foi modificado, adicionando no carvão ativado a biomassa obtida a partir de uma cultura líquida, na fase log de crescimento, de cada fungo.

**Figura 13** - Exemplo do resultado do ensaio de avaliação do crescimento fúngico no carvão ativado



Fonte: da autora, 2024.

A viabilidade fúngica no carvão ativado em meio líquido foi avaliada em quatro condições diferentes (figura 10). No gráfico 2 está apresentado o resultado do peso final dos ensaios em meio líquido nas condições 1 e 2 (condição 1 – sem agente de umidificação; condição 2 – água peptonada 1 % tamponada, pH 7, como agente de umidificação). Foi possível observar que no tratamento sem umidificação todos os fungos apresentaram baixa viabilidade, sendo *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_R111 o menor crescimento em relação aos outros fungos. Entretanto, a umidificação com água peptonada tamponada apresentou alta viabilidade de todos os fungos cultivados, com resultado do peso da biomassa significativamente maior (p-valor < 0,05, Apêndice B).

**Gráfico 2** - Ensaio de imobilização no carvão ativado a partir do meio de cultivo líquido

**Nota explicativa:** condições EI1 e EI2 (figura 10). O conjunto de dados denominado “condição1” biomassa fúngica sem adição de agente umidificante. O conjunto de dados denominado “condição 2” biomassa fúngica no carvão ativado com água peptonada 1% tamponada (pH 7,0) adicionada unicamente no início do tratamento, (p-valor <0,05).

**Fonte:** da autora, 2024.

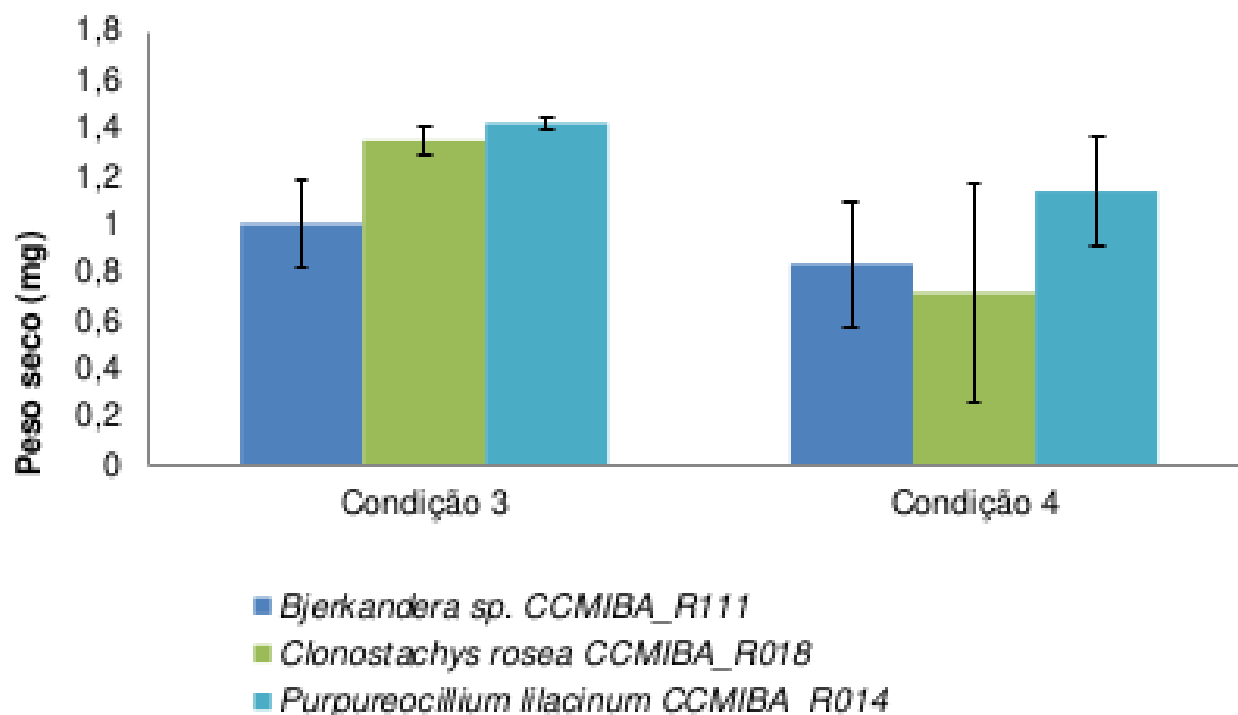
Com objetivo de melhor crescimento da biomassa, outras duas condições de agente para umidificação foram avaliadas: condição 3 e condição 4 (figura 10) e os resultados desses ensaios são apresentados no gráfico 3. Nesse gráfico pode-se observar que não houve diferença significativa entre as duas condições (3 e 4) e que a continuidade de umidificação nos ensaios também não elevou a produção de biomassa. No entanto, em nenhum dos ensaios houve inviabilidade fúngica, em todos os ensaios os fungos foram capazes de produzir seus micélios.

Neste sentido, para continuidade do projeto, para a produção do consórcio fúngico foi selecionado o ensaio de imobilização na condição 2, com adição de água peptonada 1% (pH 7,0), apenas no início do inóculo fúngico (figura 10 e gráfico 2).

O carvão ativado foi escolhido como meio de suporte para os fungos, com objetivo de formar um biofilme (YU *et al.*, 2020) e por ser um produto orgânico promissor em mitigar a contaminação do solo. Diversos estudos têm empregado o carvão ativado como potente remediador de ambientes contaminados com poluentes orgânicos (GUO; SONG; TIAN, 2020; HAIDER *et al.*, 2022). A imobilização de microorganismos no carvão ativado é vista como uma otimização da biorremediação.

Estudos apresentaram que a imobilização de bactérias ao carvão ativado melhorou a qualidade do solo e aumentou a taxa de degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) (BONAGLIA *et al.*, 2020; SONG *et al.*, 2021), ou a degradação de hidrocarbonetos de petróleo (GUO; LIU; TANG, 2022). A imobilização de fungos micorrizos arbusculares (FMA) no carvão ativado serviu como fertilizante orgânico no cultivo da chicória, aumentando a microbiota do solo e como remediador do solo contaminado com cádmio (Cd), diminuindo a absorção de Cd pelo solo (ZHAO; CHEN; XIAO, 2021). Em outro estudo ao adicionar carvão ativado e fungo ao solo houve diminuição de Cd em até 62 %, aumentando o rendimento da planta *kangkong* (espinafre de água doce) em mais de 25 % (HU *et al.*, 2014).

**Gráfico 3** - Ensaio de imobilização no carvão ativado a partir do meio de cultivo líquido



**Nota explicativa:** condições E13 e E14, figura 10. O conjunto de dados denominados “condição 3” biomassa em carvão ativado com 1 água peptonada 1% tamponada (pH 7,0), adicionado a cada quatro dias até 21 dias. O conjunto denominado “condição 4”, biomassa em carvão ativado com água peptonada 1% não tamponada, adicionada a cada quatro dias até 21 dias, (p-valor >0,05).

**Fonte:** da autora, 2024.

No presente estudo a associação do carvão com a água peptonada 1 % tamponada (pH 7) foi importante para a viabilidade fúngica. A grande maioria dos fungos possuem forte habilidade de adaptação e crescem em diversas faixas de pH, no entanto, algumas restrições podem interferir no crescimento fúngico. Existem consideráveis informações a respeito do pH para o cultivo inicial, mas há um déficit na literatura quanto

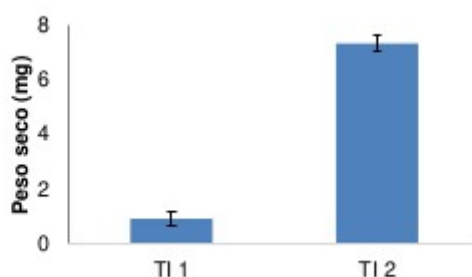
à inferência dos parâmetros durante o crescimento fúngico relacionados ao pH. Entretanto, é conhecido que os fungos têm a capacidade de modificar o pH através da absorção seletiva ou da troca catiônica. Além disso, existe uma dificuldade relacionada ao tamponamento, onde ele pode ser assimilado ou tornar-se tóxico, dependendo da quantidade (CARLILE; WATKINSON, 1997; DEACON, 2006). Quando foi realizado o tamponamento a cada quatro dias (EI3), foi possível observar um efeito negativo no crescimento dos fungos no carvão ativado. Visualmente, notou-se o acúmulo de líquido nesses ensaios, o qual pode ter sido causado pela frequência de adição do agente de umidificação, interferindo no processo fisiológico.

### **5.3 Elaboração do inoculante: Consórcio fúngico em carvão ativado**

Através do ensaio de imobilização, a condição 2 (figura 10), foi escolhida para montagem do consórcio e continuidade do projeto. No entanto, ao decorrer do estudo foi elaborada e avaliada uma nova condição para produção do pré-inóculo (figura 11). Assim os ensaios foram subdivididos em tratamento de imobilização 1 (TI1) que consistia exatamente ao ensaio de imobilização na condição 2 selecionada; e o tratamento de imobilização 2 (TI2), que foi alterado o modo de preparo do pré-inóculo (adição de 5 g de carvão ativado ao caldo de cultura previamente). Os resultados da biomassa produzida pelos consórcios TI1 e TI2 são apresentados no gráfico 4.

Após análise dos resultados, constatou-se que, além da importância de identificar o meio de cultivo ideal para o crescimento ótimo da biomassa fúngica (conforme descrito no item 5.1) individual, a estratégia adotada de adicionar o carvão ainda na fase de pré-inóculo demonstrou ser mais eficaz. Essa estratégia consistiu em produzir previamente a biomassa fúngica em conjunto com o carvão ativado (TI2), em vez de gerar apenas a biomassa fúngica e depois imobilizá-la no carvão ativado. Dessa forma, foi possível fornecer ao fungo um caldo de cultura rico em nutrientes e promover sua adaptação prévia ao suporte (carvão ativado), resultando em um melhor desempenho. Durante o processo de filtragem dos pré-inóculos, apenas o líquido excedente foi removido, enquanto o micélio foi transferido junto com o carvão ativado para a imobilização. Esta abordagem pode ter sido o principal fator contribuinte para o desenvolvimento conjunto e a maior produção de biomassa, em comparação com o TI1, no qual os pré-inóculos não foram previamente crescidos em carvão ativado.

