



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIODIVERSIDADE NEOTROPICAL**

**DIVERSIDADE DE FUNGOS EM SOLO CONTAMINADO COM  
ATRAZINA: DINÂMICA DA COMUNIDADE FÚNGICA EM  
MICROCOSMOS**

**GESSYCA FERNANDA DA SILVA**

Foz do Iguaçu  
2020



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS  
DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIODIVERSIDADE NEOTROPICAL**

**DIVERSIDADE DE FUNGOS EM SOLO CONTAMINADO COM  
ATRAZINA: DINÂMICA DA COMUNIDADE FÚNGICA EM  
MICROCOSMOS**

**GESSYCA FERNANDA DA SILVA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Biodiversidade Neotropical, 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 Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Rafaella Costa Bonugli Santos

Foz do Iguaçu  
2020

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

S586d

Silva, Gessyca Fernanda da.

Diversidade de fungos em solo contaminado com atrazina: dinâmica da comunidade fúngica em microcosmos / Gessyca Fernanda da Silva. - Foz do Iguaçu, 2020.

96 fls.: il.

Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Centro Interdisciplinar de Ciências da Vida,  
Programa de Pós-Graduação Biodiversidade Neotropical.

Orientador: Rafaella Costa Bonugli Santos.

1. Solos. 2. Herbicida. 3. Fungos. I. Santos, Rafaella Costa Bonugli. II. Título.

CDU: 632.954

GESSYCA FERNANDA DA SILVA

**DIVERSIDADE DE FUNGOS EM SOLO CONTAMINADO COM ATRAZINA:  
DINÂMICA DA COMUNIDADE FÚNGICA EM MICROCOSMOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical, 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 Biológicas.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos  
UNILA



---

Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini  
UNILA



---

Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte  
UFAL

Foz do Iguaçu, 02 de outubro de 2020 .

Dedico esse trabalho a minha mãe Eliza e aos  
meus irmãos Jonathan e Jennifer.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer a minha mãe Eliza, e aos meus irmãos Jonathan e Jennifer, pelo apoio e compreensão na minha jornada acadêmica. Sem vocês eu não teria chegado onde cheguei.

Agradecer a Fundação Parque Tecnológico de Itaipu e à Itaipu Binacional pelo financiamento do projeto e a concessão de bolsa.

Gostaria de Agradecer a Prof.<sup>a</sup> Rafaella pela orientação, ensinamentos e paciência, que ajudaram no meu crescimento acadêmico e profissional.

A Caroline Henn, pela confiança e por ser um dos degraus para realização do mestrado.

Aos meus amigos de longa data (Jannie, Samuel, Glenda, Gionei e Ademir) que sempre estiveram presentes nos melhores e nos piores momentos, sempre regados de algum teor alcoólico, sentirei muitas saudades.

A nova amiga Denise, pelo apoio e ajuda nas fases difíceis do mestrado e da vida. Com certeza vai ser para a vida toda.

Ao meu amigo Alejandro, pela grande ajuda no laboratório e com as estatísticas. Aos meus companheiros de pesquisa, João e Giulio, foram de grande apoio para a execução desse projeto, espero que vocês possam ter aproveitado o trabalho e aprendido algo que vão utilizar para a vida de vocês.

Ao corpo docente e técnico do Programa de Pós Graduação de Biodiversidade Neotropical.

Aos técnicos do Laboratório Delaben, pela ajuda e disponibilização de materiais e insumos.

Meus sinceros agradecimentos a todos!!

*“Nous sommes responsables pour ceux  
qui nous avons apprivoise.”*

**Antoine de Saint-Exupery**

SILVA, Gessyca Fernanda da. **Diversidade de fungos em solo contaminado com atrazina: Dinâmica da comunidade fúngica em microcosmos**. 2020. 96. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Neotropical – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

## RESUMO

A atrazina (ATZ) é um herbicida usado em larga escala na agricultura Brasileira, apesar de afetar a estabilidade dos ecossistemas e a saúde humana. Sua degradação ocorre naturalmente no solo por fatores abióticos e bióticos. E embora haja grandes progressos em direção ao conhecimento sobre a degradação bacteriana da ATZ, muitas perguntas permanecem sem resposta sobre esse herbicida e a comunidade de fungos *in situ*. O objetivo desse trabalho foi avaliar a dinâmica da comunidade fúngica de um solo agrícola com cultivo de milho, com histórico de aplicação de ATZ da Bacia do Paraná 3, Brasil. Nove microcosmos foram preparados com 500 g de solo e organizados em três sistemas: controle (sem adição de ATZ), T1 (suplementado com 300 ng de ATZ Kg<sup>-1</sup> de solo) e T2 (suplementado com 3000 ng de ATZ Kg<sup>-1</sup> de solo), em triplicata. Os microcosmos foram incubados a 28°C, e o isolamento realizado a cada sete dias, durante 28 dias (0, 7, 14, 21, 28), em meio de cultivo Extrato de Malte 2% (MA2) e MA2 suplementado com guaiacol (para isolamento de fungos ligninolíticos, MA2G). A amostra de solo antes da montagem dos microcosmos apresentou 0,02 mg ATZ Kg<sup>-1</sup> de solo e entre os fatores químicos e físicos avaliados destaca-se o pH alcalino e alta concentração de P. Os isolados foram caracterizados morfológicamente para obter o número de morfoespécies e o sequenciamento da região ITS do DNAr permitiu a identificação taxonômica da comunidade geral (meio de cultivo MA2) e comunidade ligninolítica (meio de cultivo MA2G com atividade enzimática). No total foram isolados 114 morfoespécies, destes 52% ocorreram em mais de um tratamento, 38% aparecem uma única vez e 27% das morfoespécies ocorreram em todos os tratamentos. Na comunidade ligninolítica 24 morfoespécies apresentaram atividade, sendo 63% exclusivas dos tratamentos com adição de ATZ (T1 e T2). Não foram encontradas diferenças significativas na riqueza de morfoespécies. Por outro lado, a adição de ATZ em baixas concentrações pode desencadear respostas diferentes em relação à composição da comunidade. Para os fungos ligninolíticos, a adição de ATZ resultou em um efeito positivo sobre a comunidade, indicando, possivelmente, sua relação com a degradação natural do defensivo químico. Houve predominância de fungos do filo Ascomycota e um processo de sucessão biológica foi identificando, destacando alguns gêneros de maior impacto, principalmente entre o sétimo e o 14º dia. Com isso, nosso estudo contribui para a compreensão da diversidade de fungos no solo, importante para uma melhora na qualidade do solo em solos contaminados com ATZ na produtividade dos ecossistemas agrícolas

**Palavras-chave:** Solo agrícola. Herbicida. Ascomycota. Diversidade de fungos.

SILVA, Gessyca Fernanda da. **Diversity of fungi in soil contaminated with atrazine: Dynamics of the fungal community in microcosms.** 2020. 96. Master's thesis of the Graduate Program in Neotropical Biodiversity - Federal University of Latin American Integration, Foz do Iguaçu, 2020.

### **ABSTRACT**

*Atrazine (ATZ) is an herbicide used on a large scale in Brazilian agriculture, although it affects the stability of ecosystems and human health. Its degradation occurs naturally in the soil due to abiotic and biotic factors. And while there is excellent progress towards knowledge about bacterial degradation of ATZ, many questions remain unanswered about this herbicide and the fungi community in situ. The aim of this work was to evaluate the dynamics of the fungal community of an agricultural soil with a history of the application of ATZ in the Paraná Basin 3, Brazil. Nine microcosms were prepared with 500 g of soil and organized in three microcosm systems: control (without the addition of ATZ), T1 (supplemented with 300 ng of ATZ Kg<sup>-1</sup> of soil) and T2 (supplemented with 3000 ng of ATZ Kg<sup>-1</sup> soil), in triplicate. The microcosms were incubated at 28 ° C, and the isolation was performed every seven days, for 28 days (0, 7, 14, 21, 28), in 2% Malt Extract (MA2) and MA2 culture medium supplemented with guaiacol (for isolation of ligninolytic fungi, MA2G). Before assembling the microcosms, the soil sample showed 0.02 mg ATZ Kg<sup>-1</sup> on the soil, and among the chemical and physical factors evaluated, the alkaline pH and high concentration of P stand out. The isolates were characterized morphologically to obtain the number of morphospecies, and the sequencing of the DNTS ITS region allowed the taxonomic identification of the general community (MA2 culture medium) and ligninolytic community (MA2G culture medium with enzymatic activity). Were isolated 114 morphospecies; 52% occurred in more than one treatment, 38% appear only once, and 27% of morphospecies occurred in all treatments. In the ligninolytic community, 24 morpho-species showed activity, 63% of which were exclusive to treatments with addition of ATZ (T1 and T2). No significant differences were found in the morphospecies richness. On the other hand, the addition of small volumes of ATZ can trigger different responses concerning the community is composition. For ligninolytic fungi, the addition of ATZ resulted in a positive effect on the community. Possibly, indicating its relationship with the natural degradation of the chemical pesticide. There was a predominance of fungi from the phylum Ascomycota. A process of biological succession was identified, highlighting some genera of a more significant impact, mainly between the 7th and the 14th day. With this, our study contributes to understanding the diversity of fungi in the soil, essential for the improvement in soil quality and the productivity of agricultural ecosystems.*

**Keywords:** Agricultural soil. Herbicide. Ascomycota. Fungal diversity.

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Fórmula molecular da atrazina de acordo com o seu fabricante.....	14
<b>Figura 2.</b> Rota da Atrazina e sua persistência no ambiente.....	16
<b>Figura 3.</b> Degradação da ATZ e a formação de seus principais metabólitos HA, DEA e DIA.....	18
<b>Figura 4.</b> Via completa de mineralização da Atrazina por bactéria.....	19
<b>Figura 5.</b> Principais vias de degradação utilizados por fungos.....	21
<b>Figura 6.</b> Ciclo de catalise da Lacase.....	24
<b>Figura 7.</b> Ciclo de catalise da enzima manganês peroxidase.....	24
<b>Figura 8.</b> Ciclo de catalise da enzima lignina peroxidase.....	25
<b>Figura 9.</b> Definições e especificadores de táxons filogenéticos para fungos.....	27
<b>Figura 10.</b> Diagrama do complexo gênico do rDNA de fungos, contendo as subunidades 18S, 28S e 5.8S, e a localização dos genes ITS.....	29
<b>Figura 11.</b> Exemplo de microcosmos naturais e artificiais .....	35
<b>Figura 12.</b> Local de coleta das amostras para a realização do projeto.....	40
<b>Figura 13.</b> Local de realização da amostragem do solo do presente estudo.....	40
<b>Figura 14.</b> Sistema de microcosmos com seus respectivos tratamentos.....	43
<b>Figura 15.</b> Os microcosmos montados e armazenados em estufa.....	43
<b>Figura 16.</b> Processamento das amostras de solo dos microcosmos.....	44
<b>Figura 17.</b> Semeadura de 100 µl de solução do solo em meio de cultivo sólido de MA2.....	45
<b>Figura 18.</b> Exemplos de morfoespécies isoladas.....	45
<b>Figura 19.</b> Resultado das análises cromatográficas.....	50
<b>Figura 20.</b> Diagrama de Venn com a distribuição geral das morfoespécies entre os tratamentos.....	51
<b>Figura 21.</b> Diagramas de Venn mostrando a distribuição das morfoespécies Ligninolíticas.....	52
<b>Figura 22.</b> Relação de número de morfoespécies por tratamento e coleta.....	52
<b>Figura 23.</b> Curva de rarefação da riqueza geral entre os tratamentos.....	53
<b>Figura 24.</b> Ocorrência e abundância de morfoespécies das comunidades de fungos	

nos sistemas de microcosmo.....	55
<b>Figura 25.</b> Dendrograma de sistemas de microcosmos de acordo com o índice de similaridade de Jaccard para comunidades de fungos (diversidade $\beta$ ).....	57
<b>Figura 26.</b> Análise de coordenadas principais (PCoA) da composição dos fungos.....	60
<b>Figura 27.</b> Relação da diversidade funcional de acordo com a abundância relativa.....	61

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>14</b>
2.1	Atrazina.....	14
2.2	Biodegradação de defensivos agrícolas .....	18
2.2.1	Biodegradação da ATZ por bactérias .....	19
2.2.2	Biodegradação da ATZ por fungos .....	20
2.3	Fungos filamentosos, diversidade ecológica e agrossistemas.....	26
2.4	Solo agrícola .....	30
2.5	Sistema de microcosmo para o estudo da diversidade fungica e biodegradação da atrazina .....	35
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
3.1	Objetivos específicos .....	38
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>39</b>
4.1	Projeto piloto.....	39
4.2	Coleta das amostras .....	40
4.3	Análises cromatográficas .....	41
4.4	Montagem dos microcosmos .....	42
4.5	Processamento das amostras e isolamento.....	44
4.6	Caracterização molecular.....	46
4.7	Análises estatísticas .....	47
4.8	Análise funcional .....	48
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>
5.1	Definição da metodologia de isolamento (projeto piloto) .....	49
5.2	Análise cromatográfica e características químicas da amostra principal (usada na montagem dos microcosmos).....	49
5.3	Isolamento fúngico e definição das morfoespécies .....	51
5.4	Caracterização molecular.....	54
5.5	Análise da Diversidade .....	56
5.6	Análise funcional .....	61
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>73</b>
<b>9</b>	<b>ANEXO</b> .....	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Defensivos agrícolas ou agrotóxicos possuem mais de mil formulações, tratando-se de inseticidas, herbicidas, fungicidas, nematicidas, fumigantes, outros compostos orgânicos e substâncias utilizadas como reguladores de crescimento, desfolhantes e dessecantes (Braibante & Zappe 2012). O grau de toxicidade dos defensivos agrícolas varia de acordo com a substância ativa, a quantidade utilizada e o tipo de contato pelo manipulador. As classes variam de I a IV, sendo a classe I são produtos altamente perigosos e IV produtos pouco perigosos ao meio ambiente (USEPA, 2006).

A atrazina (ATZ) é um herbicida de classe III segundo a classificação da *United States Environmental Protection Agency* (USEPA), e devido aos grupos de cloreto e N-alquila, possui lenta degradação no meio ambiente e a meia-vida varia de 13-260 dias em solo (USEPA, 2006). É altamente persistente no solo e encontrado em altos níveis de concentração em águas superficiais e subterrâneas, devido ao seu alto potencial de lixiviação e solubilidade em água. A ATZ causa muitos impactos ambientais, sendo prejudicial para peixes, anfíbios, algas e plantas, como também para animais e humanos devido ao seu potencial carcinogênico (Martins et al. 2018). A decomposição da ATZ ocorre pela hidrólise química e biodegradação principalmente por microrganismos do solo, sendo mais rápida em ambientes ácidos e básicos em comparação com solos de pH neutro (USEPA, 2006).

Apesar da aplicação inicial da ATZ ocasionar uma redução significativa da biomassa microbiana afetando a densidade, diversidade e atividade microbiana, com o decorrer dos anos e aplicações seguidas, adaptações da microbiota são observadas, juntamente com o aumento da taxa de degradação (Santos et al. 2005), ou seja, a aplicação repetida tem resultado em exposição a longo prazo dos microrganismos do solo, gerando baixos níveis de resíduos e metabólitos, e às vezes levando a um aprimoramento gradual de biodegradação (Douglass et al. 2017). Logo, este herbicida pode ser usado como substrato por microrganismos, que os empregam nos processos metabólicos de catabolismo e anabolismo. Tanto bactérias como fungos são conhecidos degradadores e contribuem igualmente no processo de mineralização da ATZ, sendo conhecida uma considerável diversidade de espécies envolvidas no processo (Douglass et al. 2017; Ostrofsky et al. 2002; Sene et al. 2010).

A degradação da ATZ por fungos ocorre por vias bioquímicas iniciando pela dealquilação (Mougin et al. 1994; 1997), e esse processo pode ser mediado por enzimas ligninolíticas, que possuem potencial oxidativo. Estas enzimas estão envolvidas na degradação de estruturas aromáticas e alifáticas da lignina presente na parede vegetal de plantas (Bending et al. 2002); contudo, seu potencial tem sido observado para a degradação de uma série de compostos aromáticos e fenólicos, incluindo agroquímicos, corantes, hidrocarbonetos do petróleo e outros (Tomaz, 2003). Porém, há pouca informação da ação deste sistema enzimático em ambientes naturais contaminados com ATZ em relação a estudos *in vitro* em meios sintéticos.

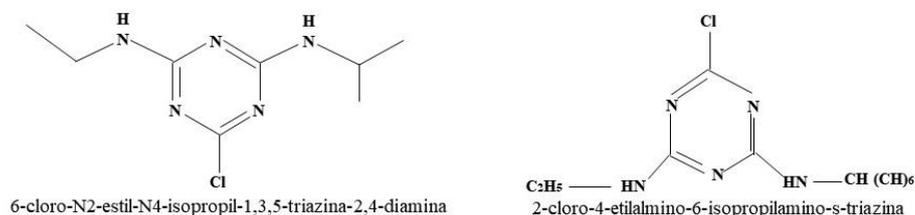
O processo de sintrofia possivelmente é a condição que mais representa o processo natural de degradação da ATZ no solo e uma possibilidade para esses estudos, é a avaliação em sistemas de microcosmos, uma vez que no ambiente natural é muito complexo controlar os fatores bióticos e abióticos que podem interferir na dinâmica da comunidade. Microcosmos artificiais geralmente são confeccionados em laboratório, de modo a reproduzir de forma simplificada a complexidade dos ecossistemas naturais (Pires et al. 2014) e podem responder a várias questões ainda não descobertas das rotas de degradação deste poluente por fungos.

Assim, o objetivo do estudo foi compreender o funcionamento da comunidade fúngica no sistema agrícola, e quais os impactos, adaptações ou mudanças podem sofrer devido a introdução de um composto químico. Levando em consideração que possivelmente a comunidade de fungos apresente resistência à ATZ devido à aplicação rotineira, e conforme apontado por pesquisas recentes, se buscou isolar fungos com relação na biodegradação da ATZ com a atividade ligninolítica.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Atrazina

A atrazina (ATZ) é um herbicida aromático (Figura 1) de amplo espectro que tem como principal função o controle de gramíneas e plantas daninhas de folhas largas, sendo utilizado principalmente nas culturas de milho, soja e cana-de-açúcar. Seu uso começou na década de 1950 e continua sendo um dos produtos agrícolas mais utilizados no mundo (Donnelly, 1993; Cooper et al. 2007). É encontrado em duas formulações que variam de acordo com o fabricante, como: 6-cloro-N2-etil-N4-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina pela NORTOX S/A e a 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina pela ATANOR S/A (ADAPAR, 2018).



**Figura 1.** Fórmula molecular da atrazina de acordo com o seu fabricante (Fonte: European Patent Application, 1997; Javaroni et al. 1998).

Como um herbicida sintético apresenta-se na forma sólida como um pó cristalino e branco, possui massa molecular de  $215,69 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , solúvel em solventes orgânicos como o éter, acetona, benzeno, clorofórmio, etanol e acetato de etila. Por ser um composto polar, devido à configuração de seu anel aromático, a sua solubilidade em água é independente do pH da solução; no entanto, apresenta maior solubilidade em soluções com pH abaixo de 2 (Javaroni et al. 1998; Kookana et al. 2008). As solubilidades da ATZ (Tabela 1) e de seus principais produtos de degradação desetil-atrazina (DEA), desisopropil-atrazina (DIA) e hidroxí-atrazina (HA), em água destilada e temperatura ambiente, são respectivamente: 33, 3200, 650 e  $7 \text{ mg L}^{-1}$ . O composto DEA é detectado com maior frequência em amostras de água, devido sua facilidade de degradação microbiana da ATZ, e sua alta solubilidade em água (Townsend & Young, 2000; Stackelberg et al. 2012).

**Tabela 1.** Propriedades físico-químicas da ATZ.

Nome popular	P. f (°C)	Solubilidade (H <sub>2</sub> O) a 20-25°C (mol. L <sup>-1</sup> )	Pressão de vapor a 20°C (mPa)	pK <sub>a</sub> 21 °C	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )
Atrazina	175-177	33	0,04	1,7	1,187

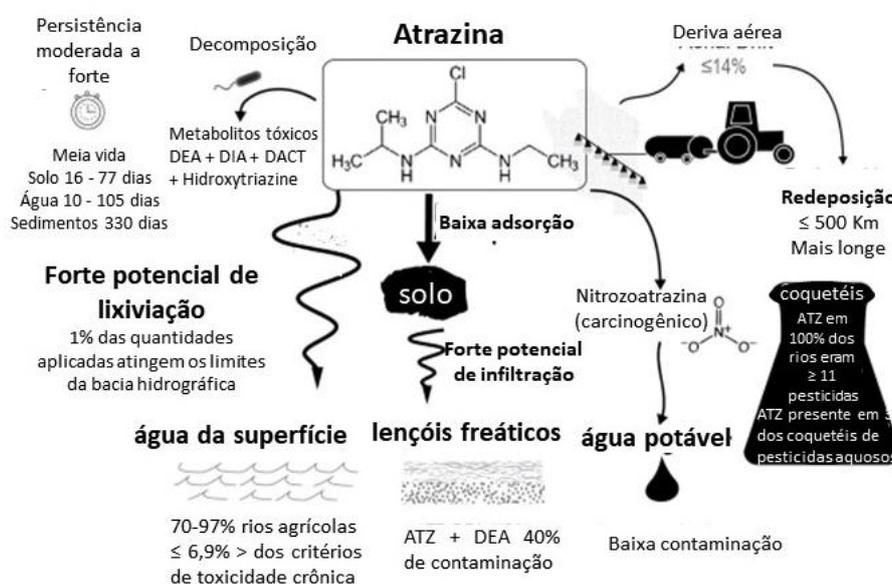
P.f - ponto de fusão; pK<sub>a</sub> - constante de acidez.

O mecanismo de ação da ATZ ocorre pelo processo de inibição da atividade do fotossistema II, estágio onde a energia da luz é convertida no movimento de elétrons energizados, por substituição da ligação da plastoquinona com a quinona b. A ATZ se liga na forma oxidada da plastoquinona e se acopla ao local de ligação específico no acceptor da quinona b na proteína D<sub>1</sub>; como a molécula da ATZ está reduzida, ela não recebe elétrons e causa um bloqueio efetivo do fluxo de elétrons, impedindo a fotossíntese (Fleck et al. 2001; Trebst, 2008).

No campo, a ATZ apresenta duas aplicabilidades, a pré-emergência e a pós-emergência. Na pré-emergência a aplicação ocorre com a semeadura, por um sistema conhecido como 3 em 1, que consiste na adubação, plantação e aplicação da ATZ em uma única operação. Nesse sistema é requerido que o solo esteja bem preparado, livre de torrões, resíduos e detritos, com um bom teor de umidade para melhor ação da ATZ (ADAPAR, 2018). A modalidade de pós-emergência ocorre quando há a presença de plantas daninhas, qualquer planta que cresça espontaneamente em um local de atividade humana e cause prejuízos a essa atividade (Carvalho, 2013), no estágio de até seis folhas, é realizada com a cultura já germinada e respeitando o estágio de desenvolvimento da planta daninha. A potencialização da ATZ é feita com a adição de surfactante e caso sua aplicação for de acordo com as condições técnicas adequadas, uma única aplicação é suficiente (Monquero et al. 2009; ADAPAR, 2018).

O destino da ATZ no solo será determinado por três processos: transformação, retenção e transporte. Tanto o destino quanto a taxa dos processos irão depender da natureza química da ATZ e das propriedades químicas, biológicas e hidráulicas do solo (LeBaron et al. 2008). A transformação da ATZ ocorre principalmente pela degradação por microrganismos, porém pode ocorrer também através da hidrólise, degradação química lenta, com a remoção de um átomo de cloro da molécula de ATZ e substituído por uma hidroxila (OH), sendo mais rápida em ambientes ácidos e básicos em comparação com solos de pH neutro (USEPA, 2006), (Figura 2). Tanto a retenção, quanto o transporte estão relacionados com o processo de sorção da ATZ nas superfícies das

partículas do solo. De acordo com a matéria orgânica e as partículas minerais os sítios iônicos e polares do solo possuem afinidades pela molécula de ATZ e pelas moléculas de água, gerando uma competição entre as moléculas, os sítios não polares do solo têm uma baixa afinidade com a água e alta afinidade com as porções não polares das moléculas de ATZ, ocasionando uma maior interação com os sítios compatíveis. O aumento da sorção limita a disponibilidade da ATZ para o transporte, absorção de plantas e a degradação microbiana, tornando um pesticida mais recalcitrante. Logo, a disponibilidade da ATZ para transporte e degradação está estreitamente relacionada com a sua capacidade de ser desorvido do solo (Laird & Koskinen, 2008).



**Figura 2.** Rota da Atrazina e sua persistência no ambiente. Fonte: Hénault-Ethier, 2016.

De acordo com *United States Environmental Protection Agency* (USEPA, 2006) a ATZ pertence à classificação toxicológica nível III, mediamente tóxico, e seu potencial de periculosidade ambiental é nível II, considerado um produto muito perigoso para o meio ambiente. Essa classificação baseia-se na presença do cloreto e da N-alquila, que possui lenta degradação no ambiente e uma meia-vida que varia de 16-330 dias de acordo com o seu substrato; isso se dá devido à resistência da ATZ à hidrólise abiótica e a fotólise aquosa (USEPA, 2006).

Este herbicida é altamente persistente no solo e encontrado em altos níveis de concentração em águas superficiais e subterrâneas. Xu e colaboradores (2018) relataram que mesmo após décadas de sua aplicação, a ATZ e seus produtos de degradação podem ser encontrados devido ao seu alto potencial de lixiviação e

solubilidade em água, o que muitas vezes leva a contaminação do solo e de águas subterrâneas. Embora a União Europeia tenha proibido a ATZ em 2001, três anos após a sua exclusão, ainda foi encontrada em águas superficiais e na urina de mulheres grávidas (Chevrier et al. 2011). Pelos aspectos de dispersão generalizada e a longa persistência no solo, podem influenciar os efeitos tóxicos desse herbicida ao meio ambiente e aos seres humanos (Martins et al. 2018).

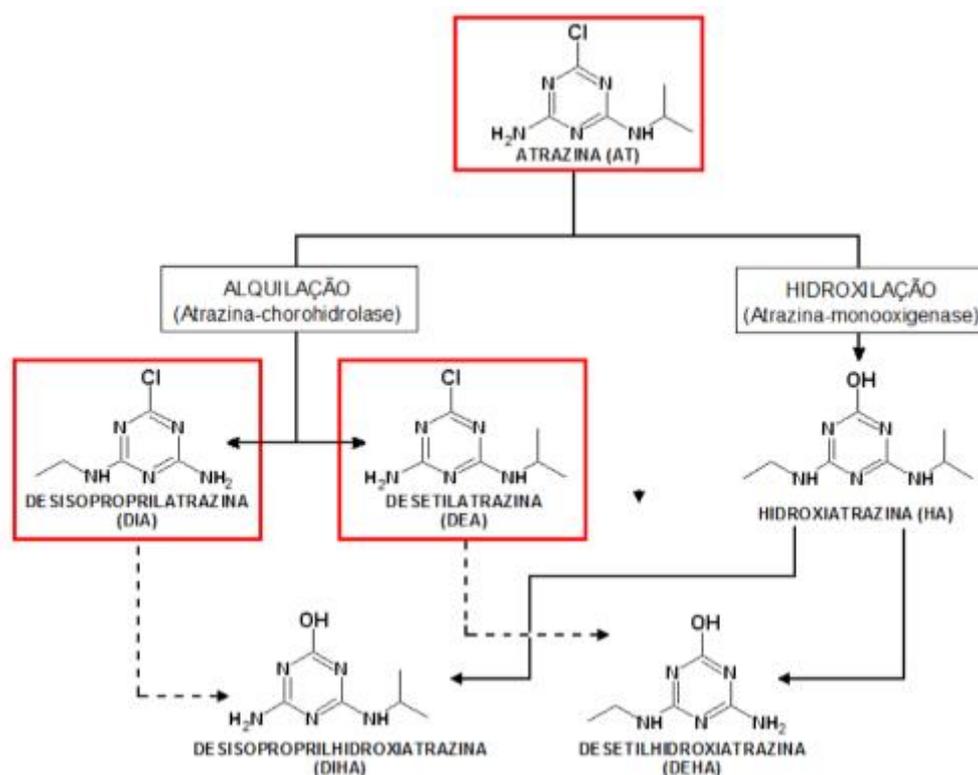
Estudos realizados em duas cidades do Mato Grosso, Lucas do Rio Verde e Campo Verde, relataram que o uso de ATZ nas atividades agrícolas estão afetando o ambiente próximo às zonas de plantio, bem como as águas superficiais, incluindo as de consumo humano e água das chuvas. Mesmo em pequenas concentrações, a ATZ pode atuar como substância química desreguladora endócrina em rãs, além de malformações apendiculares (Moreira et al. 2012; Xu et al. 2018). Outros efeitos na atividade reprodutiva levam a transformação sexual, como o hermafroditismo, desmasculinização e feminização, e a redução do crescimento de anfíbios em águas contaminadas com ATZ (Giroux, 2015), porém há casos em outros vertebrados como peixes, répteis e mamíferos (Hayes et al. 2011).