**Gráfico 4** - Peso seco (biomassa) dos consórcios fúngicos (figura 11)



**Nota explicativa:** peso após adição dos três fungos e incubação por 21 dias em 15 g de carvão ativado nos dois tratamentos diferentes de pré-inóculos (T11 e T12) avaliados, (p-valor <0,05).

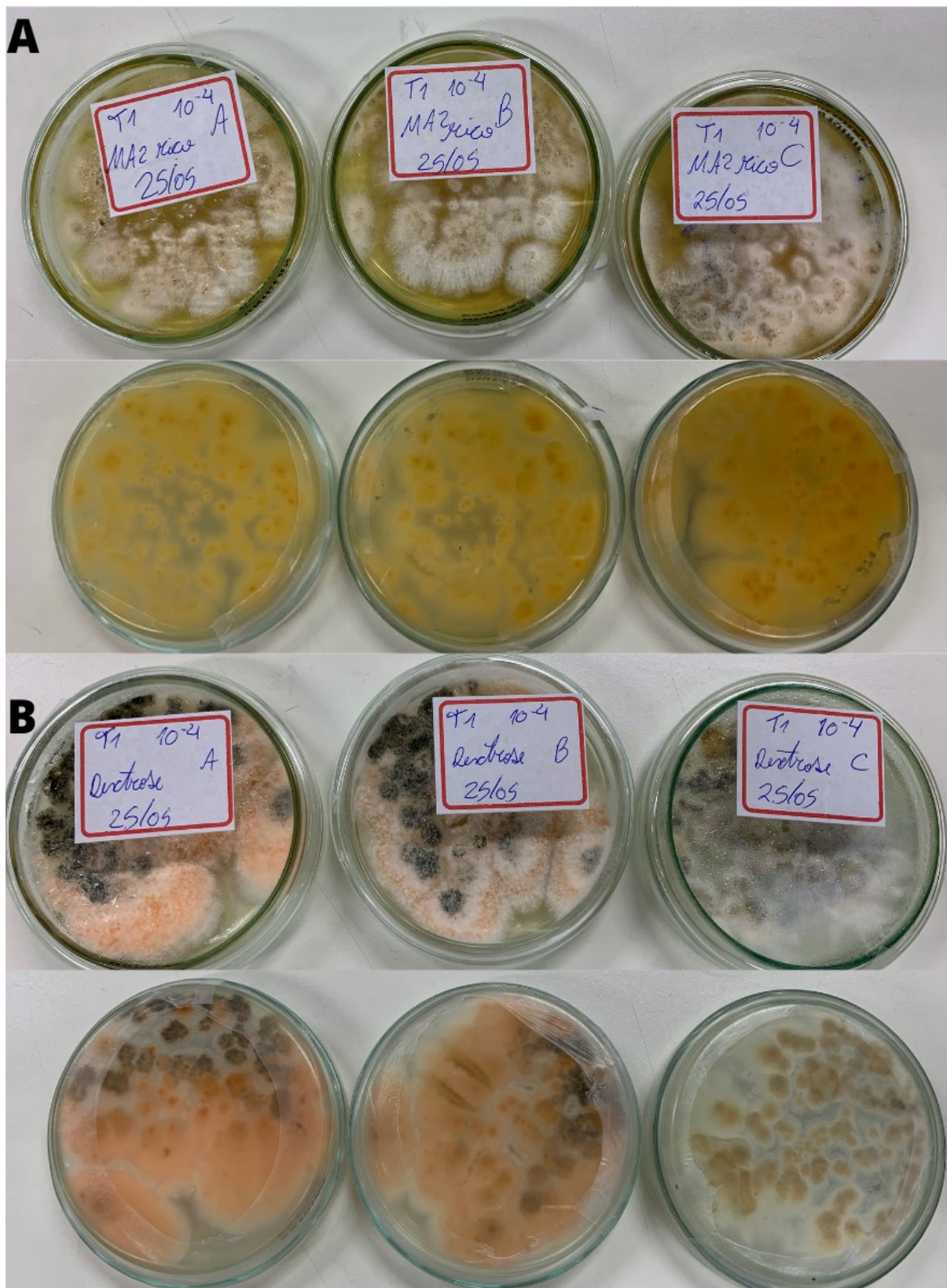
**Fonte:** da autora, 2024.

Durante o cultivo do consórcio, além do peso final da biomassa apresentado no gráfico 4 ao longo dos 21 dias de incubação, o peso dos frascos contendo os tratamentos foram aferidos para acompanhamento (Apêndice C e Gráfico 8). Houve uma queda progressiva no peso dos ensaios ao longo do período, porém, essa mudança pode estar relacionada com a biotransformação do carvão ativado em biomassa e não por morte fúngica, considerando que, em média, 1,5 g de cada fungo foi adicionado no início do consórcio, totalizando 4,5 g, e ao final, após 21 dias, chegando em média a 7 g, descontando o peso do carvão ativado (T12).

Além da taxa de crescimento fúngico, obtida pelo peso seco, que indica o crescimento, realizou-se um ensaio (diluição seriada e plaqueamento em meio sólido, figura 14) para analisar a sobrevivência e reprodução dos fungos após os 21 dias de incubação. Devido às características dos micélios e da alta esporulação dos ascomicetos não foi possível a identificação de cada fungo adicionado ao consórcio. É possível confirmar que, em ambos os tratamentos, os fungos estavam viáveis e apresentaram um aumento visível na biomassa, conforme mostrado na Figura 15.

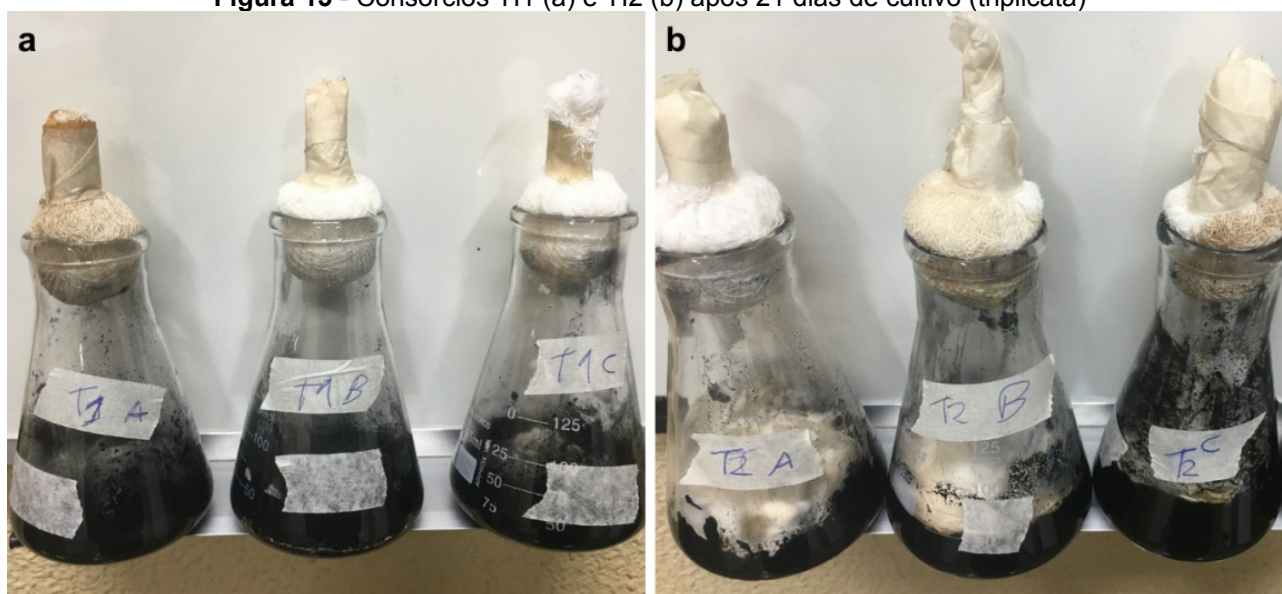
Para avaliar a viabilidade outras abordagens moleculares podem ser estudadas, como sondas de DNA, reação em cadeia da polimerase (PCR) e ou Sequenciamento de DNA de segunda geração (NGS), podem ser utilizados como métodos complementares à diluição seriada (ROMANO; VENTORINO; PEPE, 2020; SHEHATA; HASSANE; NEWMMASTER, 2023).

**Figura 14** - Diluição seriada e plaqueamento em meio sólido do consórcio após 10 dias de incubação em meio sólido



**Nota explicativa:** a) Diluição seriada a 10<sup>-4</sup> em MA2 enriquecido com extrato de levedura e peptona; b) Diluição seriada a 10<sup>-4</sup> em meio dextrose ágar.

**Fonte:** da autora, 2024.

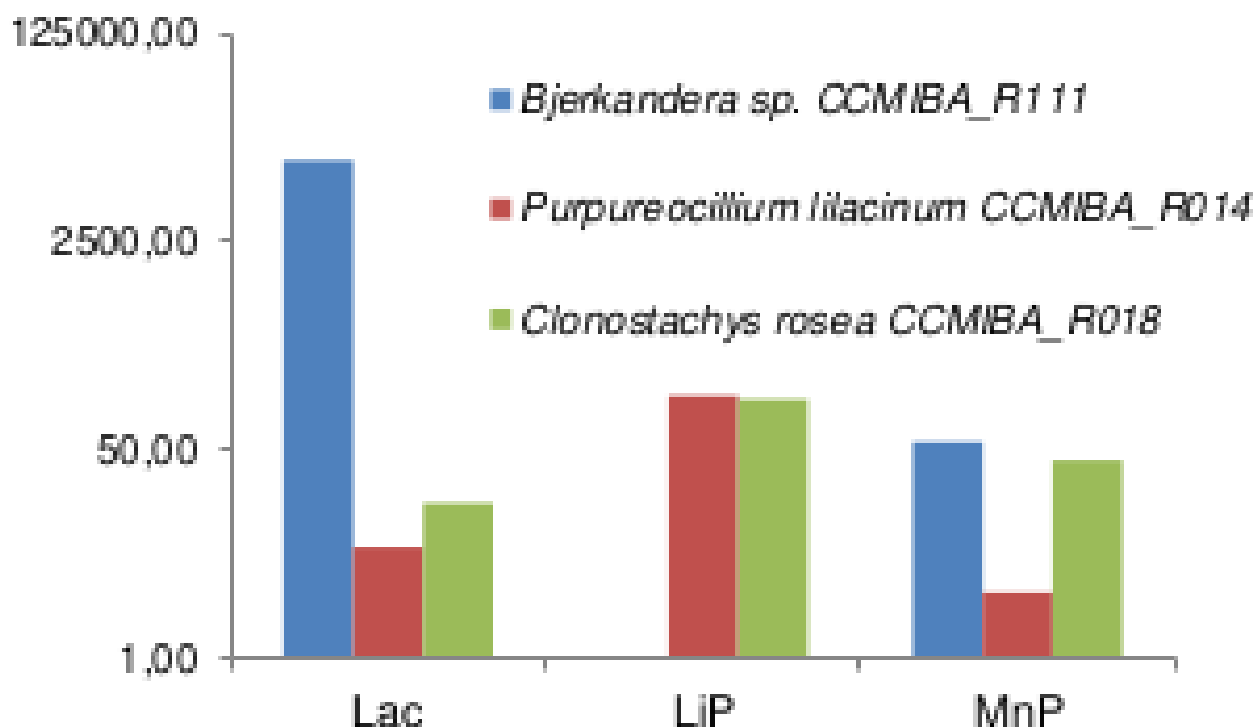
**Figura 15** - Consórcios T11 (a) e T12 (b) após 21 dias de cultivo (triplicata)

Fonte: da autora, 2024.

#### 5.4 Perfil ligninolítico dos fungos

A investigação dos perfis ligninolíticos dos fungos neste estudo incluiu a avaliação de três importantes enzimas: Lacase, LiP e MnP. Estas enzimas desempenham papéis fundamentais em processos biotecnológicos de biorremediação ambiental, sendo essenciais para a degradação de compostos orgânicos presentes no ambiente (OTHMAN *et al.*, 2023; KUMAR; CHANDRA, 2020). Entre elas, as Lacases (Lac), catalisadoras da oxidação de compostos fenólicos e não fenólicos, desempenham um papel crucial na desintoxicação e degradação de resíduos (YOSHIDA, 1883). Por sua vez, as enzimas LiP e MnP, classificadas como oxirredutases, desempenham um papel essencial na degradação da lignina na presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), contribuindo para a oxidação de polímeros (KUMAR; CHANDRA, 2020).

A atividade foi avaliada nos experimentos dos itens: 4.3 (pré-inóculo e EI1, EI2, EI3 e 4) apresentada nos gráficos 5 e 6; 4.4 (pré-inóculo da condição T12); e consócio (T11 e T12) apresentada no gráfico 7.

**Gráfico 5** - Gráfico de dosagem das enzimas Lac, LiP e MnP

**Nota explicativa:** dosagens realizadas a partir dos sobrenadantes separados dos pré-inóculos preparados sem adição de carvão ativado.

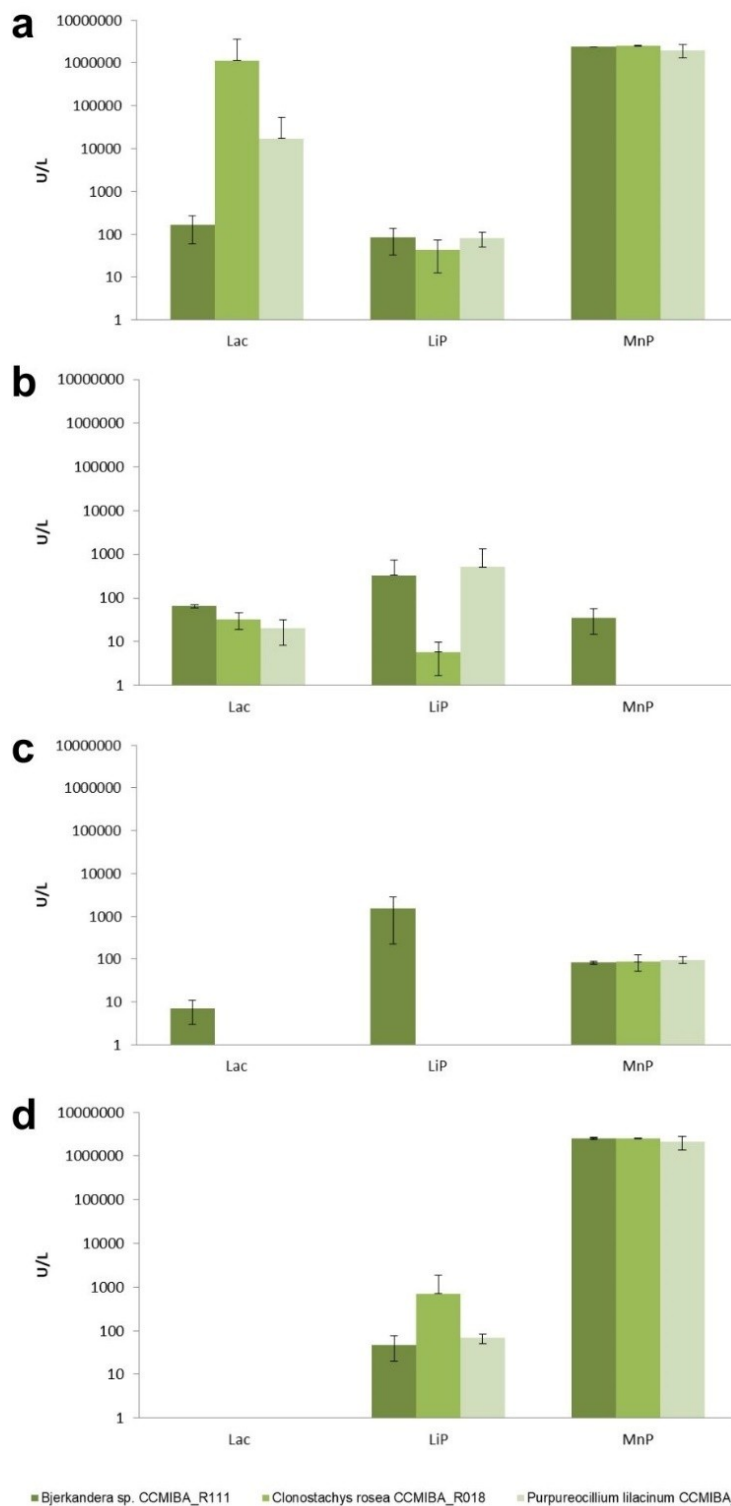
Fonte: da autora, 2024.

Inicialmente, o gráfico 5 exibe os resultados das atividades enzimáticas do pré-inóculo simples, antes da adição do carvão ativado. Sem o carvão ativado apenas o fungo *Bjerkandera sp. CCMIBA\_R111* não foi capaz de produzir a enzima LiP, porém foi o que mais produziu as enzimas Lac e MnP (11574,07 U/L; 58,64 U/L, respectivamente), os outros fungos, apesar de atividade das três enzimas, os valores são inferiores a produção do basidiomiceto.

Esses pré-inóculos foram adicionados individualmente ao carvão ativado em quatro condições diferentes (Figura 10) e incubados por 21 dias. Após 21 dias, a maior atividade enzimática é apresentada pela condição EI1 (gráfico 6a), neste ensaio, sem adição de água peptonada, todos os fungos produzem as enzimas Lac, LiP e MnP. Na condição EI2 (gráfico 6b) *Bjerkandera sp. CCMIBA\_R111* foi o único que produziu a enzima MnP (35,87 U/L), ou seja, a adição de água peptonada tamponada no início do cultivo impactou na expressão e na quantidade das enzimas produzidas. O mesmo perfil foi observado na condição EI3, com pior desempenho enzimático. A adição de água peptonada não tamponada, condição EI4 mostrou resultados semelhantes a condição EI1 para MnP e

LIP, porém impactou diretamente na atividade da lacase, sem atividade para nenhum fungo testado.

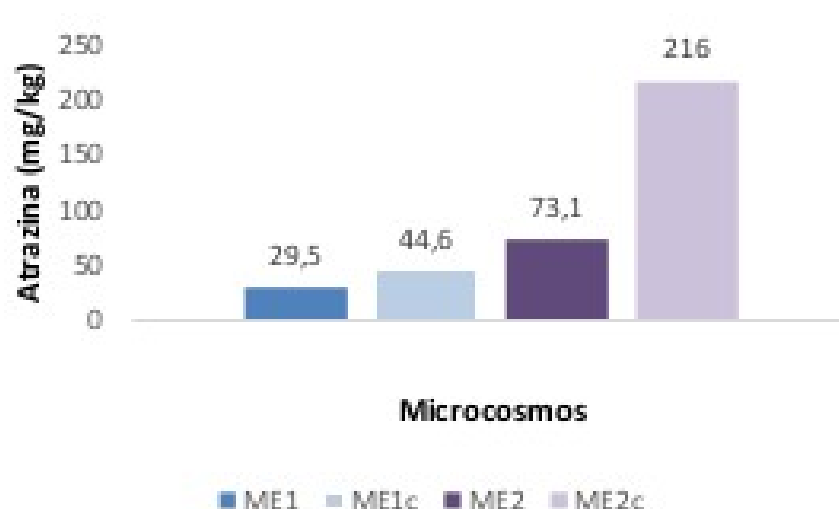
**Gráfico 6** - Atividade das enzimas Lac, LiP e MnP dos sobrenadantes dos ensaios de imobilização no carvão ativado



**Nota explicativa:** (a) condição 1, (b) condição 2, (c) condição 3 e (d) condição 4 (figura 10).

**Fonte:** da autora, 2024.

**Gráfico 7** - Concentração (mg/kg) de atrazina nas amostras coletadas dos microcosmos após 24 dias de incubação



**Nota explicativa:** Concentração com o tratamento do solo agrícola autoclavado e seu respectivo controle negativo (ME1 e ME1c, respectivamente) e o tratamento do solo agrícola sem esterilização e seu respectivo controle negativo (ME2 e ME2c, respectivamente).

**Fonte:** da autora, 2024.

Como para continuidade do consórcio foi selecionada a condição de imobilização EI2 devido a maior biomassa, porém como visto acima não foi a condição de maior expressão enzimática. Em adição, no consórcio também foi modificado o pré-inóculo, adicionando carvão ativado já no início do cultivo (figura 11) para depois inoculação na condição EI2. Assim, foi avaliado a expressão enzimática também nesse pré-inóculo. No entanto, quando os pré-inóculos foram preparados com a adição de carvão ativado (TI2) nenhum fungo produziu as enzimas Lac e LiP, apenas obteve-se 24,31 U/L de MnP para *P. lilacinum CCMIBA\_R018*.