Em testes realizando exposição intrauterina em ratos foram observados abortos espontâneos, bem como sintomas toxicológicos em adultos e seus descendentes. Baixas doses poderiam alterar o desenvolvimento das glândulas mamárias e em altas doses a redução de peso ao nascer ou atraso da abertura vaginal. Já na exposição a ATZ em indivíduos adultos foram relatadas alterações morfológicas dos testículos (Enoch et al. 2007).

Em humanos, o alvo da ATZ é o sistema endócrino, há evidências de efeitos prejudiciais ao sistema nervoso central, sistema imunológico, função cardiovascular e sistema reprodutivo (Xu et al. 2018). Na reprodução humana a ATZ causa nascimentos prematuros, malformação genital em meninos e desregulação no ciclo menstrual em mulheres (Agopian et al. 2013).

## 2.2 Biodegradação de defensivos agrícolas

Os microrganismos possuem capacidades metabólicas específicas para a utilização de compostos xenobióticos como fonte de carbono e energia. As espécies microbianas tanto procariontas quanto eucariotas estão envolvidas na biodegradação da ATZ em condições *in situ* e *in vitro* (Singh et al. 2018). A biodegradabilidade é a característica de algumas substâncias químicas, como no caso da ATZ (Figura 3), que pode ser usada como fonte de substrato por microrganismos, sendo empregada em processos metabólicos de catabolismo e anabolismo (Singh et al. 2018). Bactérias e fungos são conhecidos degradadores de ATZ, no processo de hidrólise, há a formação do metabólito HA, e no processo de dealquilação ocorre a formação de DEA e DIA (Douglass et al. 2017). Os metabólitos DEA e DIA são produtos originados da degradação biológica da atrazina, e possuem maior mobilidade que a ATZ (Ma & Selim, 1996). Dentre os produtos de degradação da ATZ, a DEA tem potencial similar a ATZ de toxicidade aos animais e ao homem, enquanto que a HA não apresenta riscos (Ávila, 2009). Após reações de hidrólise e dealquilação, ocorre a deaminação, que resulta na formação do ácido cianúrico, que em seguida é convertido à biureto, que finalmente resultará na formação de ureia (Ghosh & Philip, 2006).



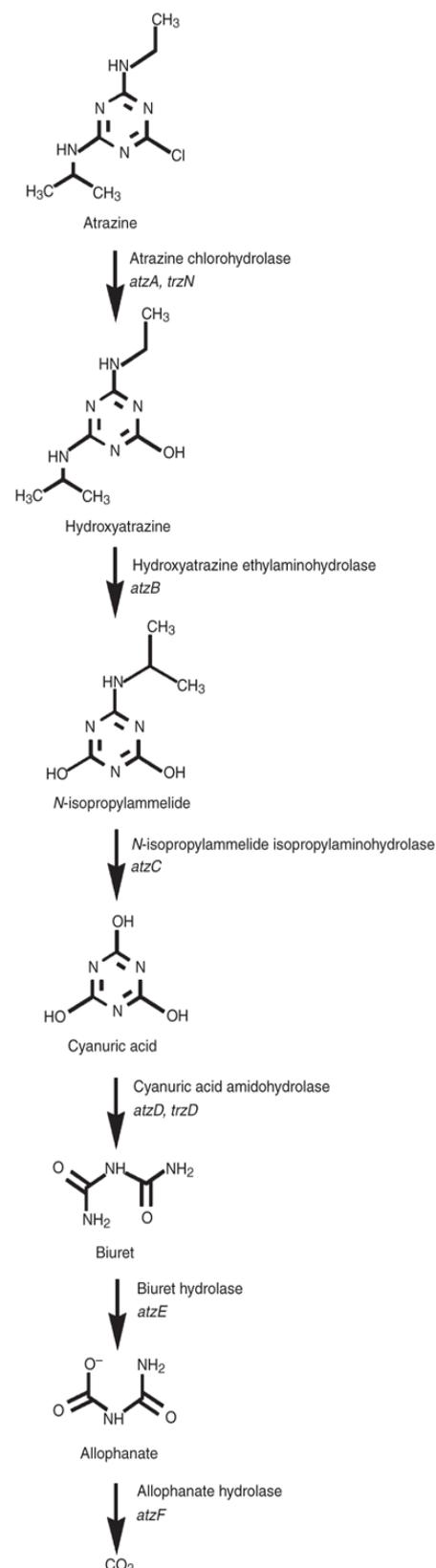
**Figura 3.** Degradação da ATZ e a formação de seus principais metabólitos HA, DEA e DIA. Fonte: Panshin et al. 2000.

### 2.2.1 Biodegradação da ATZ por bactérias

Há muitos estudos descritivos sobre a diversidade de bactérias degradadoras de ATZ e o conhecimento das rotas envolvidas no processo já está bastante avançado (Douglass et al. 2017). Um modelo de estudo, o gênero *Pseudomonas* sp., bem como outros grupos bacterianos, interagem com a molécula de ATZ conforme a figura 4, através de três produtos gênicos *atzA*, *atzB* e *atzC*, responsáveis por converter a ATZ no primeiro produto intermediário HA. Esses genes são bastante difundidos e encontrados em quase todas as cepas bacterianas capazes de degradar a ATZ (Rousseaux et al. 2001; Solomon et al. 2013). O seguinte processo de descloração ocorre pela remoção do grupo N-alquila através da catalise da enzima cloridato de atrazina produzindo ácido cianúrico (Solomon et al. 2013). O ácido cianúrico sofre diferentes reações como resultado das expressões genicas *atzD*, *atzE* e *atzF* até formação de CO<sub>2</sub> e água.

Em bactérias Gram-positivas, a degradação é feita pelo gene *trzN*, no qual, há a remoção de vários grupos funcionais do composto original, e em seguida ocorre a N-desalquilação da ATZ em DEA ou DIA, ou ainda sofre hidrólise para produzir ácido cianúrico (Wang et al. 2005).

Nas linhagens de *Rhodococcus* N186, 21 e SpTE1 foram observadas reações oxidativas, pela perda das aminas dos metabólitos da ATZ, pelas enzimas AtzA e TriA, a descloração da ATZ desalquilada é feita pela hidrolase AtzB. Na via de degradação hidrolítica, o ácido cianúrico é convertido em dióxido de carbono (Seffernick et al. 2002; Udikovic'-Kolic' et al. 2010).



**Figura 4.** Via completa de mineralização da Atrazina por bactéria. Fonte: (Udikovic'-Kolic' et al. 2010).

Como relatado, as bactérias são um dos grupos mais estudados para a degradação da ATZ, e as principais razões são porque as células de cultura bacteriana são mais fáceis de cultivar, possuem taxas de crescimento mais elevadas e rastreamento genético mais simples, por ser um procarioto (Lima et al. 2018). De acordo com Harms e colaboradores (2011), a degradação bacteriana de poluentes difere em dois aspectos da maioria dos casos de degradação fúngica: I. as bactérias normalmente usam os poluentes como substratos de crescimento. A eficiência da degradação bacteriana depende, portanto, de um ciclo de *feedback* positivo entre a degradação dos poluentes e a formação de mais bactérias; II. usam vias bioquímicas específicas. As vias de degradação de novos poluentes são principalmente modificações ou extensões das vias existentes. Como alternativa, elas podem ser montadas “de novo”, com base em enzimas existentes, obtidas, por exemplo, por transferência genética entre espécies, uma vantagem em relação aos organismos eucariotos. Essa via de degradação específica para a ATZ, como descrita acima, representa o maior avanço nos estudos de degradação deste herbicida.

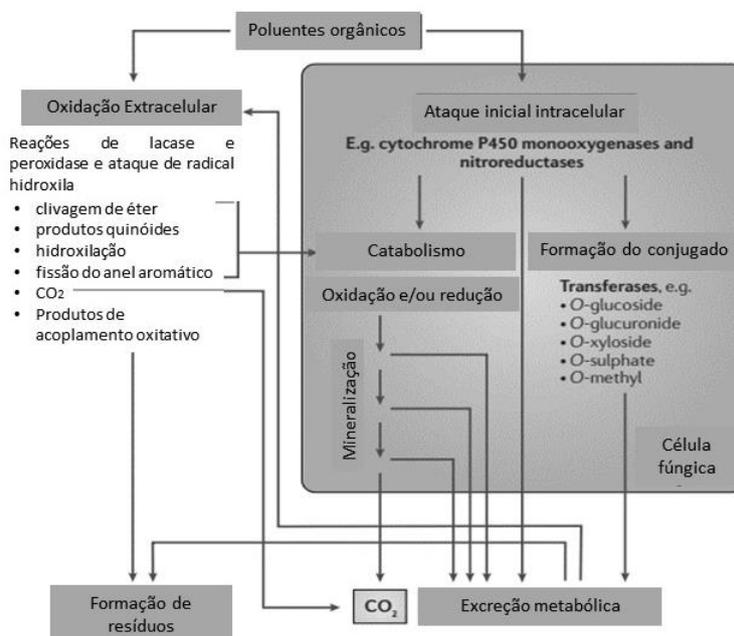
Os principais grupos bacterianos estudados na biodegradação de ATZ são: *Xanthomonas* sp. ARB2, *Enterobacter cloacae* JS08, *Klebsiella* sp. KB02, *Comamonas* sp. A2, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rahnella aquatilis*, *Chelatobacter heintzii*, *Aminobacter aminovorans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudaminobacter* C147, *Bacillus subtilis* HB-6, *Arthrobacter* sp., *Bacillus licheniformis*, *B. megaterium*, *Arthrobacter nicotinovorans* HIM, *Nocardioides* sp., *Arthrobacter aurescens*, *Arthrobacter crystallopoietes* e *Nocardioides* sp.

### 2.2.2 Biodegradação da ATZ por fungos

Mesmo que a taxa de crescimento dos fungos seja menor e que não apresente altas taxas de modificações gênicas em comparação com as bactérias, os fungos são eficientes para biorremediação, por causa do aporte de moléculas orgânicas, que tem o potencial para a degradação de hidrocarbonetos aromáticos e outros compostos orgânicos recalcitrantes (Lima et al. 2018). Um dos atributos dos fungos é a secreção de exoenzimas ou enzimas extracelulares para suprir as necessidades energéticas das hifas em crescimento, possibilitando na metabolização de compostos distintos devido à baixa especificidade das enzimas de metabolização xenobiótica (Harms et al. 2011). Outra característica importante dos fungos é a capacidade de tolerar uma variedade de substâncias químicas naturais ou antropogênicas (Govarthan et al.

2017). Em adição, devido a este sistema, a concentração do poluente não é um fator determinante para a degradação fúngica, como ocorre com as bactérias (vias catabólicas), que precisam de concentrações mais elevadas para induzirem a expressão enzimática (Harms et al. 2011). Esta característica torna-se altamente importante no processo agrícola, uma vez que a concentração da ATZ que chega ao solo representa um valor muito inferior ao aplicado.

Os fungos possuem a característica única de atacar os compostos orgânicos através de uma variedade de oxirredutases extracelulares e intracelulares, que representam o principal mecanismo para sua degradação. Na via extracelular, os metabólitos gerados durante a oxidação extracelular do poluente estão passíveis de catabolismo intracelular ou podem formar resíduos ligados aos constituintes do solo. Na via intracelular, os metabólitos resultantes do ataque inicial podem ser excretados e sofrer reações enzimáticas extracelulares adicionais ou formar resíduos ligados através do acoplamento oxidativo abiótico; também podem ser secretados na forma de conjugados ou sofrer mais catabolismo intracelular, resultando na mineralização ou, novamente, na excreção de metabólitos em vários estágios de degradação (Figura 5) (Harms et al. 2011).



**Figura 5.** Principais vias de degradação utilizados por fungos. Fonte: Harms et al. 2011.

A degradação da ATZ por fungos ocorre por vias bioquímicas iniciando pela dealquilação, sendo considerado a principal etapa da via metabólica do composto (Mougin et al. 1994; Mougin et al. 1997). Esse processo pode ser mediado por enzimas ligninolíticas, pois possuem potencial oxidativo, e estão envolvidas na degradação de estruturas aromáticas e alifáticas da lignina presente na parede vegetal das plantas (Bending et al. 2002). A lignina é um polímero tridimensional amorfo, atuando como material de ligação que confere força e rigidez a parede celular (Conesa et al. 2002). O potencial das enzimas ligninolíticas tem sido observado para a degradação de uma série de compostos aromáticos e fenólicos, incluindo agroquímicos, corantes, hidrocarbonetos do petróleo e outros (Tomaz, 2003).

Em destaque, algumas espécies de fungos que são conhecidos pelo processo de dealquilação: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ustus*, *Aspergillus flavipes*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium roseum*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium decumbens*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium rugulosum*, *Penicillium luteum*, *Trichoderma viride*, são capazes de degradar a ATZ em diferentes concentrações e com a produção de diferentes produtos finais (Sene et al. 2010).

As enzimas produzidas pelos fungos, envolvidas na degradação da lignina e da celulose, podem ser classificadas em dois grupos. O primeiro são as enzimas que decompõem a lignina, celulose e hemicelulose nas paredes das plantas, sendo elas celulasas, hemicelulasas e ligninases. O segundo grupo, não decompõe a madeira, mas auxilia as enzimas do primeiro grupo, por conter superóxido dismutase e glioxal oxidadase (Hernandez-Ortega, 2012).

Os fungos que produzem enzimas ligninolíticas são classificados em: podridão branca, pertencendo geralmente ao grupo dos basidiomicetos; podridão marrom (basidiomicetos e ascomicetos); e podridão mole (ascomicetos). Os fungos que causam a podridão branca degradam todos os principais constituintes da parede celular da fibra vegetal, principalmente, através da produção das enzimas: lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase. Pelo efeito da similaridade estrutural entre as moléculas, essas enzimas, apesar de inespecíficas, são capazes de oxidar uma ampla gama de substratos, como no caso de compostos xenobióticos (Rytioja et al. 2014; Ribeiro et al. 2018). Os fungos causadores da podridão marrom degradam a celulose e a hemicelulose a partir de ações enzimáticas (peroxidases) e não enzimáticas, atuam sobre os constituintes da parede celular, através da produção de agentes oxidantes de

baixo peso molecular, deixando o substrato modificado e rico em lignina (Lundell et al. 2014).

Em um dos primeiros estudos de degradação fúngica, Mougín et al. (1994), observaram a biotransformação da ATZ pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*, do grupo conhecido como podridão branca, obtendo a diminuição de 48% da concentração inicial do herbicida nos quatro primeiros dias de teste, demonstrando claramente a mineralização do grupo etílico do herbicida pela via lignina peroxidase e peroxidase de manganês. A partir deste trabalho, os fungos da podridão branca foram considerados a principal classe que degrada a ATZ via sistema de degradação da lignina.

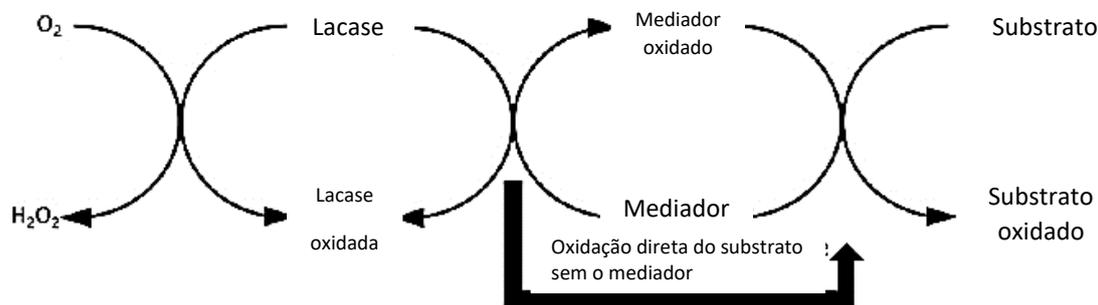
As enzimas mais importantes do complexo enzimático ligninolítico fúngico são a lacase, manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP), com maior potencial para aplicações em química verde, especialmente na degradação de xenobióticos como corantes, compostos estrogênicos e em outros poluentes ambientais (Voběrková et al. 2018). As enzimas ligninolíticas também têm sido usadas em processos industriais e aplicadas em produção de biocombustíveis (Plácido & Capareda, 2015). Na tabela 2 estão descritos os principais fungos produtores dessas enzimas.

**Tabela 2.** Espécies de fungos e suas enzimas produzidas. Adaptado de: (Datta et al. 2017).

<b>Fungos</b>	<b>Enzimas</b>
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Lignina peroxidase
<i>Phlebia radiata</i>	Lignina peroxidase
<i>Phlebia tremellosa</i>	Lignina peroxidase
<i>Phanerochaete sordida</i>	Manganês peroxidase
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Manganês peroxidase
<i>Trametes versicolor</i>	Manganês peroxidase
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	Manganês peroxidase
<i>Phanerochaete radiata</i>	Lacase
<i>C.subvermispora</i>	Lacase
<i>Pleurotus eryngii</i>	Lacase
<i>Trametes versicolor</i>	Lacase
<i>Trametes hirsuta</i>	Lacase
<i>T. ochracea</i>	Lacase

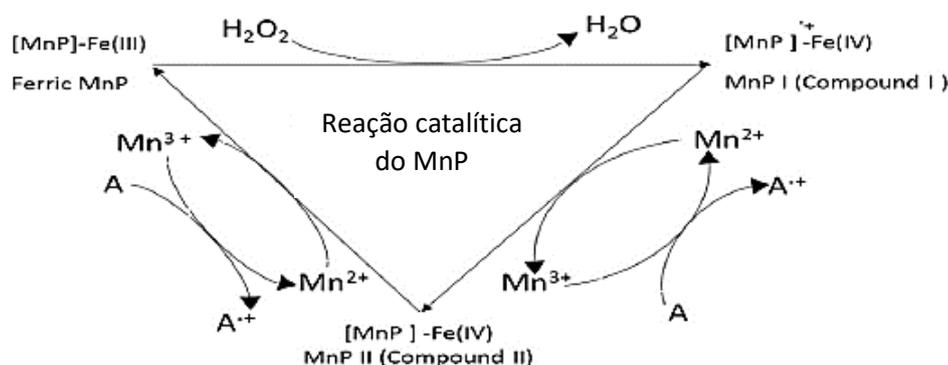
Lacases (E.C. 1.10.3.2) são produzidas na natureza por plantas superiores, alguns insetos, bactérias e fungos, principalmente os da podridão branca. É uma enzima que contém cobre e pertence ao grupo oxidoreductase, também conhecida como oxidases de cobre azul. São capazes de oxidar uma ampla diversidade de

substâncias orgânicas e inorgânicas, especialmente compostos fenólicos (Figura 6). Sua massa molecular varia de 50 - 100 kDa (Datta et al. 2017; Voběrková et al. 2018).



**Figura 6.** Ciclo de catalise da Lacase. (Fonte: Datta et al. 2017).

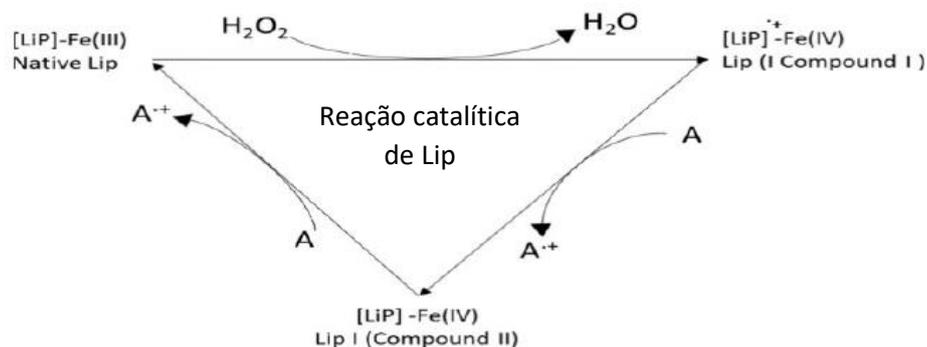
Manganês peroxidases (E.C. 1.11.1.13) são as enzimas de maior importância nos estágios iniciais da degradação da lignina, devido ao seu potencial redox e liberação de dióxido de carbono (Morgenstern et al. 2008). É produzida por uma variedade de fungos decompositores do solo e praticamente todos os basidiomicetos colonizadores da madeira que causam a podridão branca. É uma proteína heme glicosilada com a massa molecular entre 40 - 50 kDa. Sua atividade catalítica ocorre pelo processo de oxidação de unidades de lignina fenólicas e não-fenólicas e dos íons de  $Mn^{2+}$  para  $Mn^{3+}$ , usando peróxido de hidrogênio (Figura 7). O  $Mn^{3+}$  gerado é livremente difusível e participa da reação de oxidação como um par redox (Datta et al. 2017; Voběrková et al. 2018).



**Figura 7.** Ciclo de catalise da enzima manganês peroxidase. A - Substrato redutor aromático não fenólico (Fonte: Datta et al. 2017).

A enzima lignina peroxidase (E.C. 1.11.1.14) é uma glicoproteína heme com baixa massa molecular, contém um grupo prostético de protoporfirina de ferro que necessita de peróxido de hidrogênio para catalisar a oxidação de unidades de lignina não fenólica e mineralizar os compostos aromáticos recalcitrantes (Datta et al.

2017). Apresenta uma grande eficiência como degradador de poluentes com alto potencial de oxidorredução, e pode oxidar xenobióticos que são difíceis de clivar, como  $\text{ClC}_4$ , clorofórmio e hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine. Essa enzima possui um elevado potencial redox comparando com outras peroxidases, e oxida estruturas fenólicas e não-fenólicas da lignina sem a necessidade de um mediador (Figura 8) (Voběrková et al. 2018).



**Figura 8.** Ciclo de catalise da enzima lignina peroxidase. A - Substrato redutor aromático não fenólico (Fonte: Datta et al. 2017).

Estudos realizados com fungos da podridão marrom constaram que estes são capazes de degradar compostos xenobióticos pelo mecanismo de Fenton, por vias não enzimáticas e enzimáticas, nesta última envolvendo a celobiose desidrogenase (Khromonygina et al. 2004). Fungos filamentosos não esporulados também são capazes de produzir celobiose desidrogenase e crescer em meio sólido com altas concentrações de ATZ, até 500 mg/L; o cultivo deste fungo foi capaz de reduzir as concentrações de ATZ em 50 vezes após 40 dias (Fan & Song, 2014).

Foi testada a capacidade de degradação da espécie *Aspergillus niger* AN 400 em concentrações de até 30 mg/L de ATZ em biorreator, com adições de glicose em concentrações variadas. A taxa de degradação duplicou e resultou na remoção final de 30%, com concentração de 3 g/L de glicólise, e para concentrações até 5 g/L a biodegradação aumentou em 60%. O fungo se mostrou resistente ao herbicida estudado, sendo um microrganismo propício para o tratamento de águas residuárias contaminadas com ATZ (Marinho et al. 2017). Estudos realizados em plantas com raízes micorrizadas acumularam mais ATZ do que as plantas não colonizadas por fungos, além da melhora na dissipação da ATZ em solos que continham fungos micorrízicos independente das taxas de aplicação da ATZ (Huang et al. 2007). Contudo, os estudos *in vitro* não refletem o processo ambiental de biodegradação da ATZ.

### 2.3 Fungos filamentosos, diversidade ecológica e agrossistemas

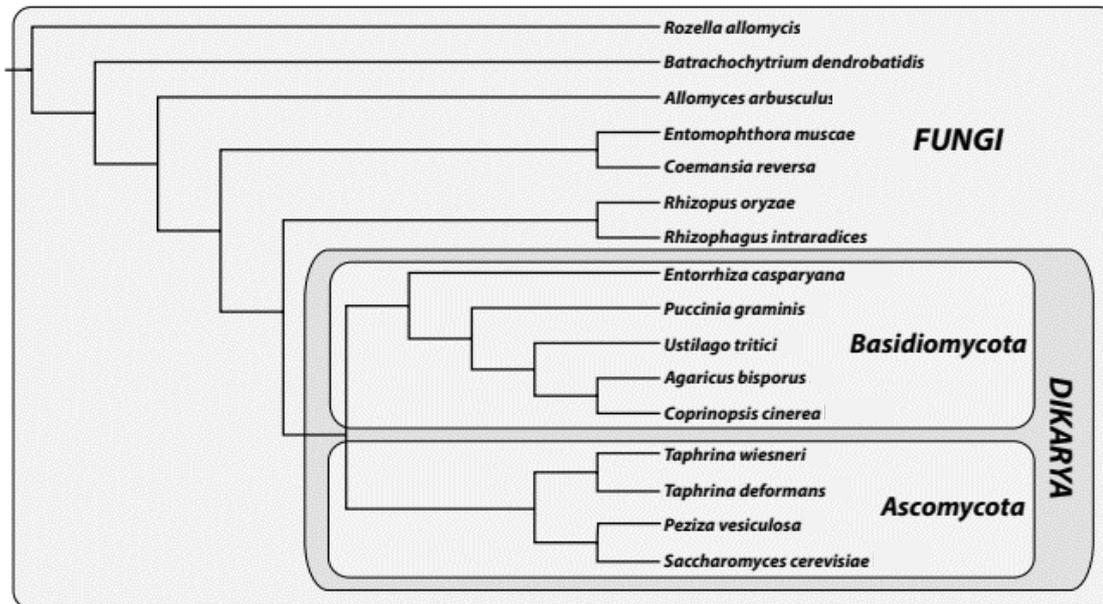
Os fungos pertencem a um grupo taxonômico altamente diversificado, acreditando que exista aproximadamente 1,5 milhões de espécies de fungos na Terra, sendo que 100 mil espécies já foram descritas, mas acredita-se que a real diversidade dos fungos é estimada em 0,8 milhões a 5 milhões de espécies (Liu et al. 2015). Das espécies descritas, 14 mil são macroscópicos, 5 mil são comestíveis e aproximadamente 1800 espécies possuem propriedades medicinais (Smith, 2014). São organismos eucarióticos, podendo ser unicelulares ou multicelulares. Suas células se agrupam em filamentos septados ou não, esses filamentos são chamados de hifas e quando há condições favoráveis as hifas formam o micélio (Tortora et al. 2012).

Os fungos possuem uma ampla distribuição e habitam quase todos os ambientes conhecidos na Terra, como: Antártica, águas hiper salinas do mar morto, solos, florestas tropicais e temperadas, oceanos e desertos. Eles também habitam ambientes como: os tratos intestinais de insetos, raízes de plantas, epiderme dos seres humanos, colheitas, alimentos e animais domésticos (Cox, 2007). A maioria é terrestre e vive no solo ou em matéria orgânica morta, como animais e plantas; eles desempenham papéis ecológicos fundamentais como decompositores, mutualistas ou patógenos de plantas e animais, e conduzem o ciclo do carbono (Tedersoo et al. 2014)

Além da decomposição de matéria orgânica, os fungos filamentosos desempenham papéis importantes nas aplicações farmacêuticas e biotecnológicas. Por serem produtores de metabólitos primários e secundários, são importantes economicamente para a indústria de alimento, papel e farmacêutica, são explorados em vários contextos, desde a proteção de cultivos, como controle de pragas, até a medicina humana (Kluge, et al., 2018).