Com base nos resultados obtidos, é evidente que os três fungos são capazes de produzir as enzimas avaliadas, embora a expressão dessas enzimas varie de acordo com as condições de umidade, tamponamento e a presença de carvão ativado. Surpreendentemente, a presença isolada do carvão ativado, sem a umidade necessária, não pareceu impactar significativamente a atividade enzimática, sugerindo uma interação limitada entre os fungos e o carvão neste contexto. No entanto, quando a água peptonada foi introduzida juntamente com o tamponamento, observou-se uma notável interação entre o carvão ativado e os micélios dos fungos, o que resultou em alterações na expressão enzimática. Este fenômeno indica que a presença de umidade e certos componentes do meio de cultura desencadeiam uma interação mais significativa entre os micélios fúngicos

e o carvão ativado, influenciando assim o crescimento micelial e a diminuição da expressão das enzimas avaliadas. Levando em consideração que a imobilização busca aumento da biomassa para aplicação no solo, nesse momento, a expressão enzimática não é um fator limitante para as aplicações.

Por fim, foi realizada a avaliação da atividade enzimática do consórcio, após a combinação dos três fungos no carvão ativado. No consórcio TI1, não foi detectada atividade enzimática, enquanto no consórcio TI2, apenas a enzima LiP foi produzida, apresentando uma atividade de 295,14 U/L. Esses resultados destacam o impacto significativo da interação entre os fungos na atividade enzimática, ressaltando a importância de avaliar essa interação nos tratamentos do solo para compreender seu efeito no processo de biorremediação. Além disso, a variação observada nos consórcios pode ser atribuída à predominância de um fungo sobre o outro durante o cultivo do inóculo, um aspecto que poderá ser investigado no futuro através de dados de sequenciamento de nova geração (NGS), especialmente por meio de abordagens como metabarcoding ou metagenômica.

## **5.5 Tratamento do solo agrícola contaminado com atrazina a partir do inoculante em um sistema de microcosmos**

Em estudos prévios conduzidos pelo grupo, os fungos *P. lilacinum* CCMIBA\_R014, *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_R111 e *C. rosea* CCMIBA\_R018, quando avaliados isoladamente e em condições *in vitro*, demonstraram capacidade de reduzir as concentrações de atrazina em 46 %, 63 % e 68 %, respectivamente (RAHMEIER BONASSA, 2021). Esses resultados foram determinantes para a seleção desses fungos como foco deste trabalho.

Os microcosmos com solo agrícola foram inoculados com o consórcio TI2 e incubados por 24 dias, sendo ME1 o tratamento do solo agrícola autoclavado e seu respectivo controle negativo (ME1c) e ME2 o tratamento do solo agrícola sem esterilização e seu respectivo controle negativo (ME2c). Nos dois tratamentos a adição do consórcio foi capaz de reduzir a concentração da atrazina (Gráfico 7), sendo a maior redução do tratamento do solo não esterilizado com concentração final de ATZ de 73,1 mg/kg no ME2 e 216,60 mg/kg ME2c (controle negativo, sem adição do inoculante). As amostras após 24 dias de incubação do ensaio ME1 obteve 34 % menos ATZ comparado

ao ensaio controle (ME1c) e o ensaio ME2 67 % menos ATZ comparado ao ensaio controle (ME2c).

É relevante ressaltar que a concentração inicial de atrazina adicionada nos ensaios foi uniforme. No entanto, através dos controles negativos, foi possível observar que a degradação natural da atrazina, mediada por fatores físicos e químicos, como a interação com o carvão ativado, apresentou variações. Mesmo na ausência de inoculante, constatou-se uma redução significativa da concentração de atrazina no controle do solo esterilizado (ME1c), sugerindo um efeito considerável atribuído possivelmente à presença do carvão ativado. Por outro lado, na presença da microbiota nativa do solo, esse efeito não foi observado (ME2c).

Clay *et al.* (2016) conduziram uma análise da adsorção e eficácia de herbicidas em solos tratados com diferentes quantidades de carvão ativado, produzido a partir de distintas matérias-primas. Foi constatado que os solos tratados com carvão ativado apresentaram maior capacidade de adsorção de herbicidas em comparação com os solos não tratados. Observou-se que as diferenças significativas na adsorção estavam relacionadas principalmente à taxa de aplicação do carvão ativado, enquanto as variações devido ao tipo de carvão ou técnica de processamento pós-produção foram menos pronunciadas. Esses resultados sugerem que a adição de condicionante ao solo pode potencializar a adsorção de herbicidas, uma hipótese que possivelmente se confirmou no ensaio ME1c.

O ensaio ME2 se aproxima mais da técnica de bioaugmentação esperada do bioinoculante. No entanto, é reconhecido que a eficácia dos fungos inoculados depende tanto da sua capacidade de competir com os micro-organismos nativos quanto de sua habilidade de crescimento e produção enzimática para degradar os compostos químicos presentes (Chan-Cupul; Heredia-Abarca; Rodríguez-Vázquez, 2016; Magan; Fragoeiro; Bastos, 2010a). Estudos mostram que o carvão ativado tem potencial para remediação de herbicidas, como o derivado de esterco leiteiro, que removeu 77 % de ATZ, no entanto também foi observado que a capacidade de adsorção do carvão ativado é dependente da sua matéria-prima (GUJRE *et al.*, 2021). Outro estudo demonstrou que também é possível remover ATZ do solo através da bio-aumentação combinada entre carvão ativado e cepas que degradam o herbicida (JIA *et al.*, 2021), similar ao presente estudo.

Além da concentração de ATZ mais de 30 fatores físicos-químicos do solo foram analisados, como por exemplo, o pH, P, Mg, Ca, Matéria orgânica, Carbono orgânico total, entre outros, esses fatores são utilizados para calcular a fertilidade dos solos

(NGUEMEZI *et al.*, 2020). Para facilitar a avaliação foi realizada uma análise estatística dos resultados e 14 parâmetros apresentaram diferenças estatísticas significativas (Apêndice B, Tabelas 4 e 5).

**Tabela 4** - Resultados das análises físico-químicas do solo dos microcosmos EM1, EM1c, EM2 e EM2c após 24 dias de incubação em casa de vegetação

Fatores Físico-Químicos	EM1	EM1c	EM2	EM2c
pH (CaCl <sub>2</sub> ) (Un.)	5,6	5,4	5,6	5,3
Ca (cmolc/dm <sup>3</sup> )	5,7	5,6	6,1	6,6
Mg (cmolc/dm <sup>3</sup> )	1,6	1,3	1	1
Ca+Mg (cmolc/dm <sup>3</sup> ) *	7,3	6,9	7,1	7,6
Al (cmolc/dm <sup>3</sup> )	0	0	0	0
H+Al (cmolc/dm <sup>3</sup> ) *	1,9	2,8	2,1	2,5
CTC (cmolc/dm <sup>3</sup> ) *	9,73	10,24	9,73	10,63
P (Mehlich I) (mg/dm <sup>3</sup> ) *	7	2	6	1,4
K (cmolc/dm <sup>3</sup> )	0,53	0,537	0,53	0,527
K (mg/dm <sup>3</sup> )	206	210	206	206
Na (mg/dm <sup>3</sup> )	1	1	1	1
S (mg/dm <sup>3</sup> ) *	6	5	5	4
B (mg/dm <sup>3</sup> )	0,26	0,28	0,25	0,26
Cu (mg/dm <sup>3</sup> )	4,3	4,5	4,4	4,5
Fe (mg/dm <sup>3</sup> ) *	60	45	46	48
Mn (mg/dm <sup>3</sup> )	95	98	88	83
Zn (mg/dm <sup>3</sup> )	4,6	4,5	4,6	4,2
pH (H <sub>2</sub> O) (.)	6	5,9	6,1	5,8
Mat. Org. (%)	0,7	1	1	1,2
Mat. Org. (g/kg) *	7	10	10	12
Sat. Al (M%) (%)	0	0	0	0
Sat. Base (V%) (%) *	81	73	79	77
Ca/Mg (.) *	3,6	4,3	6,1	6,6
Ca/CTC (%) *	58,8	54,9	62,9	62,3
Mg/CTC (%)	16,5	12,7	10,3	9,4
(H+Al)/CTC (%) *	19,6	27,5	21,6	23,6
K/CTC (%)	5,4	5,3	5,4	5
N (%)	0	0,1	0,1	0,1
Cd (mg/kg)	0,1	0,2	0,1	0,1
Cr (mg/kg)	0,1	0,1	0,1	0,1
Ni (mg/kg)	0,3	0,1	0,1	0,1
Pb (mg/kg)	0,3	0,3	0,2	0,4
Se* (mg/Kg)	0	n.d	0	n.d
C. Org. Tot. (%) *	0,41	0,58	0,58	0,7
Hg (mg/Kg) *	0	n.d	0	n.d

As (mg/Kg) *	0	n.d	0	n.d
--------------	---	-----	---	-----

**Nota explicativa:** \* p-valor <0,05.

**Fonte:** da autora, 2024.

Foi constatado um incremento significativo nos níveis de fósforo (P) nutricional, quando comparados com seus respectivos ensaios controle. O fósforo é reconhecido como um dos principais nutrientes essenciais para promover a fertilidade do solo, desempenhando um papel crucial no armazenamento e transferência de energia gerada durante a fotossíntese pelas plantas (Parecido *et al.*, 2021). Estudos anteriores evidenciam que a incorporação de carvão ativado no solo pode aumentar a disponibilidade de fósforo (NG *et al.*, 2022). Em nosso estudo, a introdução do bioinoculante possivelmente potencializou essa disponibilidade, complementando o efeito conhecido do carvão ativado, aumentando a nutrição do solo.