O ordenamento taxonômico mais aceito para os fungos é um reino, um subdomínio, sete filos, dez subfilos, 35 classes, 12 subclasses e 129 ordens, em destaque os sete filos. São propostos três filos de fungos flagelados: Blastocladiomycota, Chytridiomycota e Neocallimastigomycota. Os Microsporida são parasitas unicelulares, os Glomeromycota são simbioses obrigatórios, o subdomínio Dikarya abrange os filos Ascomycota e Basidiomycota, que são os mais abundantes e diversos (Figura 9) (Hibbett et al. 2007). Mesmo com uma enorme diversidade e importante função no ecossistema, ainda pouco se sabe sobre os padrões gerais da

diversidade fúngica ou papéis funcionais em grandes escalas geográficas (Tedersoo et al. 2014).



**Figura 9.** Definições e especificadores de táxons filogenéticos para fungos. Topologia baseada em Spatafora et al. (2016) e a topologia alternativa de Bauer et al. (2015). Fonte: (Hibbett et al. 2018).

Tradicionalmente, documentos de estudos sistemáticos e revisões monográficas com apenas um ou alguns autores, mas iniciativas colaborativas iniciaram uma mudança de mentalidade com uma classificação de vários autores e de âmbito comunitário para o reino dos fungos (Hibbett et al. 2007). Além disso, a comunidade micológica possui vários recursos fundamentais atualizados regularmente para espécies, classificação e nomenclatura de nível superior, como *Myconet* (<http://www.fieldmuseum.org/myconet>), *Index Fungorum* (<http://www.indexfungorum.org>) e outros bancos de dados do *CABI Bioscience* e o *Dictionary of the Fungi* (Kirk et al. 2008). Esse trabalho resultou na última atualização da distribuição taxonômica que está sendo publicada continuamente na edição do editorial “*Fungal Diversity*”, com início em 2015 (*Fungal diversity notes 1–110: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal species*) e última versão em 2019, com a décima série das notas sobre diversidade de fungos (*Fungal diversity notes 1036–1150: taxonomic and phylogenetic contributions on genera and species of fungal taxa*).

Os fungos do solo representam um dos grupos taxonômicos mais diversificados, desempenham um papel fundamental para as funções do solo, como a ciclagem de nutrientes minerais, formação da matéria orgânica e a formação da estrutura do solo. Os fungos representam a maior parte da biomassa de microrganismos do solo e

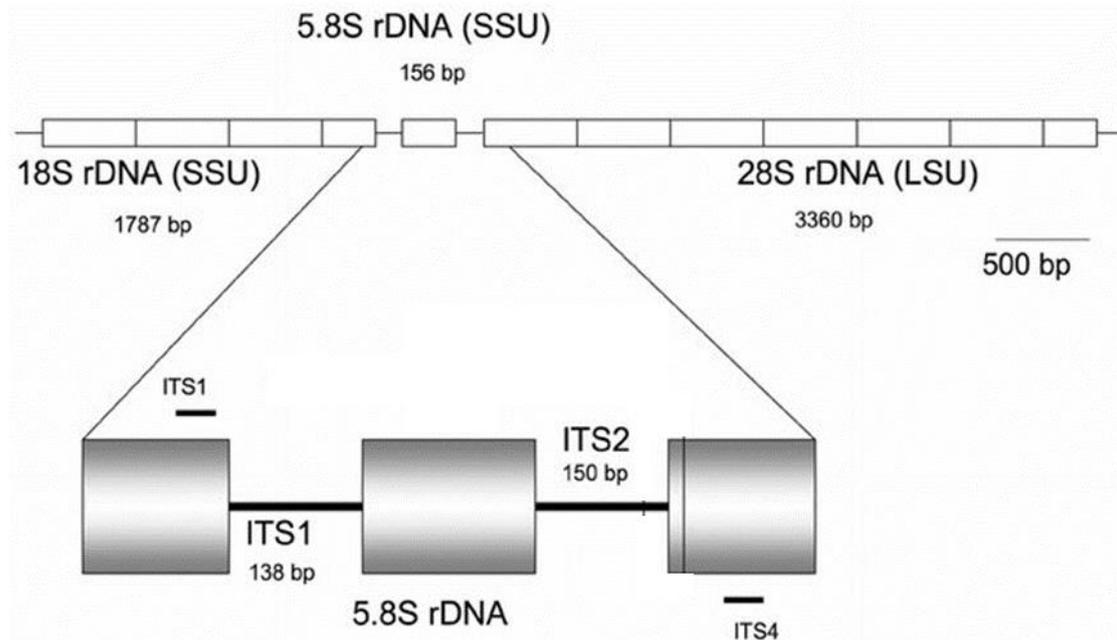
compreendem vários grupos funcionais como decompositores, fungos micorrízicos e produzem uma infinidade de enzimas capazes de metabolizar muitos compostos xenobióticos (Tong et al. 2015; Chen et al. 2018; Li et al. 2018). Fungos do solo também tem o potencial de influenciar a produtividade e diversidade das plantas, através do aumento de nutrientes, principalmente em ambientes pobres, onde os simbioses são os responsáveis pela obtenção de nutrientes limitantes (Chen et al. 2017).

As comunidades de fungos do solo apresentam um particionamento em diferentes camadas no horizonte do solo, contendo espécies fúngicas e composições comunitárias distintas; isso se dá devido ao contraste físico-químico do solo, propriedades de nicho e os diferentes processos de estruturação da comunidade entre as camadas do solo (Chen et al. 2018). A vegetação pode influenciar de várias maneiras a comunidade do solo, mas o fator principal estruturante das comunidades fúngicas do solo é a separação da matéria orgânica com a progressão da profundidade (Asplund et al. 2018).

Antes da filogenética molecular, a maioria das espécies de fungos eram descritas com base em sua morfologia e associações de hospedeiros; portanto, o número de espécies é compreensivelmente subestimado. Estudos filogenéticos indicaram distintamente que numerosos *taxas* morfologicamente semelhantes podem ser representadas como linhagens distintas em diferentes famílias (Liu et al. 2015). O método baseado no sequenciamento de fragmentos genômicos permite a detecção, a estimativa da diversidade fúngica em diferentes ambientes e a avaliação das relações filogenéticas. Ferramentas baseadas em ácido desoxirribonucleico (DNA) foram desenvolvidas e cada vez mais são utilizadas para identificação de fungos. O DNA ribossomal (rDNA) é a sequência genômica que mais tem sido utilizado para classificação e identificação de fungos. O rDNA é composto por várias regiões pequenas sendo elas: subunidade pequena 18S (*small subunit* - SSU), subunidade grande 28S (*large subunit* - LSU) e o espaçador interno transcrito (*internal transcribed spacer* - ITS) que compõe duas seções ITS1 e ITS2 (Badotti et al. 2018).

A região mais utilizada para a identificação e análise filogenética em grupos fúngicos é o gene ITS (Figura 10) que foi selecionado como *DNA barcoding* primário para fungos. O *DNA barcoding* é um sistema de identificação molecular baseado em um pequeno fragmento de DNA que funciona como um código de barras, tendo a variabilidade suficiente para o nível interespecífico e pouco variável para nível

intraespecífico, o que permite a distinção entre as espécies biológicas (Badotti et al. 2018).



**Figura 10.** Diagrama do complexo gênico do rDNA de fungos, contendo as subunidades 18S, 28S e 5.8S, e a localização dos genes ITS. Fonte: Montero et al. 2008.

Atualmente há uma variedade de técnicas utilizadas para o estudo da biodiversidade fúngica, como *DNA-barcoding* associado com *high-throughput*. Este método se baseia na classificação e identificação das sequências para a rápida detecção da diversidade, no qual a confiabilidade dos resultados vai depender da base de dados e da interpretação dos resultados (Myrold et al. 2014; Hibbett et al. 2016). Outra técnica bastante utilizada é o *Metabarcoding* para identificação em longa escala de fungos a nível de comunidade (Tedersoo et al. 2016). *Metabarcoding* é um método de avaliação da biodiversidade utilizando duas tecnologias, sendo elas, uma baseada na identificação de DNA e a outra no sequenciamento de DNA de alto rendimento, são utilizados *primers* de PCR universais para amplificar a composição de *DNA Barcoding* através da coleção de organismos ou de DNA ambiental, sem a necessidade de isolamento dos organismos (Zhang et al., 2012).

A diversidade genética das comunidades microbianas e sua relação com os processos biogeoquímicos definem a diversidade funcional dos ecossistemas. Portanto, a análise do RNA, assim como a do DNA, é de suma importância na ecologia microbiana e uma das principais ferramentas para o estudo e a definição da redundância funcional. Há trabalhos indicam que o potencial funcional metabólico das comunidades

microbianas do solo está estritamente relacionado com as condições ambientais, logo, em ambientes semelhantes, há maior probabilidade de promover uma função similar da comunidade microbiana (Lambais et al. 2005; Louca et al. 2016).

A diversidade funcional é um componente da biodiversidade que se refere a variedade de funções que os organismos executam nas comunidades e ecossistemas; essas funções metabólicas estão associadas a fatores ambientais em um determinado tempo e local (Petchey & Gaston, 2006). Com o estudo da diversidade funcional é possível perceber que as comunidades também mostram alta redundância funcional, ou seja, a multiplicidade de funções pode ser realizada por múltiplos organismos coexistentes taxonomicamente distintos. A redundância funcional pode ser vista como uma medida parcial da diversidade, assim a diversidade dentro dos grupos funcionais é matematicamente complementar à riqueza funcional de uma comunidade (Louca et al. 2018).

Devido à grande biodiversidade de fungos, bem como seu potencial biotecnológico, como no caso da biorremediação, há um grande interesse na diversidade genética e funcional destes microrganismos, pois o conhecimento sobre a sua abundância e distribuição é essencial para o entendimento de quais são os principais grupos dominantes em determinado ambiente e também para conhecer quais genes estão sendo expressos conferindo as principais funções ecológicas que esses microrganismos estão mediando nestes locais (Louca et al. 2018).

#### 2.4 Solo agrícola

O solo é formado através de processos que ocorreram há milhares de anos, devido à desagregação das rochas originais e de acordo com a intensidade e a combinação de vários fatores (clima, material de origem, organismos, tempo e relevo), que determinaram a criação de cada tipo de solo. São compostos por três fases: sólida, líquida e gasosa. A fase sólida é constituída da matéria inorgânica (minerais) e matéria orgânica (produto da decomposição). Tanto a fase líquida quanto a gasosa compartilham o espaço poroso do solo, sendo a fase líquida responsável pela nutrição das plantas através da solução nutritiva do solo e a fase gasosa responsável pelo fornecimento de oxigênio e outros gases às raízes e microrganismos (EMBRAPA, 2013).

A expressão “solo saudável” é usada para designar a capacidade do solo de operar como um sistema vivo, sustentar a atividade biológica e manter a saúde

de plantas e animais. Sendo assim, a saúde do solo está correlacionada positivamente com a produtividade e a sustentabilidade do sistema, ou seja, solos saudáveis são considerados produtivos pela eficiência em suportar uma variedade de fatores causadores de estresses, como os causados pelas atividades agrícolas (Roese, 2018).

O solo degradado é definido pela perda ou declínio persistente da capacidade de fornecer serviços ecossistêmicos. Estimativas indicam que 25% da área terrestre do planeta pode ser severamente degradada, apesar dos esforços globais para impedir a degradação, as áreas afetadas continuam a aumentar. Inúmeros estudos destacam a erosão como um importante processo de degradação do solo e como um relevante indicador da saúde do solo (Crossland et al. 2018).

Vários fatores que contribuem para a degradação do solo têm sido atribuídos às práticas agrícolas insustentáveis, desmatamento, políticas governamentais desfavoráveis, excesso de pastoreio e pastoreio livre, corte, queima e falta de intervenções de conservação do solo e da água. As práticas agrícolas insustentáveis fazem uso de insumos e ignoram os processos naturais que apoiam a formação do solo e compõe a resiliência do agrossistema, como ciclagem de nutrientes, controle de erosão do solo, sequestro de carbono e regulação da água (Tesfahunegn et al. 2011; Kuria et al. 2018).

A qualidade do solo pode ser categorizada por indicadores químicos, físicos e biológicos. Os indicadores químicos estão relacionados à matéria orgânica do solo, ciclagem de nutrientes, relações hídricas, pH, salinidade, carbono orgânico no solo e nitrogênio total (Barrios, 2007). A matéria orgânica do solo é considerada um indicador de qualidade do solo devido a sua suscetibilidade de alteração em relação às práticas de manejo e por correlacionar com a maioria das propriedades do solo (Mielnickzuk, 1999). A ciclagem de nutrientes permite a entrada de nutrientes e fornece o aporte de compostos como carbono, nitrogênio e água para solo. No sistema agrícola, pode ocorrer um desequilíbrio no processo de ciclagem resultante dos processos de mineralização, consumo desequilibrado de nutrientes pelo cultivo vegetal e perdas por erosão, que são maiores que a entrada de nutrientes oriundos da decomposição da matéria orgânica e processos biogeoquímicos (Araújo et al. 2012).

Os indicadores físicos são importantes elementos de sustentabilidade, pois estão envolvidos no suporte ao crescimento radicular, armazenagem e suprimento

de água e nutrientes, trocas gasosas e atividade biológica. Encontram-se intimamente associados ao arranjo de partículas sólidas e poros envolvidos em fluxos hidráulicos, como textura, espessura, compactação do solo, resistência à penetração, porosidade, capacidade de retenção d'água, condutividade hidráulica e estabilidade de agregados (Schloter et al. 2003).

A espessura do solo tem sido considerada um dos melhores indicadores de qualidade, pois está relacionada com atividade biológica que proporciona a ciclagem de nutrientes e retenção da matéria orgânica. Para a produtividade agrícola, é um fator importante para a manutenção da água e nutrientes necessário ao desenvolvimento vegetal (Snakin et al. 1966).

Já compactação é um processo que altera a estrutura e a espessura do solo, aumentando sua densidade, diminuindo a porosidade e a permeabilidade à água e ar, podendo alterar o padrão de crescimento radicular. A resistência do solo à penetração é utilizada para avaliar sua compactação, é de fácil e rápida determinação e está diretamente associada ao crescimento das plantas (Batey & Mckenzie, 2006).

A porosidade de um solo é dada pelo volume de espaços vazios existentes entre as partículas sólidas, e classificada quanto ao tamanho do poro: macroporos são responsáveis pelo livre movimento da água, do ar e crescimento radicular, enquanto os microporos são responsáveis pela formação de reservatório de água. O padrão de macroporos e microporos define a capacidade de retenção de água, determinando o transporte e armazenamento, o perfil de erosão e o teor de água disponível (Lowery, 1996; Doran & Parkin, 1996). A condutividade hidráulica é a capacidade do solo em transmitir água dependendo da geometria dos poros e das propriedades do fluido contido nele, como a viscosidade e a densidade (Bronick & Lal, 2005).

Entre os indicadores físicos, a espessura, a compactação, a porosidade e a condutividade hidráulica estão intimamente relacionadas à estabilidade de agregados, ou seja, ao padrão de arranjo das partículas primárias (areia, silte e argila) e os poros do solo. Os agregados são resultantes de diversos fatores ambientais como: manejo do solo, influência das plantas, atividades microbianas, reserva nutricional e disponibilidade de água (Bronick & Lal, 2005).

Entre os indicadores biológicos, os fungos micorrízicos são considerados os organismos mais eficientes na estabilização da estrutura do solo. Graças à sua rede externa de hifas que crescem na matriz do solo e uma substância chamada glomalina, produzem um arranjo que mantém as partículas do solo unidas, formando um agregado, que pode melhorar as características físicas do solo e a resistência à erosão. Este agregado melhora a estrutura e a relação da água no solo, bem como o aumento na absorção de nutrientes e água para as espécies vegetais, desempenhando um papel significativo na restauração ecológica ou em um solo considerado “saudável” (Asmelash et al. 2016; Neuenkamp et al. 2018).

Entender e selecionar práticas de cultivo que aumentem a biodiversidade fúngica, pode diminuir danos e desempenhar um papel crucial para a manutenção da qualidade física e saúde do solo, pois estimula a ciclagem de nutrientes, melhora a estrutura do solo e o aumento de íons de baixa mobilidade, levando a diminuição de aplicações químicas e conseqüentemente a proteção do meio ambiente (Frac et al. 2018).

Vale ressaltar que um solo com uma grande diversidade e atividade fúngica é mais resiliente a estresses e doenças do solo, com maiores chances de manter os processos ecológicos após um distúrbio, em relação a solos com baixa diversidade (Roese et al. 2018). Esses microrganismos são responsáveis por manter um estoque de nutrientes no solo que podem ser rapidamente disponibilizados devido a sua rápida ciclagem, reduzindo perdas de nitrogênio por lixiviação ou desnitrificação e fósforo por fixação, uma vez que os nutrientes ficam protegidos nas células dos fungos, por exemplo. Essa microbiota ativa resulta na melhora da qualidade física, como espessura, compactação e porosidade. (Nogueira & Hungria, 2013).

A atividade agropecuária talvez seja a atividade que mais exerça influência na qualidade do solo, alterando as características físicas e atuando diretamente na sua estrutura (Macedo, 2009). O uso de defensivos agrícolas altera todos os estágios dos indicadores relatados e resulta em um efeito em cadeia na saúde do solo. A capacidade do solo agrícola de realizar os processos de transformação, retenção e transporte da ATZ está ligada ao potencial de biodegradação pela microbiota, quando a microbiota é ativa, rapidamente consegue responder à entrada do poluente, não resultando em impactos diretos nas características químicas, biológicas e físicas do solo. Por outro lado, quando o solo apresenta um baixo indicador biológico, o defensivo

agrícola vai resultar imediatamente na diminuição da microbiota, causando mudanças no processo de ciclagem de nutrientes, geração e retenção da matéria orgânica e da água para a nutrição vegetal, alterando diversas características físicas, como compactação, formação de agregados e porosidade. Neste sentido, conhecer a diversidade microbiana e seu potencial de biodegradação é uma ferramenta direta para investigar o grau da degradação/alteração da qualidade do solo.

## 2.5 Sistema de microcosmo para o estudo da diversidade fungica e biodegradação da atrazina

Microcosmo é uma unidade de estudo de pequenos sistemas multiespecíficos que constitui de um subconjunto da comunidade biótica e das propriedades abióticas de um ecossistema maior, incluindo cadeia trófica ou ciclos de produção-consumo, que contribui para compreensão de processos naturais (Yu & Rinklebe, 2011). Os microcosmos podem ser naturais ou artificiais (Figura 11); os naturais são habitats pequenos, colonizados por organismos pequenos, como no caso das bromélias-tanque onde cada fitotelmo pode ser considerado um microcosmo (Pires et al. 2014). Já os artificiais são confeccionados em laboratório e ficam total ou parcialmente isolados do mundo externo (Matheson, 2008).



**Figura 11.** Exemplo de microcosmos naturais: A) fitotelmo de uma bromélia; B) buraco em tronco de árvore. Microcosmos artificiais: C) um exemplo aquático; D) e em solo.

Experimentos de microcosmos podem oferecer muitos critérios de efeito que consideram a interação entre várias espécies; também apresentam um nível suficiente de padronização e replicação. Há duas abordagens laboratoriais para os microcosmos artificiais: aquele que é derivado diretamente da natureza, que simula um ecossistema natural específico utilizando espécies e seus componentes, e o microcosmo gnotobiótico, que é totalmente sintético ou montado a partir de ambientes e sedimentos contendo uma composição exata de espécies normalmente já estudadas a partir de culturas puras (Clément et al. 2014).

Os microcosmos são considerados estruturas de escala de bancada de laboratório, e devido ao seu tamanho, apresentam algumas vantagens, como autenticidade, flexibilidade, alta relação preço/desempenho e segurança, além da possibilidade de controle das condições de incubação. Sendo possível entender o destino do composto alvo nas condições testadas, não se espera que o microcosmo simule o ambiente natural, e seus resultados não devem ser extrapolados para a resposta ambiental; contudo, permite ao pesquisador compreender os fatores e as variáveis para o estudo em questão (Hu et al. 2017).

As pesquisas conduzidas com microcosmos iniciaram na década de 60 e podem ser utilizadas em quase todas as áreas da ecologia terrestre e aquática. O uso de microcosmos por ecologistas proeminentes como GF Gause, HT Odum, R Margalef, RH Whittaker, RJ Beyers, GD Cooke e EP Odum contribuíram para o desenvolvimento de importantes conceitos ecológicos, englobando o princípio da exclusão competitiva, sucessão e o princípio da potência máxima. Além de utilizados para vários estudos ecológicos, os microcosmos são analisados para o estudo dos efeitos e o destino ambiental de contaminantes, defensivos agrícolas, estressores, novos compostos e organismos geneticamente modificados (Matheson, 2008).

Há uma variedade de trabalhos utilizando o método de microcosmo, como no caso da avaliação do efeito do glifosato sobre microrganismos nitrificantes, quando combinado com fertilizante de N inorgânico, avaliando os impactos funcionais e estruturais da população microbiana oxidante de amônia (Zabaloy et al. 2017). Há estudos com bioaugmentação para degradação de ATZ pela bactéria do solo *Arthrobacter aureescens* cepa TC1, quanto sua eficácia no solo e no meio aquático. Foi observado que 95% da terbutilazina (um subcomposto da ATZ) foram removidos dos microcosmos de solo durante os três primeiros dias de bioaugmentação (Silva et al. 2015).

Outras abordagens para a biodegradação de agrotóxicos são o consórcio microbiano, conhecido de biomistura, que busca entender a dinâmica da comunidade microbiana e as atividades enzimáticas após a exposição ao agroquímico. O fator crucial é identificar possíveis mudanças induzidas na comunidade microbiana e se suas atividades podem influenciar na biodegradação deste composto (Karanasios et al. 2012). Testes realizados com a biomistura observaram a capacidade de suportar e de degradar sucessivas aplicações de ATZ, mesmo em alta concentração de 40 mg/Kg. Ocorreram pequenas alterações na comunidade microbiana após a aplicação da ATZ, e

as atividades bioquímicas foram inibidas ou estimuladas, efeitos negativos foram transitórios e recuperados após o tempo de aplicação da ATZ (Tortella et al. 2013).

A montagem do microcosmo é semelhante em praticamente todos os experimentos; o que vai variar é se a representação será de um ambiente terrestre ou aquático, o organismo alvo e o grau de complexidade do sistema. É ideal que os componentes utilizados no microcosmo sejam do ecossistema natural e submetido aos mesmos efeitos físicos, químicos e biológicos para melhor eficiência do estudo (Matheson, 2008).

### 3 OBJETIVOS

O objetivo do estudo foi caracterizar a comunidade de fungos filamentosos do solo de uma região agrícola sujeita por longo tempo à aplicação do herbicida ATZ em um sistema de microcosmos.

#### 3.1 Objetivos específicos

Para o desenvolvimento do projeto foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

1. Montar um sistema de microcosmo;
2. Quantificar a ATZ presente no solo por método cromatográfico.
3. Isolar fungos filamentosos através de meios de cultura generalista e seletivos para fungos ligninolíticos;
4. Caracterizar morfológicamente as linhagens isoladas e classificar em morfoespécies;
5. Realizar a identificação taxonômica por métodos moleculares (através da purificação e sequenciamento das regiões ITS1-5 e 8S-ITS2 do DNA ribossômico);
6. Determinar a riqueza e composição da comunidade de fungos filamentosos no sistema de microcosmo;

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Projeto piloto

Visando o melhor delineamento do projeto inicialmente foi realizado um estudo piloto. No piloto, foi realizada uma coleta do tipo amostra composta no dia 14 de setembro 2018 em dois tipos de solos na região agrícola da Bacia do Paraná 3, na cidade de Toledo/PR, com dois tratamentos agrícolas: solo sujeito à técnica agrícola de terraceamento (24°48'51''S; 53°33'24''O) e solo manejado com a técnica de plantio direto (24°48'59''S; 53°33'16''O). A técnica de terraceamento consiste na construção de terraços transversais compostos por um dique e um canal, com a finalidade de diminuir o escoamento da água superficial, diminuindo assim, o processo de erosão (De Maria & Filho, 2009). A técnica de plantio direto é uma prática que também visa o combate à erosão, e consiste em que a palha e os restos vegetais permaneçam na superfície do solo, aumentando a rugosidade do terreno; assim, a taxa de infiltração da água é maior, e diminui o volume de escoamento da enxurrada (Motter & Almeida, 2015).

Foram coletadas 10 sub- amostras em pontos diferentes de ambos os solos, de 0 a 10 cm e 10 a 20 cm de profundidade, as quais foram armazenadas em sacos plásticos estéreis devidamente identificados e transportados ao Laboratório de Bioquímica e Microbiologia da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA) sob refrigeração para a posterior confecção das amostras compostas.

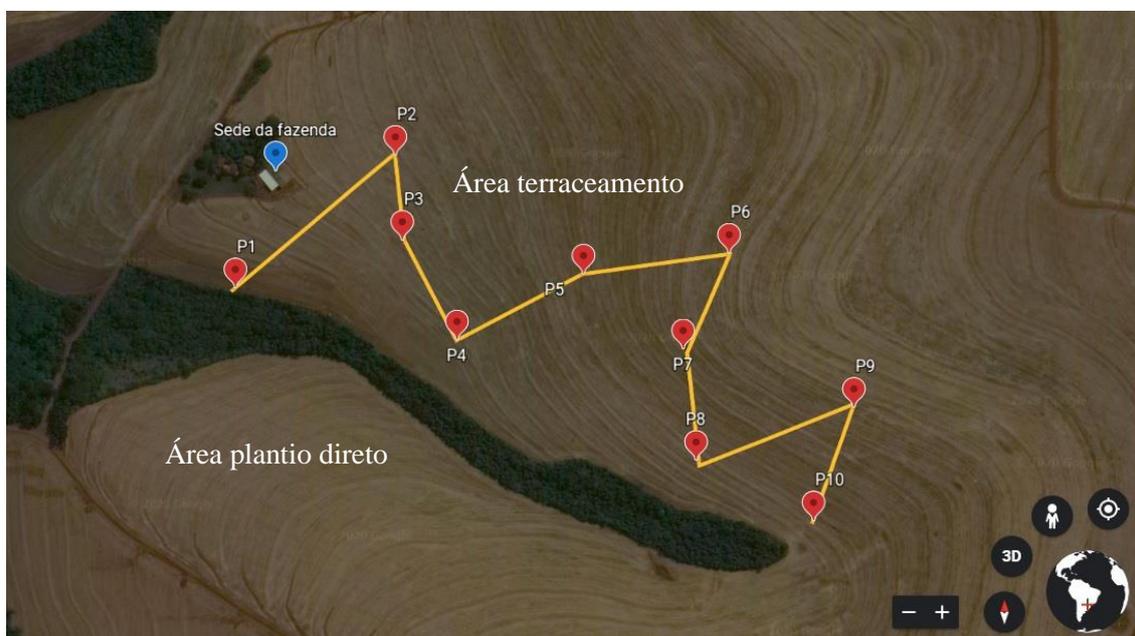
Em seguida, foram realizados três métodos de semeadura para obter a comparação dos resultados: 1) diluição seriada em água peptonada (0,1 %); 2) diluição seriada em solução salina (9 g de NaCl/L); e 3) lavagem do solo por água deionizada sob um conjunto de 5 peneiras granulométricas. Após a diluição seriada foram utilizados 100 µL de cada amostra para as semeaduras dos tratamentos até a diluição 10<sup>-4</sup>.