Os macronutrientes N, K, Ca, Mg e S são os nutrientes mais bem absorvidos pelas plantas e são considerados essenciais para o desenvolvimento vegetal. Em nosso estudo o S apresentou maior concentração nos ensaios EM1 e EM2 comparado aos ensaios controle. Adicionar o carvão ativado no solo é visto como uma estratégia de melhorar os níveis de S e P no solo (GHODSZAD *et al.*, 2021), incluindo a utilização de bioinoculantes fúngicos, como confirmado no presente trabalho. Embora as evidências sugiram que tanto os bioinoculantes fúngicos quanto o carvão ativado possam impactar positivamente a fertilidade do solo, é essencial reconhecer que a eficácia desses métodos pode variar com base em fatores como a composição do solo, as espécies de fungos e o tipo específico de carvão ativado empregado. Assim, são necessárias mais pesquisas para compreender de forma abrangente a eficácia dessas abordagens e suas implicações para a saúde das plantas e a produtividade agrícola.

## 6 CONCLUSÃO

Conclui-se que os fungos estudados demonstraram tolerância ao carvão ativado, conseguindo sobreviver, crescer e produzir as enzimas LiP, Lac e MnP. No entanto, a produção dessas enzimas variou conforme as condições de cultivo e a presença do carvão ativado. Para um bom crescimento fúngico no carvão, a quantidade de biomassa inoculada foi crucial. A umidificação também se mostrou necessária; no entanto, observou-se que o excesso de umidade foi prejudicial aos fungos. Após a obtenção do consórcio, observou-se um aumento de biomassa. No entanto, análises futuras serão necessárias para compreender melhor o efeito da associação no crescimento de cada fungo no carvão ativado.

Os resultados obtidos são fundamentais para os próximos passos da pesquisa, que incluem a análise do consórcio por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para examinar o comportamento dos fungos no carvão ativado como meio de suporte e no solo. Além disso, serão realizados ensaios com tempos de exposição mais prolongados do solo ao agrotóxico e diferentes períodos de incubação do consórcio no solo. Também será analisado o comportamento do carvão ativado isoladamente na degradação da ATZ. Além disso, o bioinoculante será testado em escalas maiores, como em vasos e cultivos vegetais.

Por fim, Este estudo apresenta uma abordagem inovadora para a biorremediação do solo, utilizando um consórcio de fungos e carvão ativado. Ele não apenas abre novos caminhos para a aplicação de bioinoculantes, mas também levanta novas questões sobre os processos de tratamento do solo e as interações microbianas.

## 7 BIBLIOGRAFIA

AARTI, C.; ARASU, M. V.; AGASTIAN, P.. *Lignin degradation: a microbial approach*. **South Indian Journal of Biological Sciences**, v. 01, n. 03, p. 119, 01 dez. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.22205/sijbs/2015/v1/i3/100405>>.

ALENGEBAWY, A. et al.. *Heavy metals and pesticides toxicity in agricultural soil and plants: ecological risks and human health implications*. **Toxics**, v. 9, n. 3, p. 42, 25 fev. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/toxics9030042>>.

ALKHARABSHEH, H. M. et al.. *Revitalizing the biochemical soil properties of degraded coastal soil using Prosopis juliflora biochar*. **Life**, v. 13, n. 10, p. 2098, 22 out. 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/life13102098>>.

AZUBUIKE, C. C.; CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C.. *Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 11, p. 01-18, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x>>.

BALDRIAN, P.. *Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis*. **Plant, Soil and Environment**, v. 55, n. 09, p. 370-378, 14 out. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.17221/134/2009-PSE>>.

BALTIERRA-TREJO, E.; MÁRQUEZ-BENAVIDES, L.; SÁNCHEZ-YÁÑEZ, J. M.. *Inconsistencies and ambiguities in calculating enzyme activity: the case of laccase*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 119, p. 126-131, dez. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.10.007>>.

BARCHANSKA, H. et al.. *Atrazine, triketone herbicides, and their degradation products in sediment, soil and surface water samples in Poland*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 01, p. 644-658, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-016-7798-3>>.

BATJES, N. H.. *Total carbon and nitrogen in the soils of the world*. **European Journal of**

**Soil Science**, v. 47, n. 02, p. 151-163, 1996. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1996.tb01386.x>>.

BEAUMELLE, L.; DE LAENDER, F.; EISENHAUER, N.. *Biodiversity mediates the effects of stressors but not nutrients on litter decomposition*. **BioRxiv**, p. 01-40, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.7554/eLife.55659>>.

BEESLEY, L. *et al.*. *A review of biochars' potential role in the remediation, revegetation and restoration of contaminated soils*. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 12, p. 3269-3282, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.07.023>>.

BERTINI, S. C. B.; AZEVEDO, L. C. B.. *Soil microbe contributions in the regulation of the global carbon cycle*. In: **Microbiome Under Changing Climate**. [s.l.] Elsevier, 2022, p. 69-84. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90571-8.00003-1>>.

BITTENCOURT, M. V. L.. Impactos da agricultura no meio ambiente: principais tendências e desafios (Parte 2). **Revista Economia & Tecnologia**, v. 06, n. 01, p. 157-168, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5380/ret.v6i1.27031>>.

BONAGLIA, S. *et al.*. *Activated carbon stimulates microbial diversity and PAH biodegradation under anaerobic conditions in oil-polluted sediments*. **Chemosphere**, v. 248, p. 126023, jun. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126023>>.

BONASSA, G. R.. **Seleção de fungos para o desenvolvimento de bioinoculante para biorremediação de solos agrícolas impactados com atrazina**. Orientadores: SANTOS, Rafaella Costa Bonugli (orientadora). 65 f.. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Curso de Graduação (Bacharelado em Biotecnologia), UNILA (Universidade Federal da Integração Latino-Americana), Foz do Iguaçu, 2021. Disponível em: <<https://dspace.unila.edu.br/handle/123456789/6227>>.

BROZZOLI, V. *et al.*. *Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by Candida cylindracea in bench-top reactor*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 13, p. 3395-3402, jul. 2009. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.022>>.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y.; CHANG, S.. *Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by Lentinula (Lentinus) edodes*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, n. 01, p. 81-87, abr. 1995. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00087-L](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00087-L)>.

CADWALADER, G. O. et al.. *Erosion and physical transport via overland flow of arsenic and lead bound to silt-sized particles*. **NIH Public Access**, v. 128, p. 85-91, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2010.12.025>>.

CAMACHO-MORALES, R. L. et al.. *Producción de enzimas ligninolíticas durante la degradación del herbicida paraquat por hongos de la pudrición blanca*. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 49, n. 02, p. 189-196, abr. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.11.004>>.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.. **The fungi**. London: Academic Press, 1997.

CATANI, R. A. et al.. Amostragem de solo para estudos de fertilidade. **Bragantia**, v. 14, n. único, p. 19-26, 1955. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/brag/a/w9K7crzCDLhR8TYrmGzspHb/?lang=pt&format=pdf>>.

CHAN-CUPUL, W.; HEREDIA-ABARCA, G.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.. *Atrazine degradation by fungal co-culture enzyme extracts under different soil conditions*. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 51, n. 05, p. 298-308, 03 maio 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1128742>>.

CHEN, J. Y.; SONG, Y.; ZHANG, L. S.. *Immunotoxicity of atrazine in Balb/c mice*. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 48, n. 08, p. 637-645, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/03601234.2013.777308>>.

CHEN, L. et al.. *Heavy metals in agricultural soils of the lihe river watershed, east China: spatial distribution, ecological risk, and pollution source*. **International Journal of**

*Environmental Research and Public Health*, v. 16, n. 12, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijerph16122094>>.

CHEN, S. *et al.*. *Plant diversity enhances productivity and soil carbon storage. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 115, n. 16, p. 4027-4032, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1700298114>>.

CLAY, S. A. *et al.*. *Maize, switchgrass, and ponderosa pine biochar added to soil increased herbicide sorption and decreased herbicide efficacy. Journal of Environmental Science and Health, Part B*, v. 51, n. 08, p. 497-507, 02 ago. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/03601234.2016.1170540>>.

CORREA, J. *et al.*. *Soil compaction and the architectural plasticity of root systems. Journal of Experimental Botany*, v. 70, n. 21, p. 6019-6034, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jxb/erz383>>.

CROSSLAND, M. *et al.*. *Implications of variation in local perception of degradation and restoration processes for implementing land degradation neutrality. Environmental Development*, v. 28, n. november 2017, p. 42-54, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envdev.2018.09.005>>.

DAS, S. *et al.*. *Is inclusion of Sabouraud dextrose agar essential for the laboratory diagnosis of fungal keratitis?. Indian Journal of Ophthalmology*, v. 58, n. 04, p. 281, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.4103%2F0301-4738.64122>>.

DE SOUZA, F. A.; SCHLEMPER, T. R.; STÜRMER, S. L.. A importância da tecnologia de inoculação de fungos micorrízicos para a sustentabilidade na olericultura. *In*: LOPES, C. A.; PEDROSO, M. T. M. (ed.). **Sustentabilidade e horticultura no Brasil: da retórica à prática**. Brasília, DF: Embrapa, 2017, p. 223-251. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1074417>>.

DEACON, J.. *Fungal Biology*. 4. ed.. *Main Street: Balckwell*, 2006, 384 p..

DECHEN, S. C. F. *et al.*. Perdas e custos associados à erosão hídrica em função de taxas de cobertura do solo. **Bragantia**, v. 74, n. 02, p. 224-233, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.0363>>.

DHANKHAR, R.; HOODA, A.. *Fungal biosorption-an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions*. **Environmental Technology**, v. 32, n. 05, p. 467-491, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09593330.2011.572922>>.

DIAS, C.. **Estudo revela que 30% dos solos do mundo estão degradados**. Rio de Janeiro: Embrapa, 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/14343883/estudo-revela-que-30-dos-solos-do-mundo-estao-degradados>>. Acesso em: 08 jun. 2021.

DIGHTON, J.. **Fungi in ecosystem processes**. 17. ed.. New York: Marcel Dekker, Inc., 2003.

DORAN, J. W.; PARKIN, T. B.. **Defining and assessing soil quality**. 35. ed. Madison: SSSA special publication, 1994.

DOS SANTOS, E. A. *et al.*. *Arbuscular mycorrhizal fungi activity in the rhizosphere of tree seedlings subjected to residual herbicides*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. 01-09, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1519-6984.242676>>.

DZIOŃEK, A.; WOJCIESZYŃSKA, D.; GUZIK, U.. *Natural carriers in bioremediation: a review*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 28-36, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.07.003>>.

ELD INITIATIVE. **The economics of land degradation initiative: reaping economic and environmental benefits from sustainable land management**. [s. l.]: ELD, p. 24, 2015. Disponível em: <[http://www.eld-initiative.org/fileadmin/pdf/ELD-pm-report\\_05\\_web\\_300dpi.pdf](http://www.eld-initiative.org/fileadmin/pdf/ELD-pm-report_05_web_300dpi.pdf)>. Acesso em: 08 jun. 2021.

ELGUETA, S. *et al.*. *Immobilization of the white-rot fungus *Anthraco-phyl-lum discolor* to degrade the herbicide atrazine*. **AMB Express**, v. 06, n. 01, p. 104, 04 dez. 2016.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13568-016-0275-z>>.

EMBRAPA. **Solo**: substrato da vida. 1. ed.. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. Disponível em: <<https://www.bibliotecaagp.tea.org.br/agricultura/solos/livros/SOLO%20SUBSTRATO%20DA%20VIDA.pdf>>.

ERGUVEN, G. O.; DEMIRCI, U.. *Statistical evaluation of the bioremediation performance of Ochrobactrum thiophenivorans and Sphingomonas melonis bacteria on Imidacloprid insecticide in artificial agricultural field. J. Environ Health Sci. Engineer*, v. 18, p. 395-402, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007%2Fs40201-019-00391-w>>.

FALADE, A. O. *et al.*. *Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. MicrobiologyOpen*, v. 06, n. 01, p. e00394, fev. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002%2Fmbo3.394>>.

FARIA, G.. **Biocarvão feito com resíduos é testado como condicionador de solo**. Rio de Janeiro: Embrapa, 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/28595289/biocarvao-feito-com-residuos-e-testado-como-condicionador-de-solo>>. Acesso em: 30 jul. 2021a.

FERNANDO, G.. **Pesquisadores geram mapas de suscetibilidade e vulnerabilidade dos solos brasileiros à erosão hídrica**. Rio de Janeiro: Embrapa, 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/58207136/pesquisadores-geram-mapas-de-suscetibilidade-e-vulnerabilidade-dos-solos-brasileiros-a-erosao-hidrica>>.

Acesso em: 02 abr. 2021.

FILHO, G. N. S.; OLIVEIRA, V. L. DE. **Microbiologia**: manual de aulas práticas. 2. ed.. Florianópolis: UFSC, 2007.

FILIMON, M. N. *et al.*. *The effect of some insecticides on soil microorganisms based on enzymatic and bacteriological analyses. Romanian Biotechnological Letters*, v. 20, n. 03, p. 10439-10447, 2015.

FRANCISCO, W. C.; QUEIROZ, T. M. de.. Biorremediação. **Nucleus**, v. 15, n. 01, p. 249-256, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3738/1982.2278.1700>>.

FREITAS, C. S. DE *et al.*. **Qualidade da serapilheira em floresta tropical com *Bertholletia excelsa***. In: Semana de Iniciação Científica do IFAC, 5., 2015. Rio Branco. Anais... Rio Branco: Proinp/Ifac, 2015. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1037564>>.

GARDEN, H. I. *et al.*. **Bula atrazina SD 500 SC**: registro nº 31818. Brasília: MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), 2018.

GCSE, A.; A. L. G. R.. **Geography revision: different types of agricultural activity**. London, UK: BBC, 2024. Disponível em: <<https://geography-revision.co.uk/gcse/agriculture/types-of-agricultural-activity/>>. Acesso em: 06 jul. 2021.

GENCHI, G, CAROCCI, A, *et al.*. *The effects of toxicity*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. Cd, p. 01-24, 2020.

GIONGO, V.; CUNHA, T. J. F.. Manejo do solo. **Embrapa Semiárido**, ago. 2010. Disponível em: <[http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/sistema\\_producao/spmelao/manejo\\_do\\_solo.html#:~:text=Um solo ideal para o,de nutrientes%2C sem excesso de](http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/sistema_producao/spmelao/manejo_do_solo.html#:~:text=Um%20solo%20ideal%20para%20o,de%20nutrientes%20sem%20excesso%20de)>. Acesso em: 06 abr. 2021.

GOUDA, S. *et al.*. *Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture*. **Microbiological Research**, v. 206, n. april 2017, p. 131-140, jan. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>>.

GREGORY, S. J. *et al.*. *Biochar in co-contaminated soil manipulates arsenic solubility and microbiological community structure, and promotes organochlorine degradation*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 04, p. 01-18, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125393>>.

GUERRA, C. A. *et al.*. *Global vulnerability of soil ecosystems to erosion*. **Landscape Ecology**, v. 35, n. 04, p. 823-842, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10980->

[020-00984-z](#)>.

GUO, M.; SONG, W.; TIAN, J.. *Biochar-facilitated soil remediation: mechanisms and efficacy variations*. **Frontiers in Environmental Science**, v. 08, 21 out. 2020.

GUO, S.; LIU, X.; TANG, J.. *Enhanced degradation of petroleum hydrocarbons by immobilizing multiple bacteria on wheat bran biochar and its effect on greenhouse gas emission in saline-alkali soil*. **Chemosphere**, v. 286, p. 131663, jan. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131663>>.

GUO, X. *et al.*. *Effects of land use change on the composition of soil microbial communities in a managed subtropical forest*. **Forest Ecology and Management**, v. 373, p. 93-99, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2016.03.048>>.

HAGNER, M. *et al.*. *Effects of a glyphosate-based herbicide on soil animal trophic groups and associated ecosystem functioning in a northern agricultural field*. **Scientific Reports**, v. 09, n. 01, p. 01-13, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-44988-5>>.

HAIDER, F. U. *et al.*. *Biochar application for remediation of organic toxic pollutants in contaminated soils; an update*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 248, p. 114322, dez. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114322>>.

HAMMER, E. C. *et al.*. *A mycorrhizal fungus grows on biochar and captures phosphorus from its surfaces*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 77, p. 252-260, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.06.012>>.

HANSEN, A. M. *et al.*. *Atrazina: un herbicida polémico*. **Revista Internacional de Contaminacion Ambiental**, v. 29, n. SPEC.ISSUE, p. 65-84, 2013. Disponível em: <<https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/41420>>.

HAYES, T. 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. 4612-4617, 2010. Disponível

em: <<https://doi.org/10.1073%2Fpnas.0909519107>>.

HE, H. *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, p. 5129, 16 dez. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390%2Fijerph16245129>>.

HENN, C. *et al.*. Biodegradation of atrazine and ligninolytic enzyme production by basidiomycete strains. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 01, p. 01-12, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186%2Fs12866-020-01950-0>>.

HILLEL, D.. *Soil Formation*. In: HILLEL, D.. **Soil in the Environment**. Cambridge, USA: Academic Press, p. 15-26, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/C2009-0-00041-5>>.

HOPPE, J. M.; SCHUMACHER, M. V.. **A floresta e o solo**. 3. ed.. Santa Cruz do Sul: Afubra, 1997.

HU, J. *et al.*. Biochar and *Glomus caledonium* influence cd accumulation of upland kangkong (*Ipomoea aquatica* forsk.) intercropped with alfred stonecrop (*Sedum alfredii* hance). **Scientific Reports**, v. 04, n. 01, p. 4671, 14 abr. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/srep04671>>.

HUANG, X. FENG *et al.*. The effects of biochar and dredged sediments on soil structure and fertility promote the growth, photosynthetic and rhizosphere microbial diversity of *Phragmites communis* (Cav.) Trin. ex Steud. **Science of the Total Environment**, v. 697, p. 134073, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134073>>.

INC., B. S.. **Biochar solutions**. Lafayette, USA: Biochar solutions. Disponível em: <<http://www.biocharsolutions.com/overview.html>>. Acesso em: 26 jul. 2021.

JABLONOWSKI, N. D. *et al.*. Biochar-mediated [ 14 C] atrazine mineralization in atrazine-adapted soils from Belgium and Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 03, p. 512-516, 23 jan. 2013. Disponível em:

<<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf303957a>>.

JABLONOWSKI, N. D.; SCHÄFFER, A.; BURAUDEL, P.. *Still present after all these years: persistence plus potential toxicity raise questions about the use of atrazine*. **Environ Sci. Pollut Res.**, p. 328-331, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-010-0431-y>>.

JAMES, C.. **Biochar and reclaiming urban soils**. Seattle, USA: Nakano Associates. Disponível em: <<http://www.nakanoassociates.com/biochar/>>. Acesso em: 31 jul. 2021.

JAVOID, M. K.; ASHIQ, M.; TAHIR, M.. *Potential of biological agents in decontamination of agricultural soil*. **Scientifica**, v. 2016, n. 01, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155%2F2016%2F1598325>>.

JAVARONI, R. DE C. A.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O.. Comportamento dos herbicidas atrazina e alaclor aplicados em solo preparado para o cultivo de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 58-64, 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40421999000100012>>.

JUWARKAR, A. A.; SINGH, S. K.; MUDHOO, A.. *A comprehensive overview of elements in bioremediation*. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 09, n. 03, p. 215-288, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11157-010-9215-6>>.

KADRI, T. *et al.*. *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: a review*. **Journal of Environmental Sciences**, v. 51, p. 52-74, jan. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.08.023>>.

KAPLEY, A.; PUROHIT, H. J.. *Genomic tools in bioremediation*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 02, p. 108-113, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007%2Fs12088-009-0012-2>>.

KOPITTKER, P. M. *et al.*. *Soil and the intensification of agriculture for global food security*. **Environment International**, v. 132, n. July, p. 105078, 2019a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105078>>.

KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA, T.; RYBCZYŃSKA-TKACZYK, K.. *Growth conditions, physiological properties, and selection of optimal parameters of biodegradation of anticancer drug daunomycin in industrial effluents by Bjerkandera adusta CCBAS930. International Microbiology*, v. 23, n. 02, p. 287-301, 12 maio 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10123-019-00102-3>>.

KRZMARZICK, M. J. et al.. *Diversity and niche of archaea in bioremediation. Archaea*, v. 2018, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2018/3194108>>.

KUMAR, A.; CHANDRA, R.. *Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. Heliyon*, v. 06, n. 02, p. e03170, fev. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03170>>.

LAURITSEN, F. R.; KOTIAHO, T.; LLOYD, D.. *Rapid and direct monitoring of volatile fermentation products in the fungus Bjerkandera adusta by membrane inlet tandem mass spectrometry. Biological Mass Spectrometry*, v. 22, n. 10, p. 585-589, out. 1993. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/bms.1200221005>>.