As amostras foram diferentemente processadas para o isolamento fúngico no meio de cultivo sólido de Extrato de Malte 2% (MA2) e o meio seletivo MA2 com a adição do reagente guaiacol (concentração de 4 mM) para a seleção de fungos com atividade ligninolítica. Foram adicionados 100 µL de dois tipos de antimicrobianos, Sulfato de Amicacina (concentração de 50 mg/mL) e Sulfato de Gentamicina (concentração de 40 mg/mL), aos meios de cultura, para evitar o crescimento de bactérias.

As placas semeadas foram incubadas à 28°C e o crescimento dos fungos foi analisado diariamente durante 30 dias.

## 4.2 Coleta das amostras

A coleta das amostras foi realizada no dia 19 de fevereiro de 2019 na região do município de Toledo/ PR, ( $24^{\circ}48'51''\text{S}$  e  $53^{\circ}33'24''\text{O}$ ), na área que utiliza a técnica agrícola de terraceamento (Figura 12), a escolha do local se deu após a realização do projeto piloto, por ser a área que apresentou maior crescimento fúngico.



**Figura 12.** Local de coleta das amostras para a realização do projeto (Fonte: Google Earth).

Foram medidos os seguintes parâmetros do solo: temperatura, umidade e pH de cada ponto (Figura 13; Tabela 3). Em seguida, foi coletado aproximadamente 900 g de solo em 10 pontos diferentes (Figura 12), com profundidade de 0 a 20 cm, totalizando 10 sub-amostras. Em seguida, as sub-amostras (9 kg de solo) foram misturadas sistematicamente e homogêneas em um saco plástico estéril para compor uma amostra composta.



**Figura 13.** Local de realização da amostragem do solo do presente estudo. A) Análise direta dos parâmetros de pH, temperatura e umidade do solo. B) Coleta da amostra de solo.

A amostra composta foi devidamente identificada e transportada sob refrigeração ao Laboratório de Bioquímica e Microbiologia da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA) para posterior processamento e análise. No laboratório, alíquotas foram separadas antes da montagem dos microcosmos para as análises cromatográficas. A amostra da 1ª coleta também foi enviada para análises físico-químicas, através da prestação de serviço de terceiros.

**Tabela 3.** Medidas de temperatura, umidade e pH do solo em cada ponto de coleta. A umidade corresponde a uma escala de 0 (seco) a 10 (úmido), obtidos usando um medidor analógico (*Tecnosolarled*).

<b>Ponto</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Umidade</b>	<b>pH</b>
<b>1</b>	24,5	4,5	5,0
<b>2</b>	23,7	4,0	6,5
<b>3</b>	23,7	5,9	6,0
<b>4</b>	23,6	3,0	6,0
<b>5</b>	23,6	3,0	6,5
<b>6</b>	23,9	3,0	6,5
<b>7</b>	24,0	5,0	6,3
<b>8</b>	23,5	3,5	6,5
<b>9</b>	24,0	3,5	6,5
<b>10</b>	24,0	4,0	6,5

As características químicas da amostra foram analisadas pela empresa TECLAB em relação a concentração de Cálcio, Carbono orgânico total, Demanda Bioquímica de Oxigênio, Ferro total, Potássio, Magnésio, Nitrogênio, Fósforo e pH.

#### 4.3 Análises cromatográficas

No laboratório multiusuários Engenheira Enedina Alves Marques (Parque Tecnológico Itaipu), para avaliação inicial da metodologia de extração da ATZ e seus metabólitos DIA e DEA do solo foram pesados 2 g de solo de cada sistema de microcosmos da segunda e da terceira coleta (como testes da metodologia inicialmente) e transferidos para *Erlenmeyer* com capacidade de 50 mL, sendo adicionados 3 mL de mistura extratora (acetonitrila). Os *Erlenmeyers* foram agitados em mesa agitadora orbital durante 15 minutos na rotação de 750 rpm. Após cada período de agitação, o sobrenadante

foi transferido para um tubo tipo *Falcon* de 15 mL (Amadori et al. 2013). Este procedimento foi realizado três vezes para cada microcosmos.

O sobrenadante retirado foi centrifugado por 15 minutos a 2000 rpm; em seguida o extrato orgânico foi transferido para balão volumétrico de 10 mL, e quando necessário avolumado com acetonitrila (ACN). Logo após, as amostras foram transferidas para tubos com capacidade de 2 mL e submetidas ao processo de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (em inglês: *High performance liquid chromatography* – HPLC).

As determinações por HPLC foram realizadas em um Cromatógrafo *Thermo Fisher Scientific* – modelo *Dionex Ultimate 3000 series*, com bomba (LGP-3400SD), injetor (WSP-3000), com detector de arranjo de diodos (DAD 3000), foi utilizada a coluna de fase reversa ACE 5 C18 (250 x 4,6 mm – 5 µm), a coluna guarda de mesma fase e com auxílio do *Software Chromeleon 7* versão 7.2.1.5537. Foi utilizada como fase móvel uma mistura de água ultrapura e acetonitrila 40:60 (v:v) por eluição isocrática, com vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 20 µl, com o tempo de corrida de 8 minutos (Amadori et al. 2013).

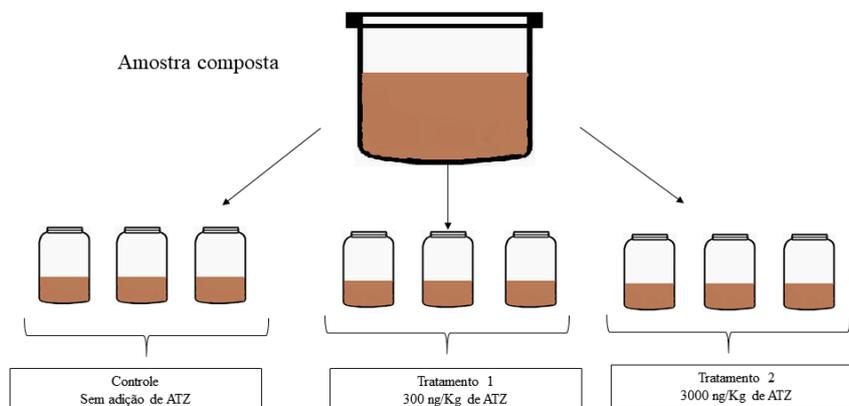
A amostra da 1ª coleta foi enviada para detecção mais apurada através da prestação de serviço no Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas (LARP) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), usando o método QuEChERS modificado e analisado por LC-MS/MS. As demais coletas não puderam ser analisadas por essa metodologia devido à alta quantidade de amostra necessária para a detecção da ATZ, 500 g (a mesma quantidade de solo do sistema de microcosmos).

#### 4.4 Montagem dos microcosmos

Os microcosmos foram montados em potes de vidros autoclavados com 500g de solo da amostra composta e cobertos com papel alumínio. Os microcosmos foram classificados em três categorias (tratamentos), cada um contendo suas respectivas réplicas, totalizando 9 microcosmos (Figura 14). Sendo eles: Controle (M1, M2 e M3); Tratamento 1 com 300 ng/Kg de ATZ (M4, M5, M6); Tratamento 2 com 3000 ng/Kg de ATZ (M7, M8, M9).

Para o preparo da solução de ATZ, 15 mg de ATZ PESTANAL® (Sigma-Aldrich) foi diluído em 1 L de água ultrapura, utilizando o banho de ultrassom à temperatura ambiente até completa dissolução para obtenção da solução estoque. Antes

da adição da ATZ nos microcosmos, uma alíquota de 10 g do solo dos microcosmos, foram retiradas para processamento das amostras e isolamento dos fungos, representando a 1º coleta. Após a 1º coleta 1 mL da solução estoque foi adicionado nos microcosmos (M4 até M9) de acordo com a concentração de ATZ.



**Figura 14.** Sistema de microcosmos com seus respectivos tratamentos. Fonte: autor, 2020.

Os microcosmos foram acondicionados em estufa com temperatura constante de 28 °C (Figura 15), a posição de cada microcosmo na estufa foi determinada por sorteio aleatório. A cada dois dias a umidade de cada microcosmo foi avaliada e mantida na faixa de 4 a 8 no medidor (*Tecnosolarled*), através da adição de água deionizada autoclavada.



**Figura 15.** Os microcosmos montados e armazenados em estufa.

Os microcosmos foram mantidos incubados e a cada sete dias, durante 30 dias, uma amostra foi retirada de cada sistema para realização do isolamento fúngico. Assim, ao total no projeto cinco coletas foram realizadas, sendo a 1º realizada antes da adição da ATZ: 1º coleta (19/02/2019), 2º coleta (26/02/2019), 3º coleta (05/03/2019), 4º coleta (12/03/2019) e 5º coleta (19/03/2019).

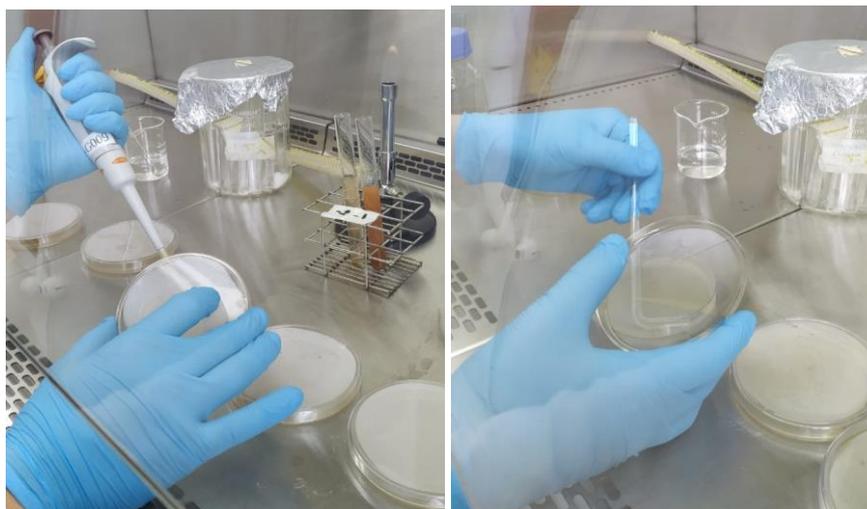
#### 4.5 Processamento das amostras e isolamento

Para a diluição seriada de cada microcosmo, 10 g de solo foram diluídos em 100 mL de solução salina (NaCl 0,9%), esse método foi selecionado após o projeto piloto, pois apresentou melhores resultados no isolamento fúngico. As amostras foram homogeneizadas por 10 minutos em agitador magnético; em seguida foi realizada a diluição seriada, transferindo inicialmente 1 mL da solução do solo para um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina (Figura 16), correspondendo a diluição  $10^{-1}$ , deste 1 mL foi transferida para um novo tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina e assim sucessivamente até a quarta diluição ( $10^{-4}$ ). Com o decorrer do experimento foi observado que nas diluições  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  não estavam ocorrendo o crescimento fúngico. Portanto, foram mantidas apenas as duas primeiras diluições (Pepper & Gerba, 2005).



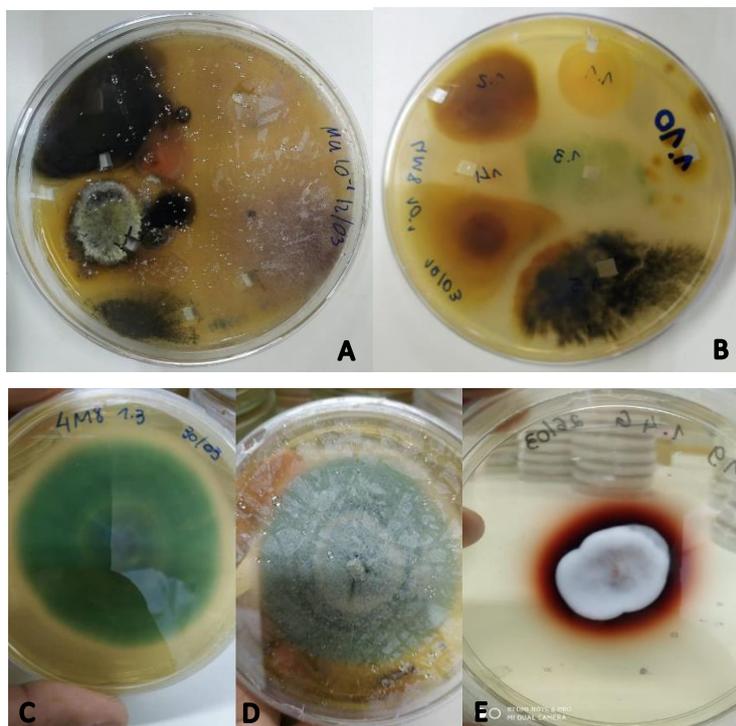
**Figura 16.** Processamento das amostras de solo dos microcosmos. A) Homogeneização em solução salina. B) Diluição seriada da amostra.

Para a semeadura, 100  $\mu$ l de cada diluição foram plaqueados com auxílio da alça de *Drigalski* em meio de cultura sólido composto por Extrato de Malte a 2%, com adição de antibióticos (12,5 mL/L de Gentamicina, concentração de 40 mg/mL), com e sem a adição de Guaiacol (concentração de 4 mM). Todo o plaqueamento foi realizado em triplicata para cada diluição (Figura 17).



**Figura 17.** Semeadura de 100  $\mu$ l de solução do solo em meio de cultivo sólido de MA2.

As placas foram incubadas em estufa à 28 °C por 30 dias. No decorrer da semana, os fungos que demonstraram crescimento satisfatório foram isolados em novas placas contendo o mesmo meio de cultivo para obtenção de culturas puras (Figura 18). O isolamento consistiu no repique de cada isolado separadamente até a confirmação que o isolado representava uma única morfoespécie.



**Figura 18.** Em A e B, placas originadas da diluição do solo. Em C, D e E, exemplos das morfoespécies isoladas. Em E é possível observar uma morfoespécie capaz de produzir enzimas ligninolíticas devido à reação com o indicador guaiacol.

Os fungos já purificados foram analisados morfológicamente para a determinação das morfoespécies, foto documentados e preservados pelo método de

*Castellani* (criotubos com água estéril, armazenados sob refrigeração de 4°C), e criopreservação (criotubos com glicerol 10% e mantidos a -80°C), adicionados à Coleção de Cultura de Microrganismos da UNILA.

#### 4.6 Caracterização molecular

O DNA genômico dos isolados foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Raeder e Broda (1985). A região ITS1 - 5.8S - ITS2 do DNA ribossômico foi amplificada com os *primers* universais para o reino Fungi, ITS-1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), os quais amplificam uma região de aproximadamente 600 pb (White et al. 1990). As reações foram preparadas em volume final de 25 µl, contendo DNA genômico (1,0 ng/µl), 2,5 mM de *buffer* da enzima, 0,125 mM de dNTPs, 1,25 µM do primer ITS- 1, 1,25 µM do primer ITS-4 e 2,5U/µl de Taq DNA polimerase. O termociclador foi programado para uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos; 30 segundos a 55°C; 1 minuto a 72°C e uma extensão final de 10 minutos a 72° C. O produto de PCR foi analisado em gel de Agarose (1% p/v) com GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (*Biotium*), com adição de marcador de peso molecular "1 Kb Plus DNA Ladder". As amostras foram enviadas para sequenciamento através do método de SANGER por prestação de serviços.

As sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas em bancos de dados, técnica denominada "*blast*", através dos sites *National Center for Biotechnology Information (Genbank-NCBI)* e do Centro de Análise de Sequências Biológicas (CBS). Logo, as sequências de organismos com mais de 97 % de similaridade com a sequência de interesse e, principalmente, descritas no nível de espécies foram consideradas, tentando cobrir toda a diversidade encontrada. As sequências dos mesmos gêneros foram comparadas entre si, para confirmar as morfoespécies iguais dentre os isolados, sendo utilizado *Saccharomyces cerevisiae* (acesso NR\_111007.1) como *outgroup*. Para o alinhamento das sequências utilizou-se o programa *on-line Clustal W*, e as análises filogenéticas e moleculares foram conduzidas pelo o software MEGA versão 7.0 (Kumar et al. 2016). O modelo de Kimura (1980) foi utilizado para estimar a distância evolutiva e o algoritmo *Maximum Likelihood (ML)* para as reconstruções filogenéticas, com o valor de *bootstrap* calculado a partir de 1.000 replicatas.

#### 4.7 Análises estatísticas

Visando entender o efeito dos tratamentos nas coletas e, portanto, no número de isolados nos resultados, os dados foram avaliados usando o teste de variância ANOVA (*one-way*), e a distribuição usando o diagrama de Venn. Para testar o efeito da ATZ na riqueza de morfoespécies de fungos isolados, antes da caracterização molecular, foi utilizado um Modelo Linear Generalizado Misto (GLMM) com distribuição de *Poisson* e pseudo- replicação temporal. O efeito fixo inclui o tempo experimental como fator categórico com 5 níveis, assim como sua interação com os tratamentos (controle, T1 e T2). A estrutura de efeitos aleatórios inclui tanto interceptão aleatória para as réplicas experimentais quanto uma interceptão diferente para cada reamostragem aninhada dentro das réplicas e diferentes tratamentos (Crawley, 2015). As análises dos dados foram realizadas no ambiente estatístico R (*R Development Core Team*).

Após a caracterização molecular e para entender a dinâmica da comunidade fúngica, os resultados foram reavaliados usando a Anova de medidas repetidas e PERMANOVA *Two-way* e *One-way* para confirmação do efeito da ATZ na riqueza de morfoespécies de fungos. Para avaliar a diversidade  $\alpha$  e  $\beta$  dos isolados fúngicos de solo nos três tratamentos, foram utilizados os seguintes índices: índice de diversidade de Simpson, pois considera o número de espécies e o total de números de indivíduos, e a proporção do total de ocorrência de cada espécie; índice de diversidade de Shannon, leva em consideração a riqueza e a equabilidade, é sensível às espécies raras e os indivíduos são amostrados aleatoriamente; e o índice de distância Jaccard, aponta a proporção de espécies compartilhadas entre as amostras em relação ao número total de espécies (Legendre & Legendre, 2012). As análises dos dados foram realizadas no ambiente estatístico *PAST*.

- 1) Índice de Simpson ( $D_1$ ):

$$D_1 = 1 - \sum_{i=1}^S p_i^2$$

em que  $p_i$  é a proporção das espécies  $i$ , e  $S$  é o número de espécies para que  $\sum_{i=1}^S p_i = 1$ .

- 2) Índice de Shannon (H):

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

onde  $\ln$  significa o logaritmo de base natural  $e$ .

- 3) Índice de Distância de Jaccard:

$$S_j = a / (a+b+c)$$

onde “a” é o número de espécies encontrados em ambos os locais (A e B); “b” é o número total de espécies no local B, mas não em A; e “c” é o número de espécies no local A, mas não em B.

#### 4.8 Análise funcional

Para determinar a diversidade funcional, os gêneros encontrados foram classificados em guildas, tipo de agrupamento em que um conjunto de espécies subsistem de um mesmo tipo de recurso, explorando-o de maneira similar, através site FUNGuild, uma ferramenta baseada em Python que pode ser usada para analisar classificações taxonômicas fúngicas por associações ecológicas, independentemente da plataforma de sequenciamento ou do pipeline de análise (Nguyen et al. 2016).

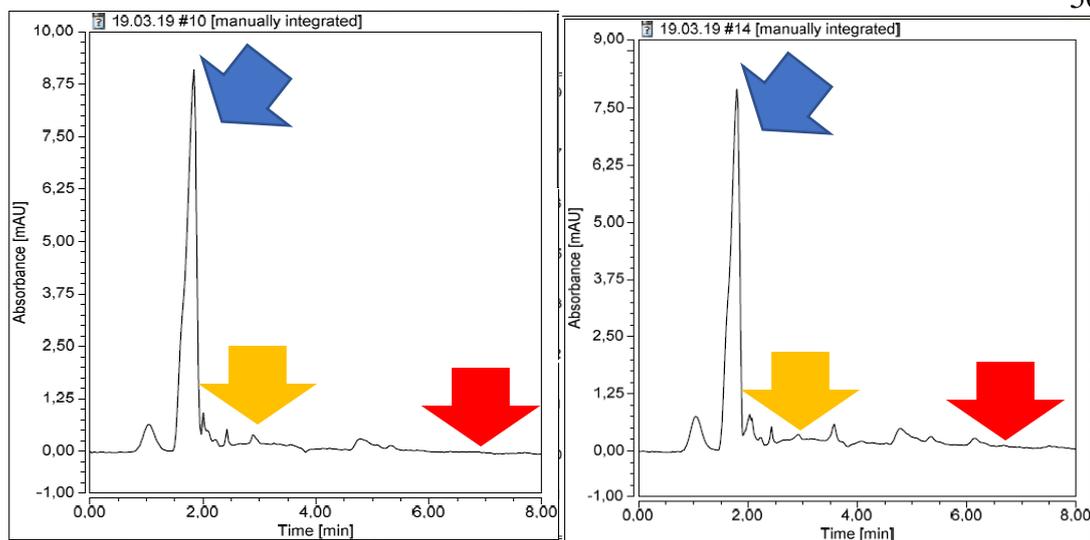
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Definição da metodologia de isolamento (projeto piloto)

A área de terraceamento apresentou maior quantidade e diversidade fúngica em relação a área de plantio direto, sendo então selecionada para o estudo. Não houve diferença na riqueza de fungos quando comparado a profundidade de solo de 0 a 10 cm com 10 a 20 cm, sendo determinada a profundidade de 0 a 20 cm para a coleta oficial. Para a semeadura, o método de diluição seriada com solução salina foi a que apresentou maior retorno quanto a quantidade e diversidade, quando comparada com a solução peptonada e a lavagem do solo com as peneiras granulométricas.

### 5.2 Análise cromatográfica e características químicas da amostra principal (usada na montagem dos microcosmos)

O método cromatográfico HPLC realizado no laboratório multiusuários Engenheira Enedina Alves Marques (Parque Tecnológico Itaipu), não apresentou boa seletividade para detectar a presença da ATZ e de seus metabólitos, possivelmente, devido a sensibilidade da técnica utilizada. Como pode ser observado na figura 19, há presença de pico cromatográfico interferente (matéria orgânica) no tempo de retenção de um a dois minutos, localizado antes dos picos de interesse. Não foi possível detectar o pico da ATZ que deveria ser encontrado no tempo de retenção de seis e sete minutos, e nem de seus metabólitos DIA de três a quatro minutos e o DEA na faixa de quatro a cinco minutos (Henn, et al., 2020). Contudo, quando se utilizou um volume maior de amostra (500 g) e uma metodologia diferenciada (prestação de serviço) foi detectado a concentração de  $0,02 \text{ mg ATZ Kg}^{-1}$  de solo na análise da amostra da 1ª coleta (antes da adição da ATZ nos microcosmos).



**Figura 19.** Resultado das análises cromatográficas. A) Microcosmo 4 (300 ng de ATZ Kg<sup>-1</sup>). B) Microcosmo 8 (3000 ng ATZ Kg<sup>-1</sup>). Em ambas as imagens é possível observar o pico cromatográfico interferente (seta azul) no tempo de retenção de um a dois minutos e ausência dos picos de ATZ (seta vermelha) e seus metabólitos (seta amarela).

As propriedades químicas do solo referente a primeira coleta podem ser observadas na tabela 4.

**Tabela 4.** Propriedades químicas do solo da primeira coleta.

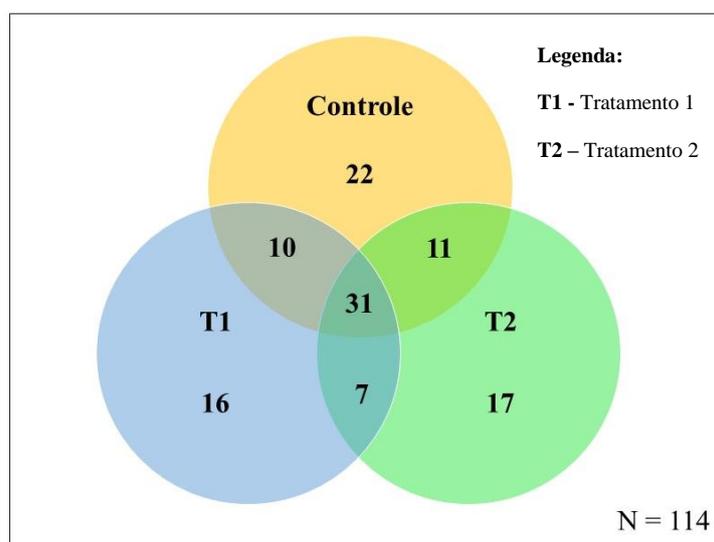
Parâmetro	Resultados
DBO	158,4 mg .kg <sup>-1</sup>
pH	8,02
Ca <sup>2+</sup>	1.736,1 mg Ca.kg <sup>-1</sup>
C orgânico total	1,70%
Fe	123.098 mg/kg <sup>-1</sup>
P	279,2 mg/kg <sup>-1</sup>
Mg <sup>2+</sup>	396,7 mg/kg <sup>-1</sup>
N	201,51 mg/kg <sup>-1</sup>
PO <sub>4</sub>	7,5 mg/kg <sup>-1</sup>

DBO – demanda bioquímica de oxigênio.

### 5.3 Isolamento fúngico e definição das morfoespécies

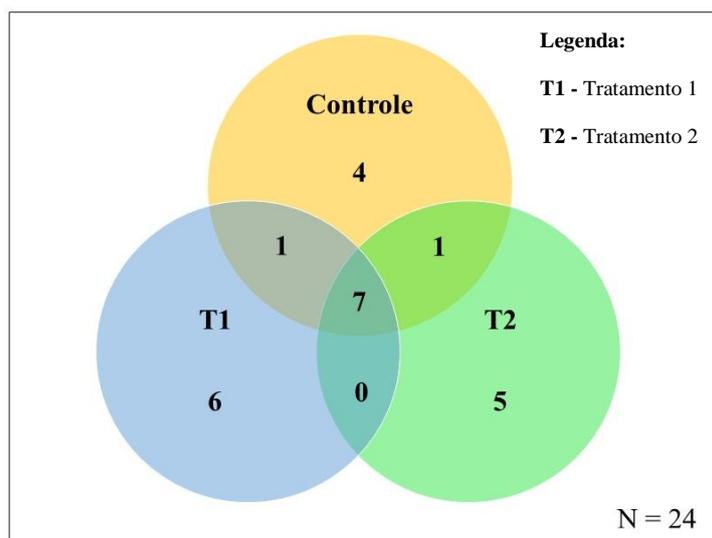
Para definição da morfoespécie, após cada coleta foram feitas comparações morfológicas entre os espécimes encontrados dentro dos microcosmos e a *posteriori*, entre os microcosmos. As morfoespécies então foram nomeadas com o código “R” mais o número crescente (R01, R02, ..., Rn), à medida que eram determinadas as novas morfoespécies. Os isolados que pertencem a mesma morfoespécie foram documentados para as análises estatísticas futuras e descartados, apenas um representante de cada morfoespécie foi preservado.

No total foram isolados 561 fungos, classificados em 114 morfoespécies, dos quais 52% ocorreram em mais de um tratamento, 38% das morfoespécies aparecem uma única vez e 27% das morfoespécies ocorreram em todos os tratamentos. O tratamento controle obteve maior número de morfoespécies exclusivas, quando comparados aos tratamentos 1 e 2 (Figura 20).



**Figura 20.** Diagrama de Venn com a distribuição geral das morfoespécies entre os tratamentos. Controle sem adição de ATZ, T1 300 ng/Kg de ATZ e T2 3000 ng/Kg de ATZ. Fonte: autor, 2020.

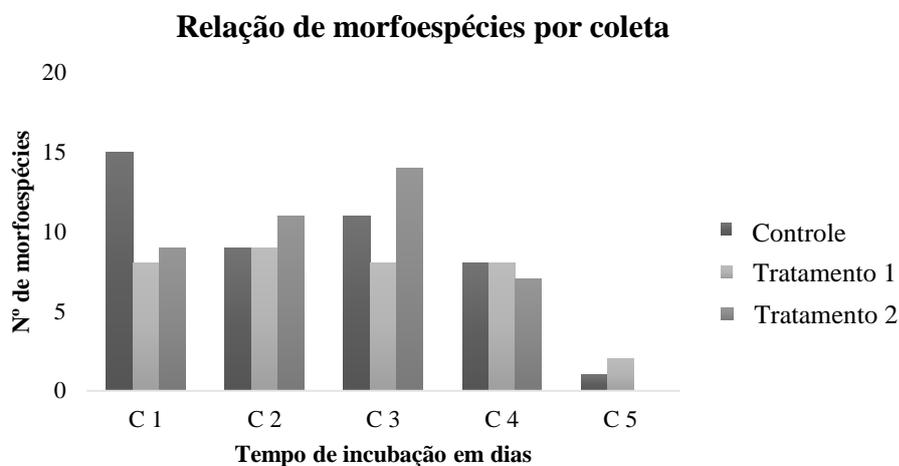
O reagente guaiacol foi adicionado ao meio de cultivo visando a seleção de fungos com atividade das enzimas ligninolíticas. O guaiacol quando sofre oxidação, especialmente por peroxidases, forma tetraguaiacoquinona, um composto de coloração escura (Doerge et al. 1997). Para a atividade ligninolítica, 24 morfoespécies foram positivas ao reagente guaiacol; destas, 21% ocorreram em todos os tratamentos, enquanto 63% foram exclusivas dos tratamentos 1 e 2 (Figura 21).



**Figura 21.** Diagramas de Venn mostrando a distribuição das morfoespécies ligninolíticas. Controle sem adição de ATZ, T1 300 ng/Kg de ATZ e T2 3000 ng/Kg de ATZ. Fonte: autor, 2020.

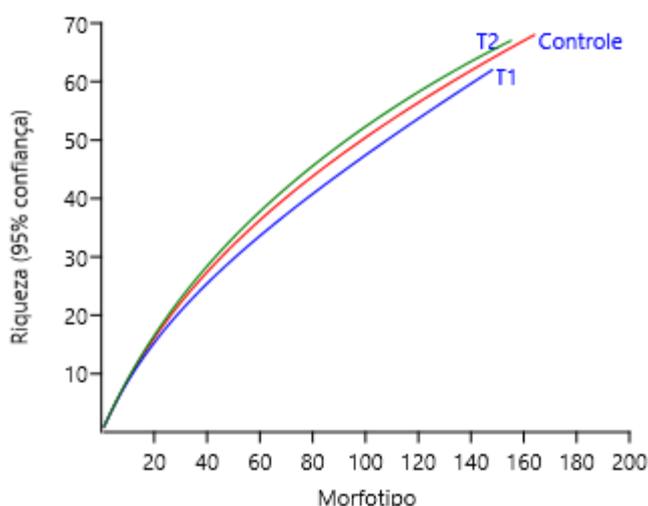
A fim de verificar se houve diferença estatística no número de isolados por coleta, foi realizado o teste ANOVA (*one-way*), resultando no  $p = 0,001724$ , confirmando essa diferença. Essa diferença também foi sustentada pelo teste de *Tukey*, de comparações par a par a *posteriori*, e mostrou variação estatística significativa principalmente na quinta coleta em relação às demais.

No geral, houve uma tendência de aumento de morfoespécies isoladas ao longo das coletas, com pico na primeira e na terceira coleta e, em seguida, uma diminuição gradual no número de isolados (Figura 22), tendo uma média aproximada de oito morfoespécies por tratamento.



**Figura 22.** Relação de número de morfoespécies por tratamento e coleta. CTL sem adição de ATZ, T1 300 ng/Kg de ATZ e T2 3000 ng/Kg de ATZ. (C1, C2, C3, C4 e C5 (0,7,14,21 e 28 dias, respectivamente)).

Com o intuito de verificar a suficiência amostral das coletas e para comparar a riqueza de morfoespécies entre os tratamentos ao longo do tempo, foi empregada a técnica da curva de rarefação (Figura 23). Como resultado, a curvatura não atingiu o platô, ou seja, as coletas realizadas não foram suficientes para obtenção de todas as espécies deste estudo. E, para estimar o número total de espécies deste experimento, foi utilizado o estimador de riqueza *Bootstrap* no *software* Past, pois ele utiliza como referência todas as espécies coletadas e não se restringe às espécies raras, tendo como resultado, a riqueza total estimada em 132,48 morfoespécies.



**Figura 23.** Curva de rarefação da riqueza geral entre os tratamentos.

Para verificar se houve diferença significativa na riqueza de morfoespécies (antes da identificação taxonômica das morfoespécies), do tratamento controle comparado com os tratamentos T1 e T2, foi realizado o teste estatístico Modelo Linear Generalizado Misto (GLMM). A mesma comparação foi realizada para as morfoespécies ligninolíticas (Tabela 5). É possível observar, que não houve diferenças significativas nas riquezas de morfoespécies entre os tratamentos, tanto no geral quanto para as morfoespécies ligninolíticas.

**Tabela 5.** GLMM referente a riqueza de morfoespécies entre os tratamentos.

Tratamentos	Geral		Ligninolíticos	
	Z	p	Z	p
CTL x T1	-1.259	0.208	-0.523	0.600
CTL x T2	-1.268	0.205	-0.523	0.600

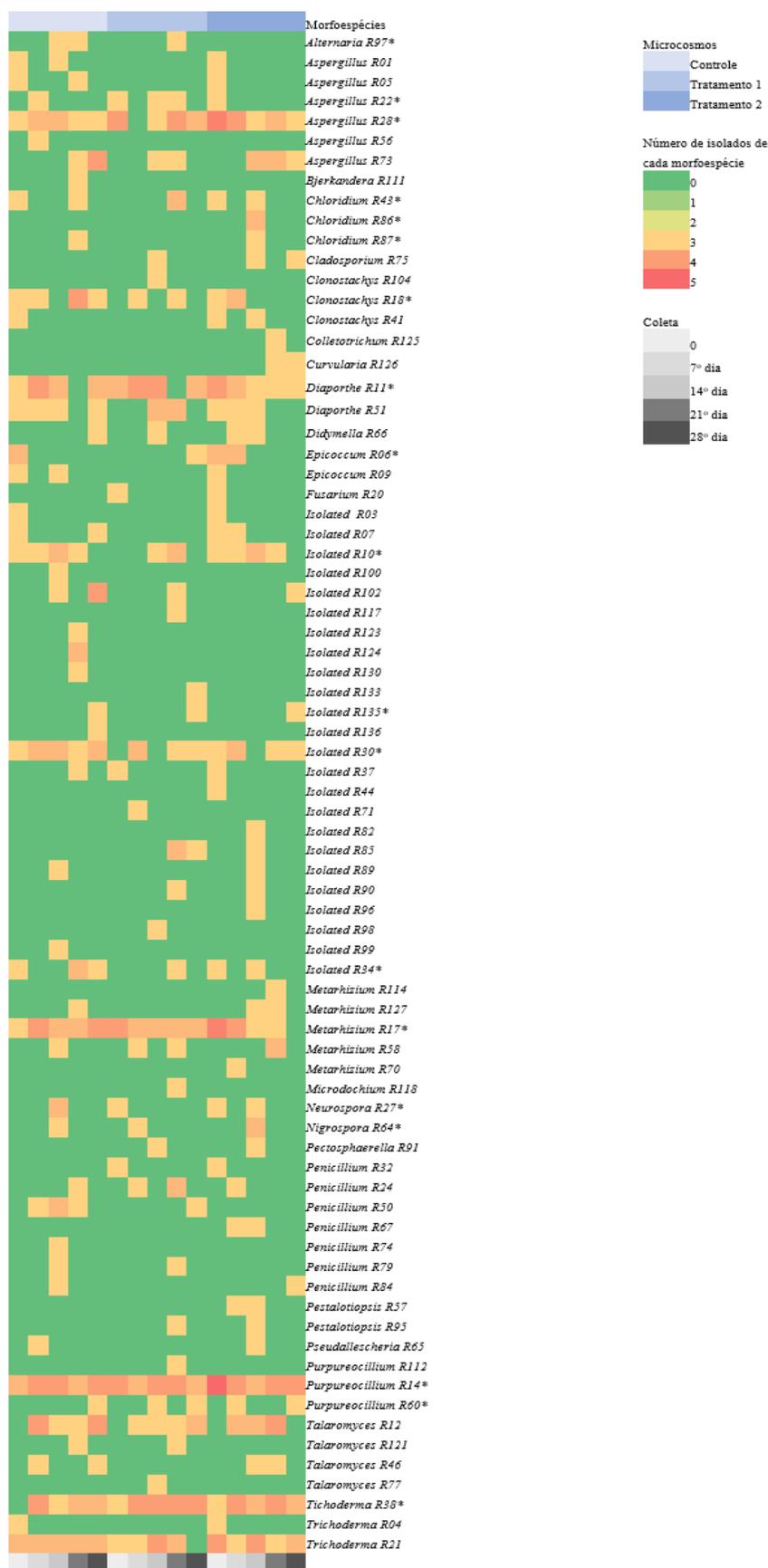
Z – GLMM; p: <0,05. CTL – tratamento controle; T1 – tratamento 1 e T2 – tratamento 2.

#### 5.4 Caracterização molecular

Para a caracterização molecular, a partir das 114 morfoespécies definidas anteriormente foi possível obter o produto de PCR de 109, não sendo possível reativar cinco morfoespécies preservadas. Das 109 morfoespécies (conforme tabela anexo 1), 38 morfoespécies foram reclassificados devido à similaridade maior que 98% no *Blast* e em comparação na análise filogenética (anexo 2), 52 fungos foram classificadas ao nível de gênero, e para 24 morfoespécies não foi possível realizar a identificação final (R03, R10, R30, R34, R37, R44, R71, R82, R85, R89, R90, R96, R98, R99, R100, R102, R117, R119 R123, R124, R130, R133, R135, R136), totalizando 76 fungos para avaliação da diversidade (Figura 24). Essa variação (ausência de identificação de algumas morfoespécies) se deve a dificuldades de extração do DNA por características da parede celular, por exemplo, metabólitos secundários que podem interferir na amplificação e falta de especificidade da enzima *Taq polimerase* que inviabiliza o sequenciamento.

Foram identificados 51 morfoespécies pertencentes ao filo Ascomycota representados por 21 gêneros: *Alternaria* sp.; *Aspergillus* sp.; *Chloridium* sp.; *Cladosporium* sp.; *Clonostachys* sp.; *Colletotrichum* sp.; *Curvularia* sp.; *Diaporthe* sp.; *Didymella* sp.; *Epicoccum* sp.; *Fusarium* sp.; *Metarhizium* sp.; *Microdochium* sp.; *Neurospora* sp.; *Nigrospora* sp.; *Plectosphaerella* sp.; *Penicillium* sp.; *Pestalotiopsis* sp.; *Pseudallescheria* sp.; *Purpureocillium* sp.; *Trichoderma* sp. E um único representante do filo Basidiomycota, retratado pelo gênero *Bjerkandera* sp. R111 foi isolado. Os gêneros com maior diversidade de espécies foram *Penicillium* spp., com 11 espécies diferentes; *Aspergillus* spp. com seis; e *Metarhizium* spp. com cinco diferentes espécies. A confirmação das espécies será realizada futuramente no grupo de pesquisa.

Para a atividade ligninolítica, conforme relatado no item 8.3 das 24 morfoespécies positivas ao reagente guaiacol (Figura 24), foi possível a caracterização de 19, sendo 15 representados pelos gêneros: *Alternaria* sp.; *Aspergillus* sp.; *Chloridium* sp.; *Clonostachys* sp.; *Diaporthe* sp.; *Epicoccum* sp.; *Metarhizium* sp.; *Neurospora* sp.; *Nigrospora* sp.; *Purpureocillium* sp.; *Trichoderma* sp.



**Figura 24.** Ocorrência e abundância de morfoespécies das comunidades de fungos nos sistemas de microcosmo (Controle, Tratamento 1 e Tratamento 2). \* Fungos positivos para a reação guaiacol (atividade ligninolítica), mas não foi em todas as coletas.

### 5.5 Análise da Diversidade

A tabela 6 descreve os índices de diversidade  $\alpha$  para cada tratamento. O Teste de diversidade  $\alpha$  para o índice de Simpson, por não dar peso as espécies raras, mostra que o tratamento 2 apresenta uma diversidade um pouco maior em relação aos outros tratamento; já para o índice de Shannon, que é sensível a espécies raras, o tratamento 1 tem uma variação na diversidade, comparado aos outros tratamentos. Mas, levando em consideração tanto o índice de Simpson, quanto o índice de Shannon, a diversidade entre os tratamentos teve baixa variação. Levando em consideração a riqueza e abundância observada nos tratamentos, o índice Chao-1 faz a estimativa da riqueza que poderia ser encontrada entre os tratamentos. Para fungos ligninolíticos, o tratamento 1 apresentou o menor índice para Simpson, sem grande variação. No entanto, diferente da comunidade geral, para Shannon, esse tratamento apresentou o menor índice de fungos ligninolíticos.

**Tabela 6.** Índices de diversidade  $\alpha$  para cada sistema de microcosmo da comunidade geral e para os fungos ligninolíticos.

Índices	Microcosmos		
	Controle	Tratamento 1	Tratamento 2
Taxa S	51	43	47
Simpson_1-D	0.9399	0.9251	0.9433
Shannon_H	3.25	3.47	3.27
Chao-1	90	103	63.15
Fungos ligninolíticos			
Taxa S	18	17	17
Simpson_1-D	0,8809	0,864	0,8802
Shannon_H	2,381	2,263	2,373
Chao-1	20,5	22	18,2

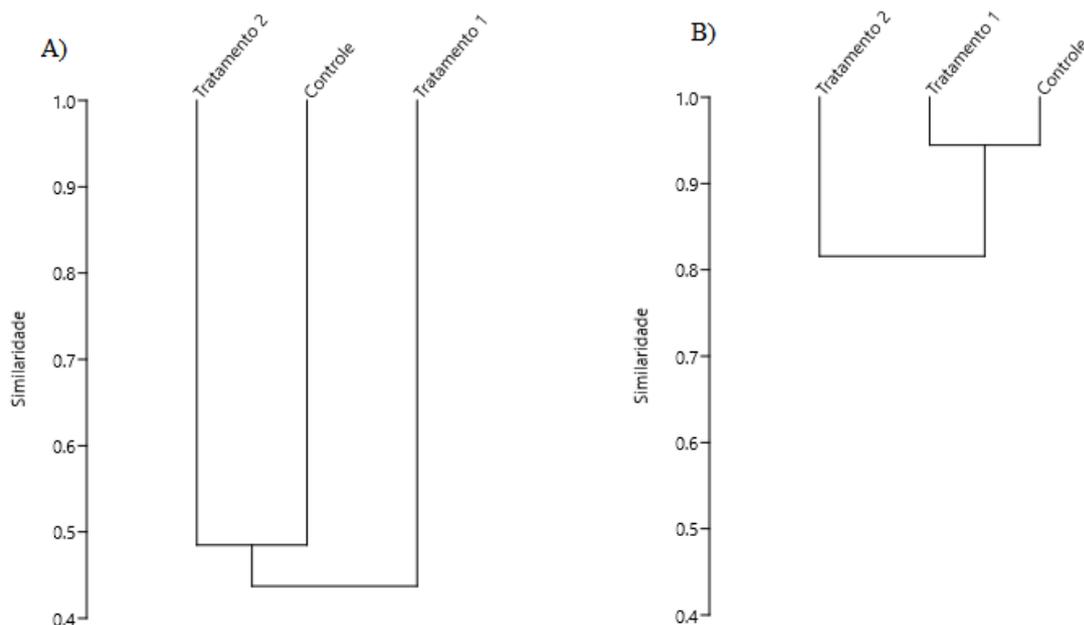
**P-valor: <0.05**

**Taxa S** - riqueza de espécies por tratamento; Fonte: autor, 2020.

A diversidade  $\beta$  foi realizada pelo índice de *Jaccard*, pois avalia a proporção de espécies compartilhadas entre duas amostras em relação ao total de espécies entre os tratamentos, tendo resultado representada pelo dendograma (Figura 25A). A análise de agrupamento das amostras identificou a similaridade de 50% entre o tratamento controle e tratamento 2, enquanto o tratamento 1 apresentou uma similaridade de 43%,

quando comparando entre os outros tratamentos, portanto, o tratamento 1 compartilha menos espécies com os outros tratamentos.

Para fungos ligninolíticos, utilizando o índice Jaccard (Figura 25B), a análise de agrupamentos identificou 94% de similaridade entre o controle e o tratamento 1 e 84% entre o controle e o tratamento 2. O tratamento 1, com uma similaridade de 78% com o tratamento 2, foi mais diferenciado.



**Figura 25.** Dendrograma de sistemas de microcosmos de acordo com o índice de similaridade de Jaccard para comunidades de fungos (diversidade  $\beta$ ). A) Todas as morfoespécies; B) Morfoespécies ligninolíticas.

O teste Anova de medidas repetidas foi realizado para avaliar a dinâmica da comunidade de fungos após a adição da ATZ, conforme a tabela 7, é possível observar que não houve diferença estatística quando comparado o tratamento controle com os demais tratamentos. Porém, há uma alteração significativa na riqueza dos tratamentos em relação as coletas.

**Tabela 7.** Análise da variação da riqueza entre tratamentos e coletas dos microcosmos ( $\alpha < 0,05$ ).

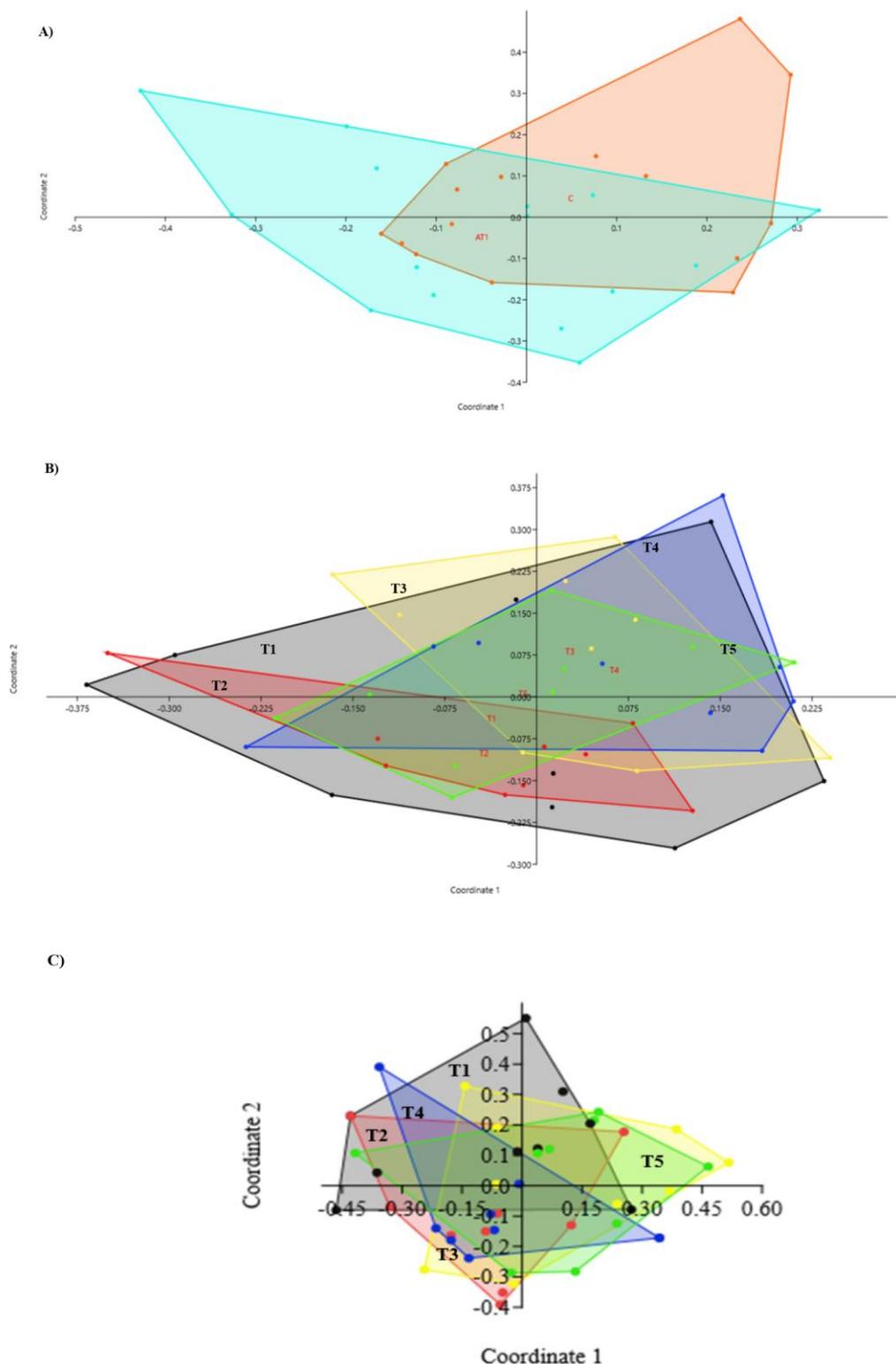
<b>Fonte de variação</b>	<b>p-valor</b>
<b>Controle versus tratamento 1 e 2</b>	
Amostra	0,267119
Coletas	<b>0,000183</b>
Interações	<b>0,027303</b>
<b>Controle versus tratamento 1</b>	
Amostra	0,236163
Coletas	<b>0,03446</b>
Interações	0,278951
<b>Controle versus tratamento 2</b>	
Amostra	0,152436
Coletas	<b>0,000411</b>
Interações	0,283733

Em relação a composição dos fungos foi realizado o teste PERMANOVA *Two-way (software Past)*, na avaliação geral (todos os tratamentos versus o controle), não houve diferença estatística. Avaliando individualmente, houve diferença estatística apenas no tratamento 1,  $p = 0,0498$ , (Tabela 8, Figura 26A). Também é possível observar, que a composição fúngica alterou significativamente em relação as coletas ao longo do tempo. Para entender melhor os dados obtidos os resultados foram plotados numa análise de coordenadas principais (PCoA), através de uma PERMANOVA *One-way*, sendo observado a maior diferença significativa ( $p = 0,0018$ ), entre a coleta T2 com a T3 (Tabela 8 e Figura 26B). A composição completa dos sistemas de microcosmos pode ser analisada na figura 24.

Para fungos ligninolíticos (Figura 26C), ambas as análises (riqueza e composição) resultaram na única variação significativa relacionada ao tempo de coleta. De acordo com o PERMANOVA unidirecional, todos os tempos foram significativos (exceto T1 com T3), com destaque para a quarta e quinta coleta (valor de  $p = 0,0004$  e  $0,0013$ , respectivamente), como mostra a figura 26C.

**Tabela 8.** Análise da variação da composição (PERMANOVA One-way) entre os tratamentos e as coletas dos microcosmos ( $\alpha < 0,05$ ).

<b>Fonte de variação</b>	<b>p-valor</b>
<b>Controle <i>versus</i> tratamento 1 e 2</b>	
Tratamento	0,2262
Tempo	<b>0,0001</b>
Interação	<b>0,0259</b>
<b>Controle <i>versus</i> tratamento 1</b>	
Tratamento	<b>0,0498</b>
Tempo	<b>0,0002</b>
Interação	0,1635
<b>Controle <i>versus</i> tratamento 2</b>	
Tratamento	0,3979
Tempo	<b>0,0041</b>
Interação	0,0647
<b>Tratamento 1 <i>versus</i> tratamento 2</b>	
Tratamento	0,6186
Tempo	<b>0,0008</b>
Interação	<b>0,0416</b>

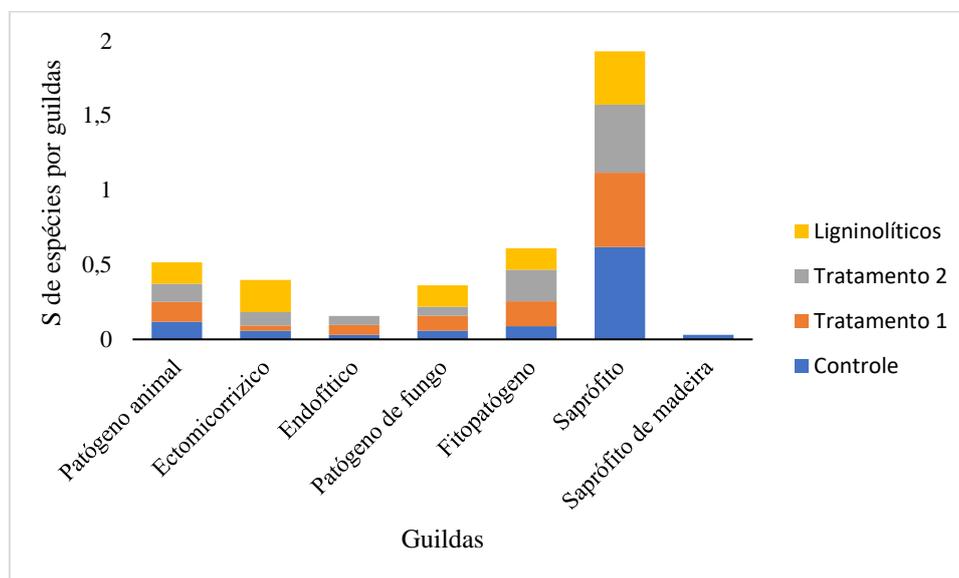


**Figura 26.** **A)** Análise de coordenadas principais (PCoA) da composição dos fungos obtidos no tratamento controle (sem adição de ATZ - laranja) e o tratamento 1 (300 ng de ATZ – azul). **B)** Análise de coordenadas principais (PCoA) da composição dos fungos obtidos dos microcosmos ao longo do tempo. **C)** Análise de coordenadas principais (PCoA) da composição de fungos ligninolíticos obtidos a partir de microcosmos ao longo do tempo. Sendo T1 (cor preta) amostra original do solo no campo agrícola usado para montagem dos microcosmos, T2 (cor vermelha) após sete dias de incubação, T3 (cor amarela) após 14 dias, T4 (cor azul) após 21 dias e T5 (cor verde) após 28 de incubação. Fonte: autor, 2020.

## 5.6 Análise funcional

Dos 52 gêneros encontrados, como pode ser observado na figura 27, a maior abundância funcional foi para os fungos saprófitos representando 61% da comunidade, seguida dos fungos patógenos de planta com 32%. De acordo com o gênero, alguns fungos foram classificados em mais de uma guilda, como no caso de *Cladosporium* sp. (patógeno de animal e planta, endofítico, parasita de líquen e saprófito de madeira); *Alternaria* sp. (patógeno de animal e planta, endofítico e saprófito de madeira); *Didymella* sp. e *Epicoccum* sp. (patógeno de animal e planta, e saprófito); *Chloridium* sp. (ectomicorrízico, endofítico, patógeno de planta e saprófito de madeira); *Diaporthe* sp., *Colletotrichum* sp. e *Microdochium* sp. (endofítico e patógeno de planta).

Os outros gêneros permaneceram exclusivos para determinadas guildas, como saprófitos (*Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Metarhizium* sp., *Neurospora* sp., *Nigrospora* sp., *Penicillium* sp., *Pseudallescheria* sp. e *Trichoderma* sp.); parasita de fungos (*Purpureopenicillium* sp.); parasita de plantas (*Clonostachys* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Plectosphaerella* sp. e *Curvilaria* sp.); e saprófito de madeira (*Bjerkandera* sp.).



**Figura 27.** Relação da diversidade funcional de acordo com a abundância relativa (número de gêneros por guilda em relação ao número total de fungos no sistema de microcosmos ou na comunidade ligninolítica) pelo FUNGuild. S – riqueza. Fonte: autor, 2020.