LIMA, J. R. DE S. et al.. *Biochar increases soil water content and total organic carbon but has no effects on soil respiration in a Regosol of Caatinga. Revista Brasileira de Geografia Física*, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.26848/rbgf.v13.07.p3448-3458>>.

LIN, Z. et al.. *Effects of two ecological earthworm species on atrazine degradation performance and bacterial community structure in red soil. Chemosphere*, v. 196, p. 467-475, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.177>>.

LYON, F.. *Some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances*. Genebra, Suíça: World Health Organization, 1999. v. 73. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK402050/>>.

MACDONALD, C. A. et al.. *Soil nutrients and soil carbon storage: modulators and mechanisms*. In: SINGH, Brajesh K. (ed.). *Soil Carbon Storage: modulators, mechanisms*

*and modeling*. Cambridge, EUA: *Academic Press*, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812766-7.00006-8>>.

MACHADO, P. L. O. de A.. Carbono do solo e a mitigação da mudança climática global. **Química Nova**, v. 28, n. 02, p. 329-334, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000200026>>.

MAGAN, N.; FRAGOEIRO, S.; BASTOS, C.. *Environmental factors and bioremediation of xenobiotics using white rot fungi*. **Mycobiology**, v. 38, n. 04, p. 238, 2010a. Disponível em: <<https://doi.org/10.4489%2FMYCO.2010.38.4.238>>.

MALUSÁ, E. *et al.*. *Monitoring of DDT in agricultural soils under organic farming in Poland and the risk of crop contamination*. **Environmental Management**, v. 66, n. 05, p. 916-929, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00267-020-01347-9>>.

MAMARABADI, M. *et al.*. *Real-time RT-PCR expression analysis of chitinase and endoglucanase genes in the three-way interaction between the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726, *Botrytis cinerea* and strawberry*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 285, n. 01, p. 101-110, ago. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01228.x>>.

MARTINS, K. G. *et al.*. *Effects of soil conditions on the diversity of tropical forests across a successional gradient*. **Forest Ecology and Management**, v. 349, p. 04-11, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.04.018>>.

MEGHARAJ, M.; NAIDU, R.. *Soil and brownfield bioremediation*. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 05, p. 1244-1249, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111%2F1751-7915.12840>>.

MEURER, K. *et al.*. *A framework for modelling soil structure dynamics induced by biological activity*. **Global Change Biology**, v. 26, n. 10, p. 5382-5403, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/gcb.15289>>.

MOUGIN, C. *et al.*. *Biotransformation of the herbicide atrazine by the white rot fungus*

*Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 02, p. 705-708, 1994. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128%2Faem.60.2.705-708.1994>>.

MÜH, F.; ZOUNI, A.. *Structural basis of light-harvesting in the photosystem II core complex*. **Protein Science**, v. 29, n. 05, p. 1090-1119, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/pro.3841>>.

NEEDELMAN, B. A.. **What Are Soils?**. *Nature Education Knowledge*, v. 4, n. 3. Disponível em: <<https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/what-are-soils-67647639/>>. Acesso em: 8 jul. 2021.

NELSON, D. L.; COX, M. M.. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed.. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NG, C. W. W. *et al.*. *Effects of phosphorus-modified biochar as a soil amendment on the growth and quality of Pseudostellaria heterophylla*. **Scientific Reports**, v. 12, n. 01, p. 7268, 04 maio 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-022-11170-3>>.

NGUEMEZI, C. *et al.*. *Soil quality and soil fertility status in major soil groups at the Tombel area, South-West Cameroon*. **Heliyon**, v. 06, n. 02, p. e03432, fev. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03432>>.

NIE, X. J.; ZHANG, H. B.; SU, Y. Y.. *Soil carbon and nitrogen fraction dynamics affected by tillage erosion*. **Scientific Reports**, v. 09, n. 01, p. 01-08, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-53077-6>>.

NRIAGU, J.. **Encyclopedia of environmental health**. Amsterdam: Oliver Walter, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/referencework/9780444522726/encyclopedia-of-environmental-health>>.

ODDS, F. C.. *Sabouraud('s) agar*. **Medical Mycology**, v. 29, n. 06, p. 355-359, jan. 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/02681219180000581>>.

OJUEDERIE, O. B.; BABALOLA, O. O.. *Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: a review*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 12, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijerph14121504>>.

ONU. **População mundial deve chegar a 9,7 bilhões de pessoas em 2050, diz relatório da ONU**. New York, USA: ONU, 2019. Disponível em: <<https://brasil.un.org/pt-br/83427-populacao-mundial-deve-chegar-97-bilhoes-de-pessoas-em-2050-diz-relatorio-da-onu>>. Acesso em: 19 abr. 2021.

OSTREM LOSS, E. M.; YU, J. H.. *Bioremediation and microbial metabolism of benzo(a)pyrene*. **Molecular Microbiology**, v. 109, n. 04, p. 433-444, ago. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/mmi.14062>>.

OTHMAN, A. M. *et al.*. *Ligninolytic enzymes and their potential applications (editorial)*. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 10 jul. 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1235206>>.

OWEN, D. *et al.*. *Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorous acquisition*. **Applied Soil Ecology**, v. 86, p. 41-54, fev. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.09.012>>.

PARECIDO, R. J. *et al.*. *Limestone increased coffee yield and profitability more than phosphogypsum or their combination*. **Agronomy Journal**, v. 113, n. 04, p. 3586-3599, 15 jul. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/agj2.20712>>.

PENA, R. F. A.. **Formação dos solos**. São Paulo: UOL, [s.d.]. Disponível em: <<https://mundoeducacao.uol.com.br/geografia/formacao-dos-solos.htm>>. Acesso em: 17 maio. 2021.

PEREIRA, J. C. V.; SERBENT, M. P.; SKORONSKI, E.. *Application of immobilized mycelium-based pellets for the removal of organochlorine compounds: a review*. **Water Science and Technology**, v. 83, n. 08, p. 1781-1796, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.2166/wst.2021.093>>.

PESHIN, R.; DHAWAN, A. K.. *Integrated pest management*. **Integrated Pest Management**, v. 01, p. 01-689, 2009.

PHILIPPOT, L. *et al.*. *Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 789-799, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>>.

PIRES, L. A.; BRITZ, R. M. de; MARTEL, G.; PAGANOL, S. N.. Produção, acúmulo e decomposição da serapilheira em uma restinga da Ilha do Mel, Paranaguá, PR, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 20, n. 01, p. 173-184, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-33062006000100016>>.

POTHULA, S. K. *et al.*. *Agricultural intensification and urbanization negatively impact soil nematode richness and abundance: a meta-analysis*. **Journal of Nematology**, v. 51, n. 01, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.21307%2Fjofnem-2019-011>>.

QI, G. *et al.*. *Microbial network and soil properties are changed in bacterial wilt-susceptible soil*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 13, p. 01-15, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/aem.00162-19>>.

RADOSEVICH, M.; TRAINA, S. J.; TUOVINEN, O. H.. *Degradation of binary and ternary mixtures of s-triazines by a soil bacterial isolate*. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 30, n. 04, p. 457-471, 1995. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03601239509372947>>.

RESENDE, T. M. *et al.*. Atributos físicos e carbono orgânico em solo sob Cerrado convertido para pastagem e sistema misto. **Sociedade & Natureza**, v. 27, n. 03, p. 501-513, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1982-451320150310>>.

RODRÍGUEZ, M. A. *et al.*. *Clonostachys rosea BAF3874 as a Sclerotinia sclerotiorum antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 05, p. 1177-1186, maio 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04970.x>>.

ROMAN, E. S. *et al.*. **Como funcionam os herbicidas da biologia à aplicação: da biologia à aplicação**. Passo Fundo: Gráfica Editora Berthier, 2007.

ROMANO, I.; VENTORINO, V.; PEPE, O.. *Effectiveness of plant beneficial microbes: overview of the methodological approaches for the assessment of root colonization and persistence*. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 31 jan. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389%2Ffpls.2020.00006>>.

RONQUIM, C. C.. Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento n. 8**, v. 26, p., 2010. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1128267>>.

SABATIER, P. *et al.*. *Long-term relationships among pesticide applications , mobility , and soil erosion in a vineyard watershed*. **Agricultural Sciences**, v. 111, n. 44, p. 15647-15652, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1411512111>>.

SAINJU, U. M.; WHITEHEAD, W. F.; SINGH, B. P.. *Agricultural management practices to sustain crop yields and improve soil and environmental qualities*. **Scientific World Journal**, v. 03, p. 768-789, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1100%2Ftsw.2003.62>>.

SANDERSON, J. T. *et al.*. *2-chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity?*. **Toxicological Sciences**, v. 54, n. 01, p. 121-127, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/toxsci/54.1.121>>.

SANTOS, H. G. dos *et al.*. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 5. ed., re ed. Brasília, DF: Embrapa, 2018. 356 p., 2018. Disponível em: <<https://www.agroapi.cnptia.embrapa.br/portal/assets/docs/SiBCS-2018-ISBN-9788570358004.pdf>>.

SCHLATTER, D. C. *et al.*. *Impacts of repeated glyphosate use on wheat-associated bacteria are small and depend on glyphosate use history*. v. 83, n. 22, p. 1–16, 2017.

SENE, L. *et al.*. *New aspects on atrazine biodegradation*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 02, p. 487-496, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000200030>>.

SESSITSCH, A. *et al.*. *Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 09, p. 4215-4224, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/aem.67.9.4215-4224.2001>>.

SHARMA, J. K. *et al.*. *Advances and perspective in bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soils*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 17, p. 16355-16375, 09 jun. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-017-8995-4>>.

SHEHATA, H. R.; HASSANE, B.; NEWMASER, S. G.. *Real-time polymerase chain reaction methods for strain specific identification and enumeration of strain *Lactisacibacillus paracasei* 8700:2*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 18 jan. 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1076631>>.

SHENG, Y. *et al.*. *Broad-leaved forest types affect soil fungal community structure and soil organic carbon contents*. **MicrobiologyOpen**, v. 08, n. 10, p. 01-14, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/mbo3.874>>.

SILVA, V. *et al.*. *Pesticide residues in European agricultural soils – a hidden reality unfolded*. **Science of the Total Environment**, v. 653, p. 1532-1545, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.441>>.

SINDIVEG. **Mercado total de defensivos agrícolas por produto aplicado**. São Paulo: SINDIVEG, 2024. Disponível em: <<https://sindiveg.org.br/mercado-total/>>. Acesso em: 09 abr. 2021.