## 6 DISCUSSÃO

A importância do uso da biodiversidade de microrganismos do solo para uma melhora na qualidade do solo e para entender a produtividade dos ecossistemas agrícolas, foi destacada nos últimos anos (Saccá et al. 2017). Nesse processo, a avaliação da biodiversidade de fungos como indicadores de qualidade do solo não pode se limitar apenas à determinação dos índices de biodiversidade, mas também deve incluir uma análise estrutural da população de fungos para determinar as funções que desempenham e impactam na qualidade do solo e na saúde das plantas (Frac et al. 2018). Assim, nosso estudo, baseado em sistemas de microcosmos com a adição de pequenos volumes de ATZ (mais próximo das concentrações reais que podem ser acessadas pela microbiota), procurou mostrar o comportamento dos fungos e a ação das forças que produzem ou modificam seus movimentos, isto é, a dinâmica da comunidade, trabalhando com a comunidade em geral de fungos e separadamente e com a comunidade de fungos ligninolíticos.

O solo do sistema estudado é caracterizado como um latossolo vermelho distrófico típico (Exterkoetter et al. 2019), essa classificação de solo tem como características um grau elevado de intemperização dos materiais primários e secundários, tem concentrações relativa de argilominerais resistentes e/ou óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio, que proporciona a coloração avermelhada (IAPAR, 2015). O trabalho de Exterkoetter e colaboradores (2019) realizou um estudo do potencial do terraceamento na redução do escoamento superficial do glifosato e AMPA na mesma região do nosso estudo. Diferente do relatado por Exterkoetter et al. (2019) nossas amostras de solo mostraram um pH alcalino. O pH representa uma importante variável, pois modula as interações no solo, à medida que aumenta o valor do pH, também aumenta as cargas negativas das moléculas, diminuindo a adsorção da matéria orgânica (Amarante et al. 2002), O pH considerado adequado para os cultivos de soja e milho é de 5,6 (SBCS/NEPAR, 2017), mas pode variar ao longo do processo e no momento prévio à plantação. O pH mais alto na área agrícola é devido ao processo de calagem (ação de adubar a terra com cal) realizado antes do plantio da soja para correção do pH, e nossa coleta foi realizada no início da cultura, o que pode justificar esse valor mais elevado que o obtido por Exterkoetter et al. (2019). Em adição, plantas cultivadas podem causar alterações significativas na rizosfera, como no caso da soja, que pode alterar em até 25% o pH do solo (Souza et al. 2010).

A estrutura das comunidades microbianas do solo é fortemente influenciada pelo pH e muitos estudos mostram que este pode ser o principal fator de diversidade e função microbiana no solo (Wakelin et al. 2008; Val-Moraes et al. 2016; Valadares-Pereira et al. 2017). Neste sentido, é muito importante destacar que nossos resultados, discutidos a seguir, possuem relação direta com o pH alcalino encontrado nas nossas amostras. Cabe descartar, assim, a importância de novos estudos, em diferentes épocas da cultura, visando um perfil completo da diversidade do solo estudado.

Além do pH, nossas amostras também indicaram concentrações elevadas de P (279,2 mg/kg), quando comparado a mesma análise realizada por Exterkoetter e colaboradores (2019) em 2017. O P, quando em baixas concentrações, pode influenciar na variação do pH e, conseqüentemente, influenciará na sorção do herbicida no solo, pois o fosfato orgânico compete pelos mesmos sítios de adsorção do solo que as moléculas do herbicida (Borggaard & Gimsing, 2008). Possivelmente nossa amostra, devido a época da coleta, passou por um processo de adição de fertilizantes fosfatados ao solo, uma prática comum da cultura de milho. Também não podemos descartar, que a própria microbiota do solo pode aumentar a disponibilidade de P (Malusa et al. 2016), variando assim a concentração do mineral de acordo com a época do cultivo, tendo relação direta com a matéria orgânica, que contribui com cerca de 30 a 50% do P solúvel total na maioria dos solos (Richardson et al. 2009).

A textura argilosa do solo do local do estudo proporciona maior área superficial de contato e sítios de ligação para as moléculas do herbicida se ligarem à matriz solo (Moraes & Rossi, 2010), esse fato possivelmente resultou na dificuldade analítica da quantificação da ATZ, necessitando de volumes altos de solo para a cromatografia. Em adição, elevados teores de ferro (12.31 g/kg) foram observados na análise do solo, segundo Gerritse e colegas (1996), concentrações de ferro maiores que 10 g kg<sup>-1</sup> imobilizam herbicidas, pois são adsorvidos pelos óxidos desses metais.

As concentrações de cálcio (1.736,1 mg Ca.kg) e magnésio (396,7 mg/kg), são outros fatores que podem influenciar no pH do solo e conseqüentemente a composição fúngica (Chen et al. 2018).

A análise da amostra do solo da região da Bacia do Paraná 3, na cidade de Toledo/PR indicou a presença de ATZ (0,02 mg ATZ Kg de solo) em um valor considerado dentro da margem de segurança, que garante a produção normal de culturas

(Aggelopoulos et al. 2018), porém reflete o histórico de uso do ATZ no solo estudado. No experimento de Dou e colaboradores (2019), realizado em solo agrícola na China, a concentração relatada foi de 134 ng ATZ Kg de solo, sendo mais alarmante no solo agrícola da província de Liaoning, onde a ATZ já havia sido proibida a um ano antes das análises (0,362 mg ATZ Kg de solo).

Os solos são habitados por muitos microrganismos de grupos filogenéticos pouco estudados especialmente devido ao baixo sucesso de isolamento de representantes raros. Parte do motivo da falha no cultivo é a baixa frequência com que as células do solo formam colônias visíveis quando inoculadas em meios microbiológicos padrão, resultam em baixas contagens viáveis (Davis et al. 2005). Além do meio de cultivo e tamanho do inóculo, o tempo de incubação amostral é um fator que pode determinar o sucesso do isolamento. Neste sentido, esperava-se que o sistema de microcosmo favorecesse o desenvolvimento de colônias cultiváveis de membros de grupos raramente isolados. Em adição, nosso trabalho procurou isolar fungos com potencial ligninolítico exclusivamente com o reagente Guaiacol, uma estratégia recentemente denominada “culturômica”. Este procedimento visa usar diferentes estratégias de isolamento, reduzindo os problemas recorrentes do isolamento padrão, que impedem principalmente a recuperação de microrganismos que ocorrem em números baixos e podem fornecer serviços críticos ao ecossistema (Kameshwar et al. 2019).

Contudo, apesar de muito próxima do platô, a curva de rarefação (Figura 23) indica que possivelmente, o tempo de incubação (28 dias) e a técnica dependente de cultivo (seleção de fungos de crescimento acelerado e esporulados), não permitiram obter morfoespécies que se encontravam em baixa abundância, não resultando assim na riqueza máxima. Entretanto, para prolongar os sistemas seria necessário um controle rígido dos microcosmos, bem como a introdução de nutrientes. O trabalho de Elgueta e colaboradores (2017), em que o experimento teve duração de 40 dias, obteve uma comunidade ricamente diversificada de fungos no solo agrícola, demonstrando que o tempo de amostragem foi o fator crucial que moldou a comunidade fúngica, e não a aplicação de ATZ. Apesar de não ter sido obtida a riqueza máxima, o experimento está bem próximo da riqueza esperada pelo estimador *Bootstrap*, em comparação com Oladele & Ayodele (2017) e Meaky and Okechukwu (2018), que relataram uma baixa contagem populacional nos tratamentos com ATZ e Jansa et al. (2003) que obtiveram riqueza de apenas 42 espécies. Essa variação se deve especialmente ao método de estudo, um dos

fatores determinantes para os dados de diversidade microbiana, como diluição, meio de cultura, atmosfera, pH e outros fatores. Em adição, o tipo de solo e o histórico de qualidade do solo são condições chaves para o isolamento.

Os índices de riqueza foram avaliados antes da identificação molecular, usando o modelo GLMM, e após a caracterização taxonômica, usando Anova de medidas repetidas, e ambos os testes não houve variação entre os sistemas de microcosmos. O padrão de distribuição das morfoespécies (Figura 24) mostrou que poucas morfoespécies apareciam com alta frequência (dominante). Além disso, um número considerável de espécies raras teve poucos isolados (singletons); esse padrão é consistente com os observados para fungos no solo em países tropicais (Bettucci & Roquebert, 1995). A maioria das morfoespécies são compartilhadas entre os sistemas de microcosmos. Isso pode ter resultado em uma falta de significância na riqueza entre os sistemas, mesmo o microcosmo controle mostrando o maior número de morfoespécies únicas. Esse resultado é possível porque os fungos são habitantes de solo de muito sucesso, devido à sua alta plasticidade e à sua capacidade de adotar várias formas em resposta a condições adversas ou desfavoráveis (Sun et al. 2005).

Quando avaliado individualmente (controle versus tratamentos) a análise da composição indicou alteração significativa no tratamento 1. A esse tratamento foi adicionado 300 ng de ATZ / kg de solo, concentração menor que o tratamento 2 (3000 ng de ATZ / kg), que não apresentou diferença estatística. Uma forma de explicar isso poderia ser pela Lei do mínimo de Liebig, no qual o fungo precisa de uma quantidade mínima de ATZ para seu desenvolvimento, ou até mesmo, a interação de fator, onde os fungos poderiam substituir uma substância deficiente no ambiente por outra quimicamente relacionada (Odum & Barret, 2011).

A composição fúngica alterou significativamente em relação as coletas, e esse dado é importante indicando um processo de sucessão biológica do sistema. Para entender melhor os dados obtidos, os resultados foram plotados numa análise de coordenadas principais (PCoA), figura 26A, e através de uma PERMANOVA *One-way*, na figura 26B é possível verificar apenas uma pequena sobreposição entre as coletas T2 e T3.

A diferença significativa observada entre a coleta T2 com a T3, no período entre sete a 14 dias de incubação do sistema, revelam que a significância

estatística das coletas não está apenas relacionada com a escassez de nutrientes com o passar do tempo, mas uma alteração significativa da composição após a adição da ATZ. Esse período, entre sete a 14 dias, fisiologicamente pode indicar o tempo de resposta para o desenvolvimento dos fungos que estavam presentes em abundância muito baixa na amostra original e foram induzidos ao crescimento após a adição do defensivo agrícola, permitindo assim a sua recuperação pelo método de isolamento. Esse processo também pode ter sido desencadeado devido aos grupos de fungos mais tolerantes, aumentarem o acúmulo de C, por meio da produção de resíduos (Treseder & Lennon, 2015), acarretando o aumento da matéria orgânica, bem como a quebra de moléculas complexas, como no caso da ATZ, e disponibilizando seus derivados, como o DIA e o DEA, para serem utilizados por outros fungos. Ainda, como pode ser observado na figura 26, a maior abundância de morfoespécies entre as réplicas dos sistemas de microcosmos está entre as coletas T2, T3 e T4, o que possivelmente colaborou com a variação na composição nesses estágios do cultivo.

Esses dados da composição são altamente promissores, uma vez que muitos trabalhos indicam ausência de variação na riqueza de fungos, mesmo após adição de altas concentrações de ATZ, mas poucos trabalhos relataram o perfil de sucessão biológica da comunidade fúngica em solos contaminados com ATZ. Embora haja grandes progressos em direção ao conhecimento entre a degradação bacteriana e a ATZ, muitas perguntas permanecem sem resposta sobre esse herbicida e a comunidade de fungos *in situ*.

Para a comunidade ligninolítica o número de morfoespécies recuperadas foi baixo (25%). A ausência de literatura relacionada impede a confirmação se esse perfil é resultado da metodologia ou consequência das características do solo. Isso se refere especialmente a fungos ligninolíticos que são basidiomicetos, conhecidos como os principais produtores de enzimas ligninolíticas (Kameshwar et al. 2019), uma vez que apenas uma morfoespécie foi isolada em nosso trabalho.

Para os fungos ligninolíticos, o índice de Shannon (tabela 5) foi menor no tratamento 1. Esse índice é sensível a espécies raras. Com isso, podemos indicar que a introdução do menor valor de ATZ diminuiu o índice, aumentando para o tratamento 2. Por outro lado, para a comunidade em geral, esse tratamento apresentou o maior índice. Assim, o tratamento 1 tem um efeito diferente no grupo geral comparado aos fungos ligninolíticos. Na diversidade  $\beta$ , esse perfil também é destacado, mostrando uma

diferença, embora pequena, para o tratamento 2 (Figura 25B). A análise de composição poderia confirmar esse perfil, porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre o controle de microcosmos e o tratamento 2 (valor de  $p = 0,0864$ ), possivelmente porque o número de indivíduos ligninolíticos obtidos foi muito baixo para apoiar a análise. Nosso objetivo não foi avaliar a degradação do ATZ por esses fungos ligninolíticos, e muitos estudos já demonstraram a melhoria da biodegradação de xenobióticos por microrganismos indígenas de solo, especialmente basidiomicetos (Ijoma & Tekere, 2017), por isso pretendíamos mostrar aqui o impacto desse grupo. Com base em nossos resultados e na literatura, podemos indicar que a hipótese desse grupo está relacionada à degradação do ATZ também no ambiente natural, pode ser aceita. No entanto, mais pesquisas precisam ser realizadas, especialmente usando outras metodologias, como metabarconding, metagenômica e técnicas funcionais (como metatranscriptômica ou metabolômica) para confirmar o efeito do ATZ no perfil ligninolítico.

Exceto pelo basidiomiceto *Bjerkandera* sp. R111, todas as morfoespécies isoladas pertencem ao filo Ascomycota (anexo 1, Figura 24). Vários estudos anteriores identificaram a abundância e distribuição global de ascomicetes em sistemas de solo em todo o mundo (Tedersoo et al. 2014). Além disso, os táxons de ascomicetos podem dominar as comunidades de fungos do solo devido a estarem melhor equipados para suportar o estresse ambiental e podem usar um número maior de recursos. Isso leva a estratégias mais generalizadas que podem contribuir para o aumento do controle do solo (Egidi et al. 2019). Além disso, sua predominância pode ser melhorada pela alta concentração de nitrogênio no solo (201,51 mg/kg). O aumento da disponibilidade de N no solo, pode influenciar diretamente as comunidades fúngicas, por diminuir o estresse da limitação do recurso ou através da alteração dos padrões de competição entre os táxons com diferentes habilidades de aquisição de nutrientes (Cline et al. 2017; Chen et al. 2018).

A diversidade funcional revelou, em sua maioria, que os fungos identificados são considerados saprófitos, encontrados em todas as principais linhagens de fungos, degradam a matéria orgânica morta, incluindo os componentes mais abundantes, como a madeira, a serapilheira e a matéria orgânica do solo. Esses fungos reciclam grandes conjuntos de carbono e outros nutrientes, pois possuem diversas enzimas que os tornam capazes de degradar todos os componentes estruturais de plantas

mortas, incluindo a lignocelulose. Porém, alguns saprotróficos de plantas podem ser atribuídos a grupos taxonômicos específicos, principalmente fungos em decomposição de madeira. Eles possuem representantes de Basidiomycota, como também de Ascomycota, onde os fungos de podridão branca (Basidiomycota) são representados principalmente pelos Agaricomycetes, que são comuns, enquanto fungos de podridão marrom e suave são encontrados apenas em alguns grupos (Baldrian et al. 2011; López-Mondéjar et al. 2016).

Essa alta atividade saprofítica também pode estar relacionada a alta concentração P da nossa amostra. O estudo de Ceci et al. (2018) mostrou que muitos fungos saprotróficos tem a capacidade de mobilizar P a partir de formas insolúveis de acordo com uma variedade de mecanismos, especialmente as estirpes de *Rhizopus stolonifer var. stolonifer*, *Aspergillus niger* e *Alternaria alternata* mostraram o melhor desempenho em termos de quantidades de solubilização.

Alguns gêneros são característicos fitopatogênicos, como o gênero *Diaporthe* sp., um dos grandes responsáveis pela diminuição da produtividade da soja, responsáveis pelas doenças denominadas podridão de sementes e queima da haste e da vagem (Ploffer, 1989). Essa recuperação no presente estudo (que não teve como meio seletivo fungos fitopatogênicos) pode indicar uma condição sanitária do solo não ideal que deve ser investigada. Por outro lado, muitas morfoespécies do gênero *Metarhizium* sp. foram recuperadas, gênero entomopatogênico, conhecido por seu potencial de controle biológico, com bons resultados de controle da cigarrinha-das-raízes *Mahanarva fimbriolata* (Simonato et al. 2013; Brunner-Mendoza et al. 2018), e podem estar presentes naturalmente no solo ou através de biofertilizantes de uso bem estabelecido.

Os gêneros de maior destaque nesse experimento são os *Purpureocillium* sp., *Aspergillus* sp. e *Trichoderma* sp., que apareceram completamente em todas as coletas (Figura 24). O *Purpureocillium* sp. é um fungo comum do solo, conhecido por suas propriedades nematófagas e parasita de outros fungos. Devido sua baixa especificidade a hospedeiro, é muito efetivo como parasita de ovos e cistos, sendo empregado como agente de biocontrole na agricultura (Kiewnick & Sikora, 2006). O *Aspergillus* sp., é um fungo saprófito, cosmopolita encontrando principalmente em material vegetal em decomposição, devido a essas suas características apresenta um grande potencial biotecnológico como produtor de enzimas hidrolíticas. O gênero *Trichoderma* sp. é caracterizado por apresentar crescimento rápido de colônias em meio

de cultivo, é um representante saprófito presente no solo, e citado em vários trabalhos como antagonistas de diversos patógenos, agindo como agente no controle biológico de outros fungos de solo como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, que são patógenos de feijão; e no controle de nematóides como *Pratylenchus zaeae*, que causa grandes danos na cana-de-açúcar (Domsch et al. 2007).

A predominância do gênero *Penicillium* sp. pode estar relacionada ao seu antagonismo sobre as outras espécies, através de produção de metabólitos secundários, ou até mesmo, por meio de competição nutricional, devido a sua elevada produção de esporos e da maior capacidade de crescimento em meios de cultivo (Gomez et al. 2007).

Apesar de ter ocorrido em baixa frequência, os gêneros: *Fusarium* sp., *Microdochium* sp., *Plectosphaerella* sp. e *Colletotrichum* sp. são conhecidos como patógenos de plantas, causadores de podridão de raízes, queima de folhas, apodrecimento e lesões nos frutos (Carlucci et al. 2012). Coincidentemente, o aparecimento desses gêneros ocorreu na terceira e na quarta coleta (Figura 24), indicando que esses grupos estejam presentes em baixa abundância. Essa aparição após a adição da ATZ poderia ter estimulado o crescimento desses fungos

A maioria dos fungos ligninolíticos encontrados nesse experimento são saprófitos. Isto lhes confere uma vantagem na degradação da matéria orgânica e compostos xenobióticos, como no caso da ATZ. Como mostrado na figura 27, podemos observar uma tendência no tratamento 1 e 2 para fungos fitopatogênicos, e esse grupo funcional é caracterizado por alta atividade de enzimas ligninocelulóticas relacionadas à degradação da parede celular no processo de infecção da planta (Abhijeet et al. 2020; Zhao et al. 2013). Para os fungos ligninolíticos em nosso estudo, a proporção de fungos ectomicorrízicos foi relevante para o gênero *Chloridium* spp. Alguns fungos ectomicorrízicos podem oxidar a matéria orgânica, seja pela química Fenton de "podridão parda" ou usando peroxidases de "podridão branca", e seus benefícios da decomposição da matéria orgânica principalmente por meio da mobilização aumentada de nitrogênio em vez de liberação do C metabólico (Lindahl & Tunlid, 2015). A maioria dos fungos da ectomicorrízicos são basidiomicetos, com alguns ascomicetos e zigomicetos (Tederso et al. 2009), e pouca informação está disponível para o gênero *Chloridium*. Portanto, pode-se dizer que nosso estudo mostra uma nova perspectiva para fungos ligninolíticos do ponto de vista funcional, que deve ser investigada com mais detalhes.

O único gênero representante dos basidiomicetos *Bjerkandera* sp., apareceu uma única vez no grupo controle, na literatura esse gênero é conhecido por produzir enzimas ligninolíticas (Taboada-Puig et al. 2011), apesar de não ter sido isolado no meio seletivo para ligninolíticos, curiosamente. Mas quando cultivado no meio contendo guaiacol indicou a presença de enzimas ligninolíticas. Esse gênero também é conhecido por degradar compostos recalcitrantes e hidrocarbonetos (Riser-Roberts, 1998), sendo um fungo promissor para pesquisas futuras na degradação da ATZ.

O experimento de microcosmo controlado nesse estudo, influenciou o crescimento de fungos já adaptados a ATZ, sendo possível aprofundar em dados taxonômicos e de interesses ecológicos, dirigidos para o entendimento da biodegradação de compostos xenobióticos. Assim, sendo considerado uma importante ferramenta a ser explorada para a expansão não apenas para estudos sobre a diversidade fúngica em solos agrícolas, bem como a interação desses microrganismos com esses compostos. Outro aspecto positivo do microcosmo, é que ele facilita pesquisas com materiais orgânicos sendo necessário pequenas quantidades dos materiais a serem testados, viabilizando agilidade na avaliação independente das condições do ambiente.

## 7 CONCLUSÃO

A montagem dos sistemas microcosmos é uma ferramenta poderosa para elucidar caminhos interativos em sistemas solo-microrganismos e permitiu a geração de novos *insights* no estudo da comunidade fúngica.

Apesar da concentração de ATZ no solo encontrada nesse estudo ser baixa, está de acordo com os parâmetros aceitáveis para o cultivo de agrícola, fatores como altas concentrações de ferro possibilita a sua imobilização e conseqüentemente a sua permanência no solo.

Elevados teores de pH, P, Mg<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup> podem influenciar na diversidade de fungos do solo agrícola, principalmente os grupos saprófitos, e conseqüentemente, influenciar na ciclagem de nutrientes e na degradação de compostos xenobióticos, como os agrotóxicos.

A caracterização morfológica e a identificação taxonômica por métodos moleculares foram importantes para identificar os fungos filamentosos presentes no solo agrícola, e ter conhecimento de possíveis grupos que podem ser utilizados na biorremediação, já que é uma área pouco estudada quanto a dinâmica de fungos em solos contaminados com agroquímicos.

A diversidade funcional revelou uma grande variedade de grupos saprófitos, que são grandes responsáveis pela ciclagem de nutrientes no solo. Vale ressaltar a presença de grupos antagonistas para diversos patógenos que contribuem tanto para a fertilidade do solo quanto para a fitossanidade do sistema, que podem ser utilizados como biocontroladores de alguns fungos patógenos de plantas. Como também apresentam fungos com o potencial biotecnológico para decomposição de agrotóxicos.

A adição de atrazina não resultou em uma alteração na riqueza de táxons, principalmente devido ao perfil da comunidade fúngica. No entanto, a adição de pequenos volumes pode desencadear respostas diferentes em relação à composição da comunidade. Como o aparecimento dos gêneros: *Fusarium* sp., *Microduchium* sp., *Plectosphaerella* sp. e *Colletotrichium* sp. são conhecidos como patógenos de plantas. A comunidade controle foi a mais próxima da comunidade com a maior adição de ATZ quando todo o perfil de morfoespécies foi avaliado. No entanto, para fungos ligninolíticos, a adição de ATZ resultou em um possível efeito positivo sobre a diversidade e a degradação natural da ATZ.

O perfil de sucessão biológica mostrou associação taxonômica e funcional da diversidade de fungos, destacando alguns gêneros de maior impacto, principalmente entre o sétimo e o 14º dia. Como os gêneros *Purpureocillium* sp., *Aspergillus* sp., *Trichodermas* sp. e *Metarhizium* sp., que são antagonistas e atuam biocontroladores na agricultura.

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram a diversidade de fungos presente no solo agrícola, e representam a contribuição relevante para o conhecimento da microbiota fúngica do solo contaminado com a ATZ.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abhijeet, R. et al. 2020. Genome-wide annotation, comparison and functional genomics of carbohydrate-active enzymes in legumes infecting *Fusarium oxysporum formae speciales*. *Mycology*, 11(1), pp. 56-70.

ADAPAR, 2018. *Adapar*. [Online]

Available at:

<http://www.adapar.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=336>

Aggelopoulos, C. A., Tataraki, D. & Rassias, G., 2018. Degradation of atrazine in soil by dielectric barrier discharge plasma - potential singlet oxygen mediation. *Chemical Engineering Journal*, pp. 682-694.

Agopian, A. et al. 2013. Maternal residential atrazine exposure and gastroschisis by maternal age. *Maternal and child health journal*, pp. 1768-1775.

Amadori, M. F.; Cordeiro, G. A.; Rebouças, C. C.; Peralta-Zamora, P. G.; Grassi, M. T.; Abate, G. 2013. Extraction method for the determination of atrazine, deethylatrazine, and deisopropylatrazine in agricultural soil using factorial design. *Journal of the Brazilian Chemical Society* (Impresso), v. 24, pp. 483-491.

Asmelash, F., Bekele, T. & Birhane, E., 2016. The Potential Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Restoration of Degraded Lands. *Front. Microbiol.*, Volume 7, pp. 1-15.

Asplund, J., Kauserud, H., Ohlson, M. & Nybakken, L., 2018. Spruce and beech as local determinants of forest fungal community structure in litter, humus and mineral soil. *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 95, pp. 1-11.

Badotti, F. et al. 2018. ITS and secondary biomarkers in fungi: review on the evolution of their use based on scientific publications. *Brazilian Journal of Botany*, Volume 41, pp. 471-479.

Baldrian, P. et al. 2011. Production of extracellular enzymes and degradation of biopolymers by saprotrophic microfungi from the upper layers of forest soil. *Plant Soil*, Volume 338, p. 111–125.

Bardgett, R. & van der Putten, W., 2014. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature*, Volume 515, pp. 505-511.

Barrios, E., 2007. Soil biota, ecosystem services and land productivity.. *Ecol Econ*, Volume 64, pp. 269-285.

Batey, T. & Mackenzie, D., 2006. Soil compaction: identification directly in the field. *Soil Use and Management*, Volume 22, pp. 123-131.

Batey, T. & Mckenzie, D. C., 2006. Soil compaction: identification directly in the field.. *Soil Use and Management*, Volume 22, pp. 123-131.

Bending, G., Friloux, M. & Walker, A., 2002. Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiology Letters*, Volume 212, pp. 59-63.

- Bettucci, L. & Roquebert, M. F., 1995. Microfungi from a tropical rain forest litter and soil, a preliminary study.. *Nova Hedwigia*, Volume 61, pp. 111-118.
- Borggaard, O. L. & Gimsing, A. L., 2008. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Management Science*, Volume 64, p. 441–456.
- Bronick, C. & Lal, R., 2005. Soil structure and management: a review. *Geoderma*, Volume 124, pp. 3-22.
- Brunner-Mendoza, C. et al. 2018. A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico. *Biocontrol Science and Technology*, pp. 1-20.
- Brussaard, L., de Ruiter, P. C., Brown, G. G., 2007. Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, Volume 121(3), pp. 233–244.
- Carlucci, A., Raimondo, M. L., Santos, J. & Phillips, A. J., 2012. *Plectosphaerella* species associated with root and collar rots of horticultural crops in southern Italy. *Persoonia*, Volume 28, p. 34–48.
- Ceci, A., Pinzari, F., Russo, F. & al., e., 2018. Saprotrophic soil fungi to improve phosphorus solubilisation and release: In vitro abilities of several species. *Ambio*, Volume 47, pp. 30–40.
- Chan-Cupul, W., Heredia-Abarca, G. & Rodríguez-Vázquez, R., 2016. Atrazine degradation by fungal co-culture enzyme extracts under different soil conditions. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, Volume 0, pp. 1-11.
- Chen, W. et al. 2018. Consistent responses of surface- and subsurface soil fungal diversity to N enrichment are mediated differently by acidification and plant community in a semi-arid grassland. *Soil Biology and Biochemistry*.
- Chen, Y. et al. 2017. Plant diversity represents the prevalent determinant of soil fungal community structure across temperate grasslands in northern China. *Soil Biology & Biochemistry*, Volume 110, pp. 12-21.
- Chevrier, C. et al. 2011. Urinary biomarkers of prenatal atrazine exposure and adverse birth outcomes in the PELAGIE birth cohort. *Environmental health*, pp. 1034-1041.
- Clément, B., Delhayé, H. & Triffault-Bouchet, G., 2014. Comparison of laboratory batch and flow-through microcosm bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 108, pp. 217-223.
- Cline, L. et al. 2017. Resource availability underlies the plant-fungal diversity relationship in a grassland ecosystem. *Ecology*, Volume 99, pp. 204-216.
- Conesa, A., Punt, P. & van den Hondel, C., 2002. Fungal peroxidases: Molecular aspects and applications. *J. Biotechnol.*, Volume 93, pp. 143-158.
- Cooper, R. L. et al. 2007. Atrazine and Reproductive Function: Mode and Mechanism of Action Studies. *Birth Defects Research*, pp. 98-112.
- Costa, L. C., Peixoto, P. E. C. & Gusmão, L. P. F., 2015. Effects of storage conditions and culture media on the saprobic fungi diversity in tropical leaf litter. *Mycosphere*, 6(1), pp. 43-52.

- Cox, R., 2007. Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines begin to reveal their secrets. *Org Biomol Chem*, Volume 5, pp. 2010-2026.
- Crawley, M., 2015. *Statistics : an introduction using R*. 2<sup>a</sup> ed. London: Wiley.
- Crossland, M. et al. 2018. Implications of variation in local perception of degradation and restoration process for implementing land degradation neutrality. *Enveronmental Development*, Volume 28, pp. 42-54.
- Datta, R. et al. 2017. Enzymatic Degradation of Lignin in Soil: A Review. *Sustainability*, Volume 9, pp. 1-18.
- Davis, K. E. R., Joseph, S. J. & Janssen, P. H., 2005. Effects of Growth Medium, Inoculum Size, and Incubation Time on Culturability and Isolation of Soil Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 71, p. 826–834.
- De Maria, I. & Filho, A., 2009. Terraceamento complementa proteção da superfície. *Visão Agrícola*, Volume 9, pp. 140-143.
- Doerge, D. R., Divi, R. L. & Churchwell, M. I., 1997. Identification of the Colored Guaiacol Oxidation Product Produced by Peroxidases. *Analytical Biochemistry*, Volume 250, pp. 10-17.
- Domsch, K. H., Gams, W. & Anderson, T., 2007. *Compendium of soil fungi*. London: Academic.
- Donnelly, P. K. e. a., 1993. Degradation of Atrazine and 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid by Mycorrhizal Fungi at Three Nitrogen Concentrations *In Vitro*. *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 2642-2647.
- Doran, J. W. & Parkin, T. B., 1996. Quantitative indicators of soil quality: a minimum data set. Em: *Methods for assessing soil quality*. Wisconsin, USA: Soil Science Society American, pp. 25-37.
- Douglass, J., Radosevich, M. & Tuovinen, O., 2017. Microbial attenuation of atrazine in agricultural soils: Biometer assays, bacterial taxonomic diversity, and catabolic genes. *Chemosphere*, Volume 176, pp. 352-360.
- Dou, R. et al. 2019. Contamination of pyrethroids and atrazine in greenhouse and open-field agricultural soils in China. *Science of the Total Environment*, pp. 1-37.
- Egidi, E., Delgado-Baquerizo, M. & Plett, J. e. a., 2019. A few Ascomycota taxa dominate soil fungal communities worldwide. *Nature Communcations*, Volume 10, p. 2369 .
- Elgueta, S. et al. 2017. Atrazine, chlorpyrifos, and iprodione effect on the biodiversity of bacteria, actinomycetes, and fungi in a pilot biopurification system with a green cover. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, pp. 1-7.
- Enoch, R. et al. 2007. Mammary gland development as a sensitive end point after acute prenatal exposure to an atrazine metabolite mixture in female Long-Evans rats. *Environmental health perspectives*, pp. 541-547.
- Exterkoetter, R.; Rozane, D. E.; da Silva, W. C.; Toci, A. T.; Cordeiro, G. A.; Benassi, S. F.; Boroski, M. 2019. Potential of terracing to reduce glyphosate and AMPA surface runoff on Latosol. *Journal of Soils and Sediments*, 19, pp. 2240–2250.

- Fan, X. & Song, F., 2014. Bioremediation of atrazine: recent advances and promises. *J Soils Sediments*, Volume 14, pp. 1727-1737.
- Ferreira, E. P. B., Stone, L. F. & Garcia, C. C., 2017. População e atividade microbiana do solo em sistema agroecológico de produção. *Revista Ciência Agronômica*, Volume 48, pp. 22-31.
- Fierer, N. et al. 2007. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Appl Environ Microbiol*, Volume 73, p. 7059–7066.
- Fleck, N. G., A. R. M., Neves, R. & D., A., 2001. Ação dos herbicidas atrazine e glufosinate de amônio no aproveitamento de nitrogênio pelas plantas de milho. *Planta Daninha*, Volume 19, pp. 235-245.
- Fraç, M., Hannula, S. E., Bełka, M. & Jędrzycka, M., 2018. Fungal Biodiversity and Their Role in Soil Health. *Frontiers in Microbiology*, Volume 9, p. 707.
- Gerritse, R. G., Beltran, J. & Hernandez, F., 1996. Adsorption of atrazine, simazine, and glyphosate in soil of the gngangara mound, western australia. *Australian Journal of soil research*, Volume 34, pp. 599-607.
- Giroux, I., 2015. Présence de pesticides dans l'eau au Québec - Portrait et tendances dans les zones de maïs et de soya 2011 à 2014. s.l.:s.n.
- Gomez, E., Pioli, R. & Conti, M., 2007. Fungal abundance and distribution as influenced by clearing and land use in a vertc soil of Argentina. Em: *Biology and Fertility of Soils*. Berlin: s.n., pp. 373-377.
- Goodman, M., Mandel, J., DeSesso, J. & Scialli, A., 2014. Atrazine and pregnancy outcomes: a systematic review of epidemiologic evidence. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, pp. 215-236.
- Govarathanan, M., Fuzisawa, S., Hosogaia, T. & Chang, Y., 2017. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons using the filamentous fungus *Penicillium* sp. CHY-2 and characterization of its manganese peroxidase activity. *RSC Advances*, Volume 7, pp. 20716-20723.
- Hankin, L. & Anagmostakis, S., 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, Volume 67, pp. 597-607.
- Harms, H., Schlosser, D. & Wick, L., 2011. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat Rev Microbiol*, Volume 9, pp. 177-192.
- Harms, H., Schlosser, D. & Wick, L. Y., 2011. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Applied and Industrial Microbiology*, Volume 9, pp. 177-192.
- Hayes, T. et al. 2011. Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: consistent effects across vertebrate classes. *Steroid Biochem & Mol*, pp. 64-73.
- Hénault-Ethier, L., 2016. Backgrounder: atrazine: banned in Europe, common in Canada. Québec: s.n.
- Henn, C. et al. 2020. Biodegradation of Atrazine and Ligninolytic Enzyme Production by Basidiomycete Strains. *Research Square*, pp. 1-27.

- Hernandez-Ortega, A. F. P. M. A., 2012. Fungal aryl-alcohol oxidase: a peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Volume 93, pp. 1395-1410.
- Hibbett, D. et al. 2016. Sequencebased classification and identification of fungi. *Mycologia*, Volume 108, pp. 1049-1068.
- Hibbett, D. et al. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, pp. 509-547.
- Hibbett, D. S. et al. 2018. Phylogenetic taxon definitions for Fungi, Dikarya, Ascomycota and Basidiomycota. *IMA FUNGUS*, Volume 9, pp. 291-298.
- Huang, H. et al. 2007. Effect of arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus caledonium*) on the accumulation and metabolism of atrazine in maize (*Zea mays* L.) and atrazine dissipation in soil. *Environmental Pollution*, Volume 146, pp. 452-457.
- Hu, M. et al. 2017. Characterization of the fate and distribution of ethiprole in water-fish-sediment microcosm using a fugacity model. *Science of the Total Environment*, Volume 576, pp. 696-704.
- Ijoma, G. N. & Tekere, M., 2017. Potential microbial applications of co-cultures involving ligninolytic fungi in the bioremediation of recalcitrant xenobiotic compounds. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 14(8), pp. 1787-1806.
- Jansa, J. et al. 2003. Soil tillage affects the community structure of mycorrhizal fungi in maize roots. *Ecological Applications*, 13(4), pp. 1164-1176.
- Javaroni, R. C. A., Landgraf, M. D. & Resende, M. O., 1998. Comportamento dos herbicidas atrazina e alaclor aplicados em solo preparado para o cultivo de cana-de-açúcar. *QUÍMICA NOVA*, pp. 58-64.
- Kameshwar, A., Ramos, L. & Qin, W., 2019. CAZymes-based ranking of fungi (CBRF): an interactive web database for identifying fungi with extrinsic plant biomass degrading abilities. *Bioresour. Bioprocess.*, Volume 6, p. 51.
- Karanasios, E., Tsiropoulos, N. & Karpouzas, D., 2012. On-farm biopurification systems for the depuration of pesticide wastewaters: recent biotechnological advances and future perspectives. *Biodegradation*, Volume 23, p. 787–802.
- Khromonygina, V. et al. 2004. Degradation of the Herbicide Atrazine by the Soil Mycelial Fungus INBI 2-26 (–), a Producer of Cellobiose Dehydrogenase. *Applied Biochemistry and Microbiology*, Volume 40, pp. 337-343.
- Kiewnick, S. & Sikora, R., 2006. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. *Biological Control*, Volume 38, p. 179–187.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), pp. 111-120.
- Klaubauf, S. et al. 2010. Molecular diversity of fungal communities in agricultural soils from Lower Austria. *Fungal Diversity*, Volume 44, p. 65–75.

- Kluge, J., Terfehr, D. & Kück, U., 2018. Inducible promoters and functional genomic approaches for the genetic engineering of filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, Volume 102, pp. 6357-6372.
- Kookana, R. S., Janik, L. J., Forouzangohar, M. & Forrester, S. T., 2008. Prediction of Atrazine Sorption Coefficients in Soils Using Mid-Infrared Spectroscopy and Partial Least-Squares Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 3208-3213.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Dataset. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), pp. 1870-1874.
- Kuria, A. W. et al. 2018. Farmers' knowledge of soil quality indicators along a land degradation on gradient in Rwanda. *Geoderma Regional*, Volume 15, p. e00199.
- Laird, D. A. & Koskinen, W. C., 2008. Triazine soil interactions. Em: *The Triazine Herbicides 50 years Revolutionizing Agriculture*. 1 ed. San Diego: Elsevier, pp. 275-299.
- Lambais, M., Cury, J., Maluche-Barreta, C. & Büll, R., 2005. Diversidade Microbiana do Solo: Definindo novos paradigmas. *Tópicos Ci. Solo*, Volume 4, pp. 43-84.
- LeBaron, H., J. M. & Burnside, O., 2008. The Triazine Herbicides 50 years Revolutionizing Agriculture. 1 ed. San Diego: Elsevier.
- Legendre, P. & Legendre, L., 2012. Numerical Ecology. 3 ed. s.l.:Elsevier.
- Lima, D. et al. 2018. Fungal Bioremediation of Pollutant Aromatic Amines. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*.
- Lindahl, B. D. & Tunlid, A., 2015. Ectomycorrhizal fungi – potential organic matter decomposers, yet not saprotrophs. *New Phytologist*, Volume 205, p. 1443–1447.
- Lin, Z. et al. 2018. Effects of two ecological earthworm species on atrazine degradation performance and bacterial community structure in red soil. *Chemosphere*, Volume 196, pp. 467-475.
- Li, Z., Fu, J., Zhou, R. & Wang, D., 2018. Effects of phenolic acids from ginseng rhizosphere on soil fungi structure, richness and diversity in consecutive monoculturing of ginseng. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(8), pp. 1788-1794.
- Lopes, R. D. O. et al. 2020. Atrazine, desethylatrazine (DEA) and desisopropylatrazine (DIA) degradation by *Pleurotus ostreatus* INCQS 40310. *Biocatal Biotransformation*, pp. 1-16.
- López-Mondéjar, R. et al. 2016. Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems. *Scientific Reports*, Volume 6.
- Louca, S. et al. 2016. High taxonomic variability despite stable functional structure across microbial communities. *Nature Ecology & Evolution*, Volume 1, pp. 1-12.
- Louca, S., Polz, M., Mazel, F. & al., e., 2018. Function and functional redundancy in microbial. *Nature Ecology & Evolution*, Volume 2, pp. 936-943.
- Lowery, B., 1996. Soil water parameters and soil quality. Em: *Methods for assessing soil quality*. Madison: Soil Science Society of America, pp. 143-155.

- Lundell, T. K., Mäkelä, M. R., de Vries, R. P. & Hildén, K. S., 2014. Genomics, Lifestyles and Future Prospects of Wood-Decay and Litter-Decomposing Basidiomycota. *Advances in Botanical Research*, Volume 70, pp. 329-370.
- Macedo, M. C. M., 2009. Integração lavoura pecuária: O estado da arte e inovações tecnológicas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Volume 38, pp. 133-146.
- Madariaga-Navarrete, A. et al. 2017. Bioremediation model for atrazine contaminated agricultural soils using phytoremediation (using *Phaseolus vulgaris* L.) and a locally adapted microbial consortium. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 52(6), pp. 367-375.
- Malarczyk, E., Jarosz-Wilkolazka, A. & Kochmanska-Rdest, J., 2003. Effect of Low Doses of Guaiacol and Ethanol on Enzymatic Activity of Fungal Cultures. *Nonlinearity in Biology, Toxicology, and Medicine*, Volume 1, pp. 167-178.
- Malusa, E., Pinzari, F. & Canfora, L., 2016. Efficacy of biofertilizers: challenges to improve crop production. Em: *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 2: Functional Applications*. New Delhi: Springer, p. 17–40.
- Manganyi, M. et al. 2018. Phylogenetic analysis and diversity of novel endophytic fungi isolated from medicinal plant *Sceletium tortuosum*. *Phytochemistry Letters*, Volume 27, pp. 36-43.
- Marinho, G., Barbosa, B., Rodrigues, K. A. M. & Pereira, L., 2017. Potential of the filamentous fungus *Aspergillus niger* AN 400 to degrade Atrazine in wastewaters. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Volume 9, pp. 162-167.
- Martins, E., Melo, V., Bohone, J. & Abate, G., 2018. Sorption and desorption of atrazine on soils: The effect of different soil fractions. *Geoderma*, Volume 322, pp. 131-139.
- Matheson, F., 2008. Microcosm. *Encyclopedia of Ecology*, pp. 2393-2397.
- Mielnickzuk, J., 1999. Matéria orgânica e a sustentabilidade de sistemas agrícolas. Em: *Fundamentos da matéria orgânica do solo..* Porto Alegre: Genesis, pp. 1-8.
- Monquero, P. A. et al. 2009. Eficácia de herbicidas em diferentes quantidades de palha de cana-de-açúcar no controle de ipomoea grandifolia. *Bragantia, Campinas*, Volume 68, pp. 367-372.
- Montero, C. I. et al. 2008. Evaluation of Pyrosequencing® Technology for the Identification of Clinically Relevant Non-Dematiaceous Yeasts and Related Species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, Volume 27, pp. 821-830.
- Moraes, P. V. D. & Rossi, P., 2010. Comportamento ambiental do glifosato. *Scientia Agraria Paranaensis*, Volume 9, pp. 22-35.
- Moreira, J. C. et al. 2012. Contaminação de águas superficiais e de chuva por agrotóxicos em uma região do estado do Mato Grosso. *Ciência & Saúde Coletiva*, pp. 1557-1568.
- Morgenstern, I., Klopman, S. & Hibbett, D., 2008. Molecular evolution and diversity of lignin degrading heme peroxidases in the *Agaricomycetes*. *J. Mol. Evol.*, Volume 66, p. 243–257.

- Motter, P. & Almeida, H., 2015. *Plantio Direto - A tecnologia que revolucionou a agricultura brasileira*. 1ª ed. Foz do Iguaçu: Parque Itaipu.
- Mougin, C., Laugero, C., Asther, M. & Chaplain, V., 1997. Biotransformation of striazine herbicides and related degradation products in liquid cultures by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Pesticide Science*, Volume 49, pp. 169-177.
- Myrold, D., Zeglin, L. & Jansson, J., 2014. The potential of metagenomic approaches for understanding soil microbial processes. *Soil Sci Soc Am J*, pp. 3-10.
- Neuenkamp, L. et al. 2018. The role of plant mycorrhizal type and status in modulating the relationship between plant and arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytologist*, pp. 1-12.
- Nguyen, N. et al. 2016. FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology*, Volume 20, pp. 241-248.
- Odum, E. P. & Barret, G. W., 2011. Fatores limitantes e regulatórios. Em: *Fundamentos de Ecologia*. São Paulo: Cengage Learning, pp. 177-233.
- Oladele, S. & Ayodele, O., 2017. Glyphosate, 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride and Glyphosate, 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride and fungal communities in a tropical alfisol. *Eurasian J Soil Sci*, Volume 6, pp. 238-248.
- Pepper, I. & Gerba, C., 2005. *Environmental Microbiology, A Laboratory Manual*. 2nd Ed. ed. Boston, MA.: Academic Press.
- Petchey, O. & Gaston, K., 2006. Functional diversity: back to basics and looking forward. *Ecology Letters*, Volume 9, pp. 741-758.
- Pires, A., Omena, P., Azevedo, F. & Gonçalves, A., 2014. O universo em um microcosmo. *Ciência Hoje*, Volume 53, pp. 56-57.
- Plácido, J. & Capareda, S., 2015. Ligninolytic enzymes: a biotechnological alternative for bioethanol production. *Bioresour. Bioproc.*, Volume 2, pp. 1-23.
- Ploffer, L. D., 1989. The *Diaporthe/Phomopsis* disease complex of soybean. Em: *World Soybean Research Conference*. Buenos Aires: s.n., pp. 1695-1697.
- Raeder, U. & Broda, P., 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, Volume 1, pp. 17-20.
- Ribeiro, N. h. et al. 2018. Descoloração de corantes industriais por fungos degradadores de madeira isolados no campus da UFAM. *Scientia Amazonia*, Volume 7, pp. 141-149.
- Richardson, A. E., Hocking, P. J., Simpson, R. J. & George, T. S., 2009. Plant mechanisms to optimize access to soil phosphorus. *Crop Pasture Sci.*, Volume 60, pp. 124-143.
- Riser-Roberts, E., 1998. Biodegradation/ Mineralization/ Biotransformation/ Bioaccumulation of Petroleum Constituents and Associated Heavy Metal. Em: *Remediation of Petroleum Contaminated Soils: Biological, Physical, and Chemical Processes*. New York: Lewis Publishers, p. 135.
- Roese, A. D., 2018. Solo saudável. *Revista Cultivar*, Volume 229, pp. 15-17.

- Roese, A. D. et al. 2018. Agricultural diversification reduces the survival period of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia. *European Journal of Plant Pathology*, Volume 151, pp. 713-722.
- Rousseaux, S., Hartmann, A. & Soulas, G., 2001. Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. *FEMS Microbiol Ecol*, Volume 36, pp. 211-222.
- Rytioja, J. et al. 2014. Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Volume 78, p. 614 – 649.
- Saccá M.L., Barra Caracciolo A., Di Lenola M., Grenni P. 2017. Ecosystem Services Provided By Soil Microorganisms. In: Lukac M., Grenni P., Gamboni M. (eds) *Soil Biological Communities and Ecosystem Resilience. Sustainability in Plant and Crop Protection*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-63336-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-63336-7_2)
- Sanjuan, T. et al. 2015. Five new species of entomopathogenic fungi from the Amazon and evolution of neotropical Ophiocordyceps. *Fungal Biology*, 119(10), pp. 901-916.
- Santos, J. et al. 2005. Atividade microbiana do solo após aplicação de herbicidas em sistemas de plantio direto e convencional. *Planta Daninha*, Volume 23, pp. 683-691.
- Schlöter, M., Dilly, O. & Munch, J. C., 2003. Indicators for evaluating soil quality. *Agric. Ecosyst.*, Volume 98, pp. 255-262.
- Seffernick, J. et al. 2002. Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp, strain ADP is a metalloenzyme. *Biochem*, Volume 41, pp. 14430-14437.
- Sene, L., Converti, A., Secchi, G. & Simão, R., 2010. New aspects on atrazine biodegradation. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, Volume 53, pp. 487-496.
- Sepwin, N. S., Fijai, A. & Mulyaningsih, Y., 2019. Screening of Ligninolytic activity of some Basidiomycota from domestic Oil Palm Plantation in Bogor. *Journal of Physics: Conference Series*, pp. 1-5.
- Silva, V. et al. 2015. Evaluation of *Arthrobacter aurescens* Strain TC1 as Bioaugmentation Bacterium in Soils Contaminated with the Herbicidal Substance Terbutylazine. *PLoS One.*, pp. 1-15.
- Simonato, J., Grigolli, J. F. J. & Oliveira, H. N., 2013. Controle Biológico de Insetos-Praga na Soja. *Tecnologia e Produção: Soja*, p. 16.
- Singh, S. et al. 2018. Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. *Environ Chem Lett*, Volume 16, pp. 211-237.
- Smalla, K. et al. 2007. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results?. *Journal of Microbiological Methods*, Volume 69, pp. 470-479.
- Snakin, V. V. et al. 1966. The system of assessment of soil degradation. *Soil Technology*, Volume 8, pp. 331-343.
- Solomon, R., Kumar, A. & Santhi, V., 2013. Atrazine biodegradation efficiency metabolite detection and trzD gene expression by enrichment bacterial cultures from agricultural soil. *J Zhejiang Univ Sci B*, Volume 14, pp. 1162-1172.

- Souza, L. H., Novais, R. F., Alvarez, V. V. H., Villani, E. M. A. 2010. Efeito do pH do solo rizosférico e não rizosférico de plantas de soja inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* na absorção de boro, cobre, ferro, manganês e zinco. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34: 1641-1652.
- Stromberger, M. E., 2005. Fungal communities of agroecosystems.. Em: *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*. 3ª ed. Boca Raton: CRC Press, pp. 813-832.
- Sun, J. M., Irzykowski, W., Jedryczka, M. & Han, F. X., 2005. Analysis of the Genetic Structure of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary Populations from Different Regions and Host Plants by Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47(4), p. 385–395.
- Taboada-Puig, R. et al. 2011. A new strain of *Bjerkandera* sp. production, purification and characterization of versatile peroxidase. *World J Microbiol Biotechnol*, Volume 27, pp. 115-122.
- Tedersoo, L. et al. 2016. Tree diversity and species identity effects on soil fungi, protists and animals are context dependent. *The ISME Journal*, Volume 10, pp. 346-362.
- Tedersoo, L. et al. 2014. Global diversity and geography of soil fungi. *Science*, Volume 346, pp. 1256688-1-1256688-10.
- Tedersoo, L. et al. 2009. Ascomycetes associated with ectomycorrhizas: molecular diversity and ecology with particular reference to the Helotiales. *Environmental Microbiology*, 11(12), pp. 3166-3178.
- Tesfahunegn, G. B., Tamene, L. & Vlek, P. L. G., 2011. Evaluation of soil quality identified by local farmers in Mai-Negus catchment, Northern Ethiopia. *Geoderma*, Volume 163, pp. 209-218.
- Tomaz, R., 2003. Avaliação de fungos com potencial de degradação de diuron e pirithiobac-sodium. Campinas: Dissertação de Doutorado. Programa de Pós-Graduação de Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas.
- Tong, L. et al. 2015. Screen for soil fungi highly resistant to dichloroaniline uncovers mostly *Fusarium* species. *Fungal Genetics and Biology*, Volume 81, pp. 82-87.
- Tortella, G. et al. 2013. Atrazine dissipation and its impact on the microbial communities and community level physiological profiles in a microcosm simulating the biomixture of on-farm biopurification system. *Journal of Hazardous Materials*, Volume 260, pp. 459-457.
- Trebst, 2008. The mode of action of triazine herbicides in plants. Em: *The Triazine Herbicides 50 years Revolutionizing Agriculture*. 1 ed. San Diego(CA): Elsevier, pp. 101-110.
- Treseder, K. K. & Lennon, J. T., 2015. Fungal traits that drive ecosystem dynamics on land. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, Volume 79, p. 243–262.
- Udikovic´-Kolic´, N. et al. 2010. Taxonomic and functional diversity of atrazine degrading bacterial communities enriched from agrochemical factory soil. *J Appl Microbiol*, Volume 109, pp. 273-278.

- Valadares-Pereira, A. A. et al. 2017. Fungal Community Structure as an Indicator of Soil Agricultural Management Effects in the Cerrado. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, Volume 41, p. e0160489.
- Valentin, J., 2012. *Ecologia Numérica: Uma Introdução à Análise Multivariada de Dados Ecológicos*. Rio de Janeiro: Interciência.
- Val-Moraes, S. P. et al. 2016. Liming in the sugarcane burnt system and the green harvest practice affect soil bacterial community in northeastern São Paulo, Brazil. *A Van Leeuw J Microb*, Volume 109, pp. 1643-1654.
- Voběrková, S., Solčány, V., Vršanská, M. & Adam, V., 2018. Immobilization of ligninolytic enzymes from white-rot fungi in cross-linked aggregates. *Chemosphere*, Volume 202, pp. 694-707.
- Wakelin, S. A. et al. 2008. Habitat selective factors influencing the structural composition and functional capacity of microbial communities in agricultural soils. *Soil Biol Biochem*, Volume 40, pp. 803-813.
- Wang, L. et al. 2005. Biodegradation of atrazine in transgenic plants expressing a modified bacterial atrazine chlorohydrolase (atzA) gene. *Plant Biotech J*, Volume 3, pp. 475-486.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B. & Taylor, J. W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. Em: *PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual*. s.l.:Academic Press, pp. 315-322.
- Xu, X. et al. 2018. Modeling microbial communities from atrazine contaminated soils promotes the development of biostimulation solutions. *International Society for Microbial Ecology*.
- Yu, K. & Rinklebe, J., 2011. Advancement in soil microcosm apparatus for biogeochemical research. *Ecological Engineering*, Volume 37, pp. 2071-2075.
- Zabaloy, M. et al. 2017. Nitrifying bacteria and archaea withstanding glyphosate in fertilized soil microcosm. *Applied Soil Ecology*, pp. 88-95.
- Zhang, A. et al. 2012. A fuzzy-set-theory-based approach to analyse species membership in DNA barcoding. *Molecular Ecology*, 21(8), pp. 1848-1863.
- Zhao, Z., Liu, H., Wang, C. & al., e., 2013. Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC Genomics*, Volume 14, p. 274.