SINGH, A. K. *et al.*. *Bioremediation of lignin derivatives and phenolics in wastewater with lignin modifying enzymes: status, opportunities and challenges*. **Science of The Total**

**Environment**, v. 777, p. 145988, jul. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145988>>.

SISTA KAMESHWAR, A. K.; QIN, W.. *Comparative study of genome-wide plant biomass-degrading CAZymes in white rot, brown rot and soft rot fungi*. **Mycology**, v. 09, n. 02, p. 93-105, 03 abr. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080%2F21501203.2017.1419296>>.

SOARES, I. A. *et al.*. Fungos na biorremediação de áreas degradadas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 02, p. 341-350, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1808-1657v78p3412011>>.

SONG, L. *et al.*. *Effect of biochar-immobilized Sphingomonas sp. PJ2 on bioremediation of PAHs and bacterial community composition in saline soil*. **Chemosphere**, v. 279, p. 130427, set. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130427>>.

SOUTY-GROSSET, C.; FABERI, A.. *Effect of agricultural practices on terrestrial isopods: a review*. **ZooKeys**, v. 2018, n. 801, p. 63-96, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3897/zookeys.801.24680>>.

SOUZA, I. F.. Comportamento dos herbicidas no solo. **Informe Agropecuário**, v. 08, n. 87, p. 38-44, 1982.

SUGANO, Y.; MATSUSHIMA, Y.; SHODA, M.. *Complete decolorization of the anthraquinone dye Reactive blue 5 by the concerted action of two peroxidases from Thanatephorus cucumeris Dec 1*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 04, p. 862-871, 1 dez. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-006-0545-9>>.

SYAFRUDIN, M. *et al.*. *Pesticides in drinking water — a review*. **Int J Environ Res Public Health**, v. 18, n. 02, p. 468, jan. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390%2Fijerph18020468>>.

SZYMAŃSKA, S. *et al.*. *Choosing source of microorganisms and processing technology for next generation beet bioinoculant*. **Scientific Reports**, v. 11, n. 01, p. 01-13, 2021.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-021-82436-5>>.

TOLLER, N. M.. 2019. **Biodegradação de atrazina estimulada por *Saccharomyces cerevisiae* e palha de milho**. Orientadores: GUIMARÃES, Elisete. 77 f. Dissertação (Mestrado) - PPG-EA (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental), UTFPR (Universidade Tecnológica Federal do Paraná), Francisco Beltrão, PR. Disponível em: <<https://riut.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/4140>>.

TOMA, M. A.; BOAS, R. C. V.; MOREIR, F. M. DE S. **Micro-organismos, conhecendo a vida do solo**. v. 5 ed. Lavras - MG: UFLA, 2017.

TRAZZI, P. A. *et al.* Biocarvão: realidade e potencial de uso no meio florestal. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 02, p. 875, 29 jun. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.5902/1980509832128>>.

TUDI, M. *et al.* Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 03, p. 01-24, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390%2Fijerph18031112>>.

TULLIO, L.. **Formação, classificação e cartografia dos solos**. 1ª ed.. Ponta Grossa: Atena, 2019. Disponível em: <<https://atenaeditora.com.br/catalogo/ebook/formacao-classificacao-e-cartografia-dos-solos>>.

UKALSKA-JARUGA, A.; SMRECZAK, B.; SIEBIELEC, G.. *Assessment of pesticide residue content in polish agricultural soils*. **Molecules**, v. 25, n. 03, p. 24-100, 2020. Disponível em <<https://doi.org/10.3390/molecules25030587>>.

VIDALI, M.. *Bioremediation: an overview*. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 07, p. 1163-1172, 01 jul. 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1351/pac200173071163>>.

VISHWAKARMA, K. *et al.* Revisiting plant–microbe interactions and microbial consortia application for enhancing sustainable agriculture: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. December, p. 01-21, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.560406>>.

VRANSKA, M. *et al.*. Induction of laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase activities in white-rot fungi using copper complexes. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1553, 17 nov. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390%2Fmolecules21111553>>.

WALKER, B. S.; KRAMER, A. G.; LASSITER, C. S.. Atrazine affects craniofacial chondrogenesis and axial skeleton mineralization in zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicology and Industrial Health**, v. 34, n. 05, p. 329-338, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0748233718760419>>.

WANG, J. *et al.*. Dynamic changes in microbial communities during the bioremediation of herbicide (chlorimuron-ethyl and atrazine) contaminated soils by combined degrading bacteria. **PLoS ONE**, v. 13, n. 04, p. 01-14, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194753>>.

WANG, S. *et al.*. Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, and yield of peanut in response to biochar application. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, n. May, p. 01-14, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.650432>>.

WANNER, P.. Plastic in agricultural soils – a global risk for groundwater systems and drinking water supplies? A review. **Chemosphere**, v. 264, p. 128453, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128453>>.

WG, M.; G. D, R.. Detection and recovery of fungi from clinical specimens. In: BALOWS, A.; HAUSLER Jr., W. J.; HERRMANN, K. L.; ISENBERG, H. D.; SHADOMY, H. J.. *et al.* (Eds.). **Manual of clinical microbiology**. Washington, DC: ASM Press, 1995. p. 709-722.

WILKINSON, A. D. *et al.*. Acute and additive toxicity of ten photosystem-II herbicides to seagrass. **Scientific Reports**, v. 05, p. 01-11, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/srep17443>>.

WILPISZESKI, R. L. *et al.*. Soil aggregate microbial communities: towards understanding microbiome interactions at biologically relevant scales. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 14, p. 01-18, 2019. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1128/aem.00324-19>>.

YALE, R. L. *et al.* *Microbial changes linked to the accelerated degradation of the herbicide atrazine in a range of temperate soils.* **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 08, p. 7359-7374, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-017-8377-y>>.

YANG, Y. *et al.* *Soil carbon sequestration accelerated by restoration of grassland biodiversity.* **Nature Communications**, v. 10, n. 01, p. 01-07, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08636-w>>.

YOSHIDA, H.. LXIII: *Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio.* **J. Chem. Soc., Trans.**, v. 43, p. 472-486, 1883.

YU, T. *et al.* *A bio-functions integration microcosm: self-immobilized biochar-pellets combined with two strains of bacteria to remove atrazine in water and mechanisms.* **Journal of Hazardous Materials**, v. 384, n. September 2019, p. 121326, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121326>>.

ZAPANA-HUARACHE, S. V. *et al.* *Chromium (VI) bioremediation potential of filamentous fungi isolated from Peruvian tannery industry effluents.* **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 01, p. 271-278, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s42770-019-00209-9>>.

ZHANG, C.; WU, D.; REN, H.. *Bioremediation of oil contaminated soil using agricultural wastes via microbial consortium.* **Scientific Reports**, v. 10, n. 01, p. 01-08, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-66169-5>>.

ZHAO, Z.; CHEN, L.; XIAO, Y.. *The combined use of arbuscular mycorrhizal fungi, biochar and nitrogen fertilizer is most beneficial to cultivate Cichorium intybus L. in Cd-contaminated soil.* **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 217, p. 112154, jul. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112154>>.

## APÊNDICES

### Apêndice A – Pré-inóculos dos fungos *Clonostachys rosea* CCMIBA\_R018, *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA\_R014, e *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_R111

**Figura 16** - Pré-inóculos dos fungos *Clonostachys rosea* CCMIBA\_R018, *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA\_R014, e *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_R111



**Legenda:** (Nessa figura 1 apresentamos os dois modelos de pré-inóculos utilizados para o preparo dos consórcios (T1 e T2). **A**, meio de cultura ME enriq. com peptona e extrato levedura e pelotas de micélio do fungo *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_R111; **B** e **C**, meio de cultura CSD e pelotas de micélio dos fungos *Clonostachys rosea* CCMIBA\_R018, *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA\_R014, respectivamente; **D**, meio de cultura ME enriq. com peptona e extrato de levedura, 5 g de carvão ativado e pelotas de micélio do fungo *Bjerkandera* sp. CCMIBA\_R111; **E** e **F**, meio de cultura CSD, 5 g de carvão ativado e pelotas de micélio dos fungos *Clonostachys rosea* CCMIBA\_R018, *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA\_R014, respectivamente. Todas as imagens foram obtidas após dez dias de incubação, 28° C, em shaker agitador, 140 rpm).

**Fonte:** da autora, 2024.

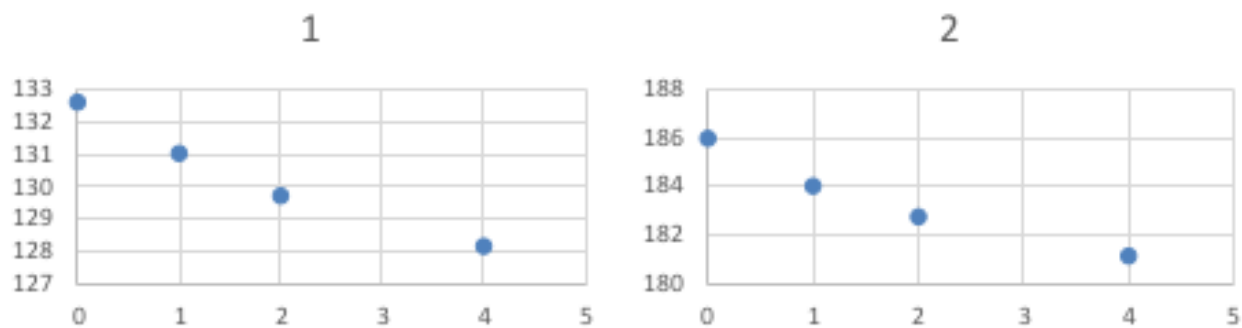
**Apêndice B – Resultado da análise estatística****Tabela 5 - Resultado da análise estatística**

Tukey:	Diferença	Q	(p)
Médias ( 1 a 2) =	1.0933	28.7487	< 0.01

**Fonte: da autora, 2024.**

## Apêndice C – Gráfico com peso total dos ensaios de imobilização

**Gráfico 8** - Peso total dos ensaios de imobilização (incluindo o peso do frasco de incubação) durante 21 dias



**Nota explicativa:** A) TI 1, incubação individualmente; B) TI 2, incubação com carvão ativado (5 g).

**Fonte:** da autora, 2024.