## 9 ANEXO

## 1. Identificação molecular das morfoespécies baseado na análise de similaridade.

Morfoespécie	Sequência ITS			Identificação final	Número de Acesso
	NCBI Genbank		Espécies		
	Acesso				
R01	98,57	MN592940.1	<i>Aspergillus aculeatus</i>	<i>Aspergillus</i> sp. R01	MT757795
	98,41	MT102843.1	<i>Aspergillus brunneoviolaceus</i>		
R04	99,21	JX826636.1	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	<i>Trichoderma</i> sp. R04	MT757796
	99,01	HQ995668.1	<i>Trichoderma gamsii</i>		
R05	99,00	MH859372.1	<i>Aspergillus neoflavipes</i>	<i>Aspergillus</i> sp. R05	MT757797
	99,00	EF669597.1	<i>Aspergillus tizukae</i>		
R06	98,03	MG976410.1	<i>Epicoccum</i> sp.	<i>Epicoccum</i> sp. R06	
	98,03	MG969886.1	<i>Epicoccum sorghinum</i>		
R07	95,19	JQ899032.1	<i>Phomopsis longicolla</i>	Isolado R07	
R09	99,81	MG976403.1	<i>Epicoccum</i> sp	<i>Epicoccum</i> sp. R09	MT757798
	99,63	MN215621.1	<i>Epicoccum sorghinum</i>		
R10	97,78	LN813029.1	<i>Geotrichum</i> sp.	Isolado R10	
	92,89	MG599262.1	<i>Galactomyces</i> sp.		
R11	99,15	MN893920.1	<i>Diaporthe longicolla</i>	<i>Diaporthe</i> sp. R11	MT757799
	98,74	MK483177.1	<i>Diaporthe sojae</i>		
R12	99,23	KF657728.1	<i>Talaromyces flavus</i>	<i>Talaromyces</i> sp. R12	
	99,23	MH865647.1	<i>Talaromyces purpureogenus</i>		
R14	99,82	MT279298.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	<i>Purpureocillium</i> sp. R14	MT757800
R15	99,07	MN962644.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	<i>Purpureocillium</i> sp. R14	
R17	99,79	MH104861.1	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Metarhizium</i> sp. R17	MT757801
	99,38	KX009118.1	<i>Metarhizium</i> sp.		
R18	99,81	MH911376.1	<i>Clonostachys rosea</i>	<i>Clonostachys</i> sp. R18	MT757802
	99,23	MH284648.1	<i>Trichoderma</i> sp.		
R20	99,14	MG551565.1	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium</i> sp. R20	
	99,14	KM076600.1	<i>Fusarium chlamyosporum</i>		
R21	99,83	MT111912.1	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	<i>Trichoderma</i> sp. R21	MT757803
	99,5	KX343121.1	<i>Trichoderma koningii</i>		
R22	100	MK165726.1	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Aspergillus</i> sp. R23	MT757804
	99,81	KJ175435.1	<i>Aspergillus sojae</i>		
R23	99,61	MH104860.1	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Metarhizium</i> sp. R17	
	99,40	MF681524.1	<i>Metarhizium robertsii</i>		
R24	97,55	MH858522.1	<i>Penicillium sizovae</i>	<i>Penicillium</i> sp. R24	MT757805
	97,48	KP942904.1	<i>Penicillium steckii</i>		
R26	98,44	MH299933.1	<i>Diaporthe longicolla</i>	<i>Diaporthe</i> sp. R11	
	98,00	HQ130441.1	<i>Phomopsis longicolla</i>		
R27	99,31	KY587320.1	<i>Neurospora</i> sp.	<i>Neurospora</i> sp. R27	MT757806
	98,81	FJ360521.1	<i>Neurospora crassa</i>		
R28	100	KU214241.1	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus</i> sp. R28	MT757807

	99,81	MT505692.1	<i>Aspergillus hortai</i>		
R29	100	MH104861.1	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Metarhizium</i> sp. R17	
	99,58	MT355666.1	<i>Metarhizium robertsii</i>		
R32	94,26	MN044797.1	<i>Penicillium janthinellum</i>	<i>Penicillium</i> sp. R32	MT757808
	94,11	MT529117.1	<i>Penicillium raperi</i>		
R33	99,62	MH137672.1	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	<i>Trichoderma</i> sp. R33	
	99,62	KF811427.1	<i>Trichoderma gamsii</i>		
R34	98,98	KF736447.1	<i>Clonostachys rosea</i>	Isolado 34	
	98,61	JF273499.1	<i>Gliocladium</i> sp.		
R37	99,80	KU377456.1	<i>Clonostachys rosea</i>	Isolado 37	
	99,50	KX008669.1	<i>Talaromyces</i> sp.		
R38	99,81	MK453328.1	<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Trichoderma</i> sp. R38	MT757809
	99,63	KY069811.1	<i>Trichoderma atroviride</i>		
R39	99,82	KX538807.1	<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Trichoderma</i> sp. R38	
	99,64	MK300030.1	<i>Trichoderma hamatum</i>		
R41	100	MF093211.1	<i>Clonostachys rosea</i>	<i>Clonostachys</i> sp. R41	MT757810
	99,80	MK288138.1	<i>Valsa sordida</i>		
R43	97,57	HQ630978.1	<i>Chloridium</i> sp.	<i>Clonostachys</i> sp. R43	MT757811
	96,77	KM030318.1	<i>Phialocephala humicola</i>		
R44	99,39	KU377456.1	<i>Clonostachys rosea</i>	Isolado R44	
	99,19	KX008669.1	<i>Talaromyces</i> sp.		
R45	99,62	MH810076.1	<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Trichoderma</i> sp. R38	
	99,62	HQ334997.1	<i>Trichoderma harzianum</i>		
R46	99,81	MK208697.1	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Talaromyces</i> sp. R42	MT757812
	99,62	MK208704.1	<i>Talaromyces pinophilus</i>		
R47	99,81	MK791649.1	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	<i>Trichoderma</i> sp. R21	
	99,63	MK459323.1	<i>Trichoderma gamsii</i>		
R48	100	MN515067.1	<i>Talaromyces purpureogenus</i>	<i>Talaromyces</i> sp. R12	
	99,61	KC254067.1	<i>Talaromyces funiculosus</i>		
R49	99,81	MH858522.1	<i>Penicillium sizovae</i>	<i>Penicillium</i> sp. R24	
	99,81	MF475913.1	<i>Penicillium citrinum</i>		
R50	100	KJ527450.1	<i>Penicillium paraherquei</i>	<i>Penicillium</i> sp. R50	MT757813
	99,40	AB455514.2	<i>Penicillium brasilianum</i>		
R51	99,83	AB859015.1	<i>Diaporthe longicolla</i>	<i>Diaporthe</i> sp. R51	MT757814
	99,83	AY857868.1	<i>Phomopsis longicolla</i>		
R54	99,59	MH104860.1	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Metarhizium</i> sp. R17	
	99,38	MF681524.1	<i>Metarhizium robertsii</i>		
R55	99,44	MN493634.1	<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Trichoderma</i> sp. R38	
	99,26	KY069811.1	<i>Trichoderma atroviride</i>		
R56	99,61	MH857393.1	<i>Aspergillus aureolus</i>	<i>Aspergillus</i> sp. R56	MT757815
	99,61	KY808743.1	<i>Aspergillus udagawae</i>		
R57	100	KM287571.1	<i>Pestalotiopsis disseminata</i>	<i>Pestalotiopsis</i> sp. R57	MT757816
	97,27	JQ418369.1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		
R58	99,60	MN589740.1	<i>Metarhizium marquandii</i>	<i>Metarhizium</i> sp. R58	MT757817
R59	99,80	MH104861.1	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Metarhizium</i> sp. R17	

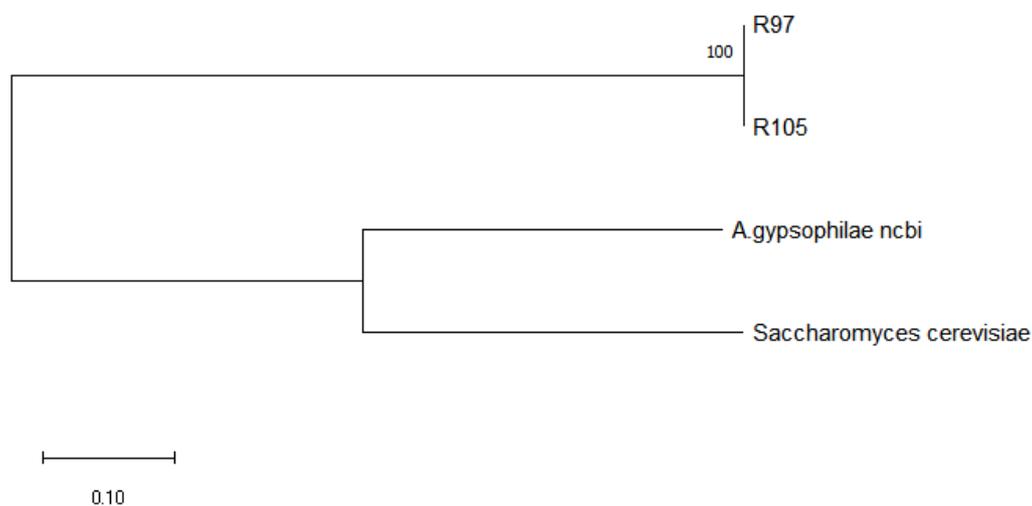
	99,39	MT355666.1	<i>Metarhizium robertsii</i>		
R60	99,63	MN634662.1	<i>Purpureocillium lavendulum</i>	<i>Purpureocillium</i> sp. R60	MT757818
	99,63	MN634369.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>		
R62	98,11	MN944541.1	<i>Epicoccum sorghinum</i>	<i>Epicoccum</i> sp. R06	
R63	99,16	MH911376.1	<i>Clonostachys rosea</i>	<i>Clonostachys</i> sp. R18	
	98,74	JF273499.1	<i>Gliocladium</i> sp.		
R64	99,58	MN215780.1	<i>Nigrospora hainanensis</i>	<i>Nigrospora</i> sp. R64	MT757819
	99,58	MH003368.1	<i>Nigrospora oryzae</i>		
R65	98,98	MG921230.1	<i>Pseudallescheria ellipsoidea</i>	<i>Pseudallescheria</i> sp. R65	MT757820
	98,98	KP132695.1	<i>Scedosporium boydii</i>		
R66	99,80	MT240638.1	<i>Didymella americana</i>	<i>Didymella</i> sp. R66	MT757821
	99,80	KM979809.1	<i>Didymella glomerata</i>		
R67	97,79	MH865343.1	<i>Penicillium shearii</i>	<i>Penicillium</i> sp. R67	MT757822
R70	99,79	MH854923.1	<i>Metarhizium marquandii</i>	<i>Metarhizium</i> sp. R70	MT757823
R71				Isolado R71	
R72	100	LT558944.1	<i>Talaromyces purpureogenus</i>	<i>Talaromyces</i> sp. R12	
	99,80	KF657728.1	<i>Talaromyces flavus</i>		
R73	96,98	KY617067.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus</i> sp. R73	MT757824
R74	99,79	MT558921.1	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium</i> sp. R74	MT757825
	99,79	FJ717687.1	<i>Penicillium griseofulvum</i>		
R75	100	KJ158184.1	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	<i>Cladosporium</i> sp. R75	MT757826
	99,79	MK271633.1	<i>Cladosporium angustisporum</i>		
R76	99,60	MN006617.1	<i>Talaromyces pinophilus</i>	<i>Talaromyces</i> sp. R46	
	99,60	MN944724.1	<i>Talaromyces verruculosus</i>		
R77	98,37	MK805486.1	<i>Talaromyces stollii</i>	<i>Talaromyces</i> sp. R77	MT757827
	98,37	MK805482.1	<i>Talaromyces funiculosus</i>		
R78	100	LC317455.1	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Aspergillus</i> sp. R78	MT757828
	99,83	HQ285620.1	<i>Aspergillus sojae</i>		
R79	98,24	GQ370373.1	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp. R79	
	98,21	MN270175.1	<i>Penicillium ochrochloron</i>		
R80	99,58	KP966098.1	<i>Phoma</i> sp.	Isolado R80	
	99,58	KJ686385.1	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>		
R81	97,33	MN215780.1	<i>Nigrospora hainanensis</i>	<i>Nigrospora</i> sp. R64	
	97,33	MN486553.1	<i>Nigrospora rubi</i>		
R82	85,19	HM055433.1	<i>Metarhizium anisopliae</i>		
R84	99,81	GQ370380.2	<i>Coniothyrium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp. R84	MT757829
	99,43	KT826681.1	<i>Penicillium cremeogriseum</i>		
R86	95,42	MT146479.1	<i>Chloridium virescens</i>	<i>Chloridium</i> sp. R86	MT757830
R87	100	HQ115691.1	<i>Chloridium</i> sp.	<i>Chloridium</i> sp. R87	MT757831
	100	MK828622.1	<i>Chloridium gonytrichii</i>		
R88	99,61	MK805487.1	<i>Talaromyces purpureogenus</i>	<i>Talaromyces</i> sp. R12	
	99,60	MH810077.1	<i>Talaromyces flavus</i>		
R89				Isolado R89	
R90	100	MK370669.1	<i>Clonostachys rosea</i>	Isolado R90	
	99,41	FJ441012.1	<i>Fusarium oxysporum</i>		

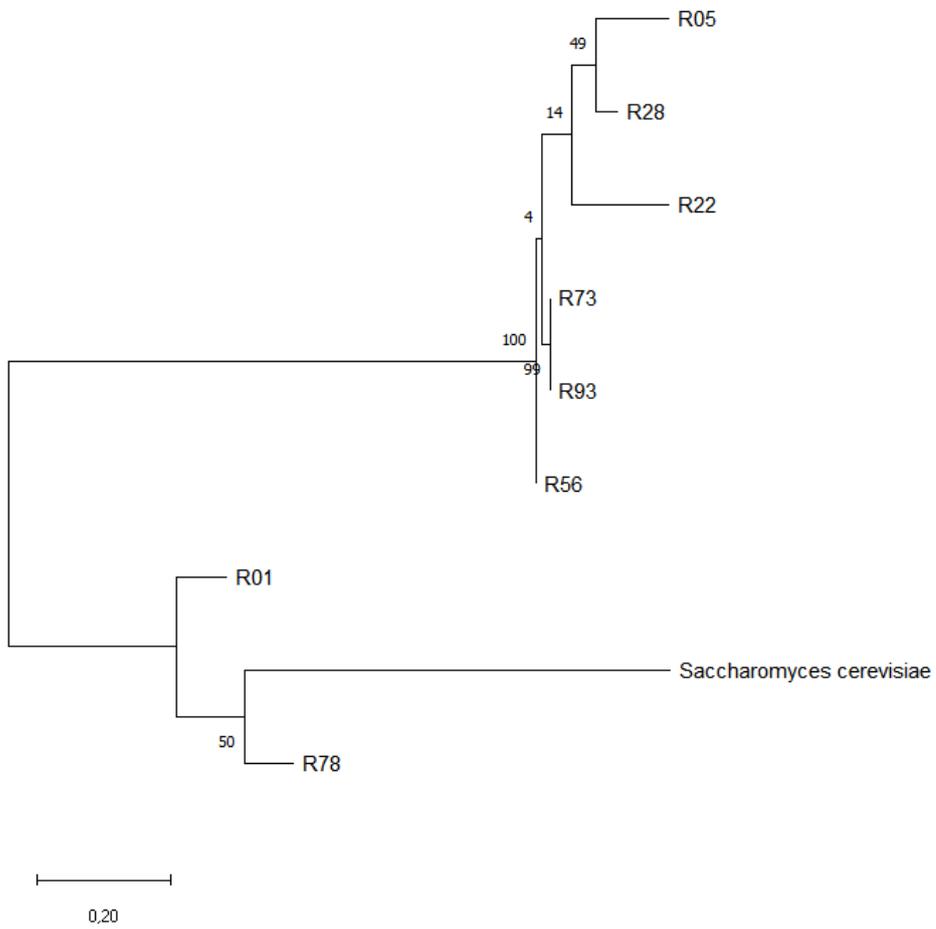
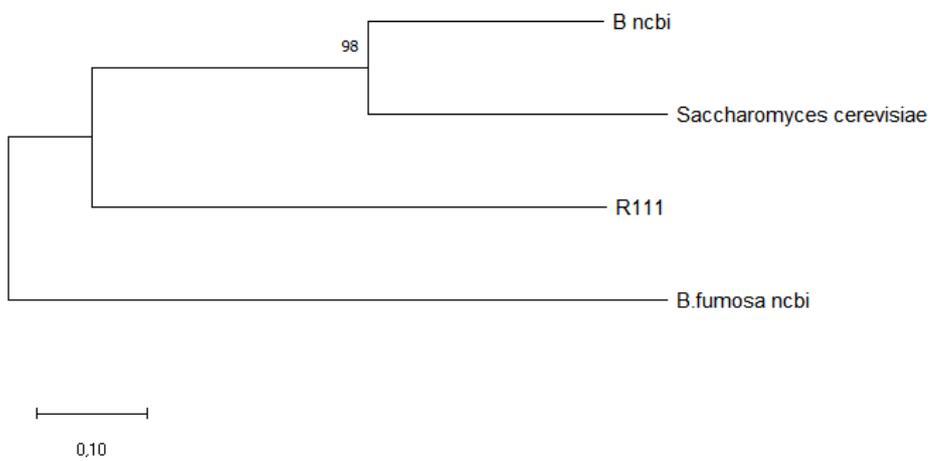
R91	98,92	NR_158920.1	<i>Plectosphaerella sinensis</i>	<i>Plectosphaerella</i> sp. R91	MT757832
	97,68	MG748636.1	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>		
R92	98,86	MH299933.1	<i>Diaporthe longicolla</i>	<i>Diaporthe</i> sp. R11	
	98,41	KC343196.1	<i>Diaporthe sojae</i>		
R93	98,29	MG991579.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus</i> sp. R73	
R94	99,16	MN252061.1	<i>Metarhizium robertsii</i>	<i>Metarhizium</i> sp. R17	
	98,78	JN379352.1	<i>Metarhizium anisopliae</i>		
R95	97,12	KY366172.1	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Pestalotiopsis</i> sp. R57	
	97,12	HQ645078.1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		
R97	99,59	MN960325.1	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria</i> sp. R97	MT757833
	99,59	MN856241.1	<i>Alternaria brassicae</i>		
R98				Isolado R98	
R100	99,68	KY963118.1	<i>Geotrichum</i> sp.	Isolado R100	
R101	99,10	NR_158920.1	<i>Plectosphaerella sinensis</i>	<i>Plectosphaerella</i> sp. R91	
	98,85	MG748636.1	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>		
R102	99,06	MH858477.1	<i>Pochonia chlamydosporia</i>	Isolado R102	
	98,82	AY555966.1	<i>Verticillium catenulatum</i>		
R103	98,91	MN808335.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	<i>Purpureocillium</i> sp. R14	
R104	100	KF736447.1	<i>Clonostachys rosea</i>	<i>Clonostachys</i> sp. R104	MT757834
R105	100	MH187903.1	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria</i> sp. R97	
	99,80	MN822660.1	<i>Alternaria tenuissima</i>		
R107	98,15	MN962644.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	<i>Purpureocillium</i> sp. R14	
R109	99,20	MH864436.1	<i>Clonostachys rosea</i>	<i>Clonostachys</i> sp. R18	
R110	99,58	MH864645.1	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Metarhizium</i> sp. R17	
	99,58	MH143802.1	<i>Metarhizium robertsii</i>		
R111	100	KM510499.1	<i>Bjerkandera</i> sp.	<i>Bjerkandera</i> sp. R111	MT757835
	99,83	MH486977.1	<i>Bjerkandera adusta</i>		
R112	99,22	MH865306.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	<i>Purpureopenicillium</i> sp. R112	MT757836
	99,22	NR_166039.1	<i>Purpureocillium lavendulum</i>		
R113	98,33	HQ997372.1	<i>Metarhizium marquandii</i>	<i>Metarhizium</i> sp. R58	
R114	99,77	MH854923.1	<i>Metarhizium marquandii</i>	<i>Metarhizium</i> sp. R114	
R115	98,98	JN379352.1	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Metarhizium</i> sp. R17	
	98,56	MF681568.1	<i>Metarhizium robertsii</i>		
R116	99,39	KP670432.1	<i>Clonostachys rosea</i>	<i>Clonostachys</i> sp. R18	
R118	96,41	JN601149.1	<i>Microdochium</i> sp.	<i>Microdochium</i> sp. R118	MT757837
	94,28	NR_155372.1	<i>Microdochium colombiense</i>		
R121	98,57	MK208704.1	<i>Talaromyces pinophilus</i>	<i>Talaromyces</i> sp. R121	MT757838
	98,57	KY132156.1	<i>Chaetomium globosum</i>		
R123	99,43	KJ767117.1	<i>Humicola fuscoatra</i>	Isolado R123	
	99,04	MN121416.1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>		
R124	99,80	AB625589.1	<i>Humicola fuscoatra</i>	Isolado R124	
	99,38	NR_160164.1	<i>Condenascus tortuosus</i>		
R125	99,80	KX355743.1	<i>Colletotrichum truncatum</i>	<i>Colletotrichum</i> sp. R125	MT757839
	99,80	AB046608.1	<i>Colletotrichum dematium</i>		
R126	100	MK532912.1	<i>Curvularia lunata</i>	<i>Curvularia</i> sp. R126	MT757840

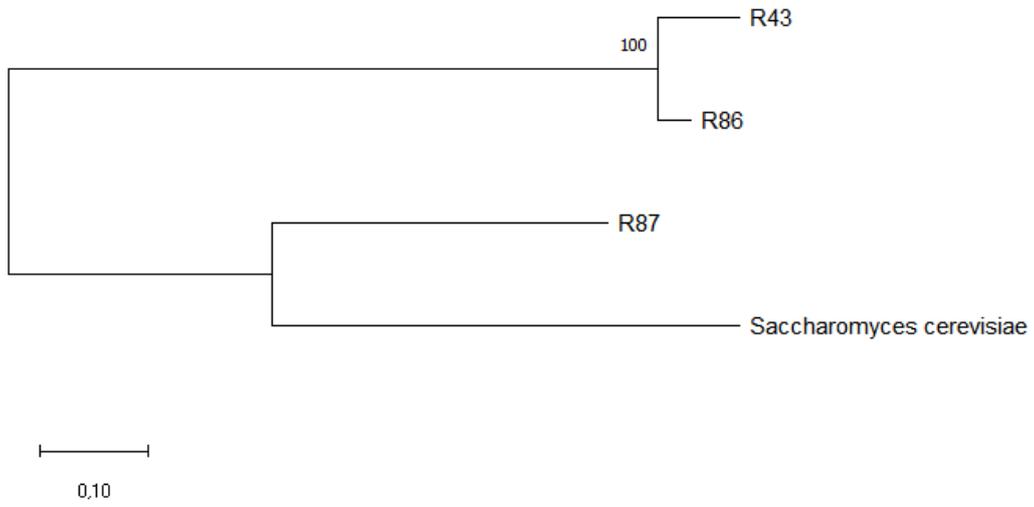
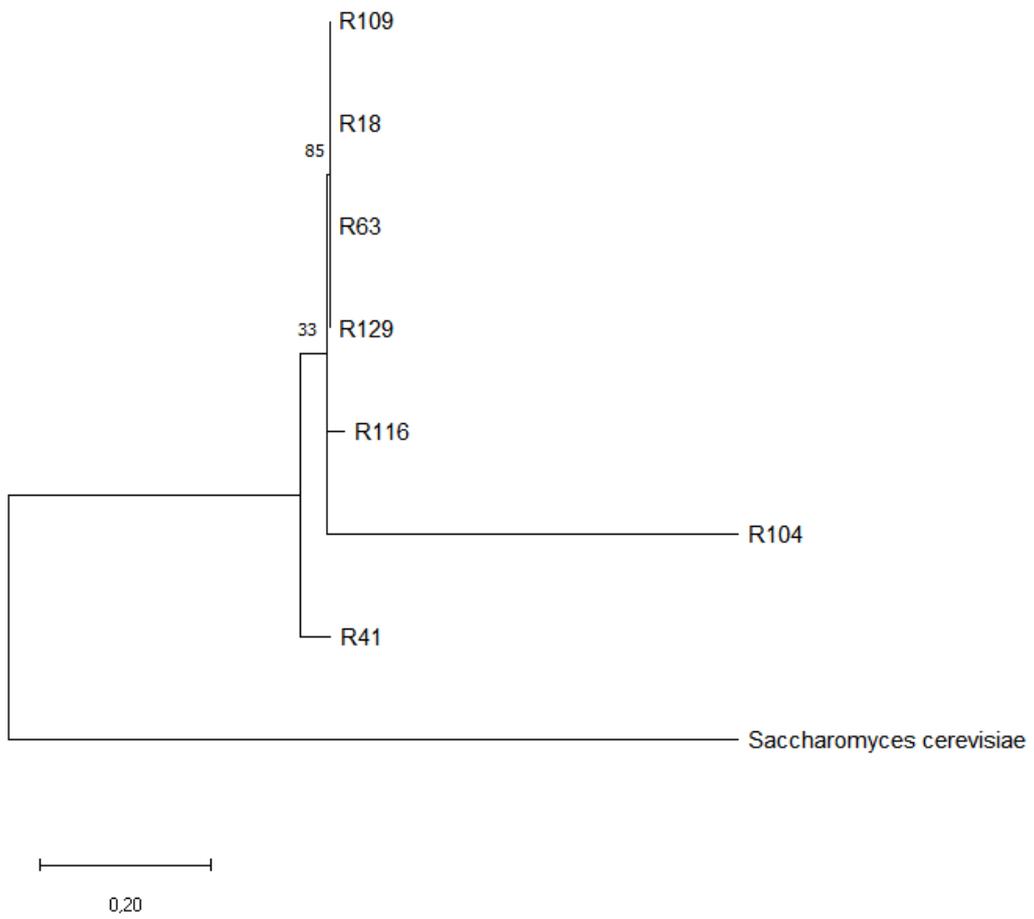
	99,82	KT933642.1	<i>Curvularia aerea</i>		
R127	97,20	KF056841.1	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Metarhizium</i> sp. R127	MT757841
R128	98,03	MN944724.1	<i>Talaromyces verruculosus</i>	<i>Talaromyces</i> sp. R46	
	98,03	MN006617.1	<i>Talaromyces pinophilus</i>		
R129	99,80	MH911376.1	<i>Clonostachys rosea</i>	<i>Clonostachys</i> sp. R18	
R130	99,07	MH858616.1	<i>Stilbella aciculosa</i>	Isolado R130	
	98,70	MT447501.1	<i>Volutella consors</i>		
R132	99,81	MK461183.1	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	<i>Purpureopenicillium</i> sp. R14	
R133				Isolado R133	
R134	98,62	KF056841.1	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Metarhizium</i> sp. R127	
R135	82,56	JN607094.1	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	Isolado R135	
R136	95,40	MT146479.1	<i>Chloridium virescens</i>	Isolado R136	
	95,05	AY618225.1	<i>Chaetosphaeria</i> sp.		
R137	99,60	MN892394.1	<i>Metarhizium robertsii</i>	<i>Metarhizium</i> sp. R17	
	99,60	MN078271.1	<i>Metarhizium anisopliae</i>		
R138	99,77	MT487838.1	<i>Epicoccum sorghinum</i>	<i>Epicoccum</i> sp. R06	
	99,77	MN215609.1	<i>Epicoccum laticollum</i>		

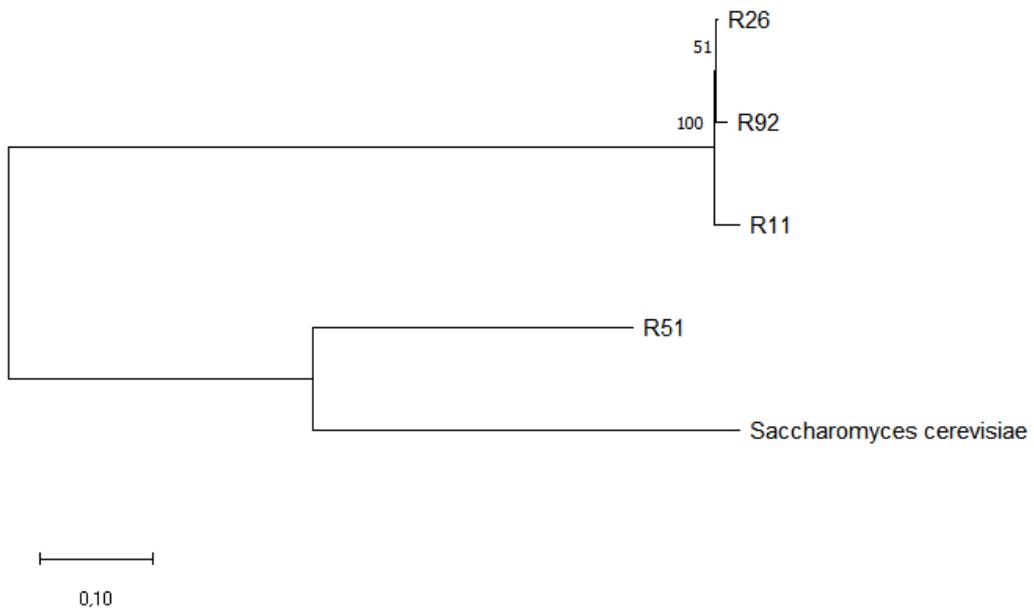
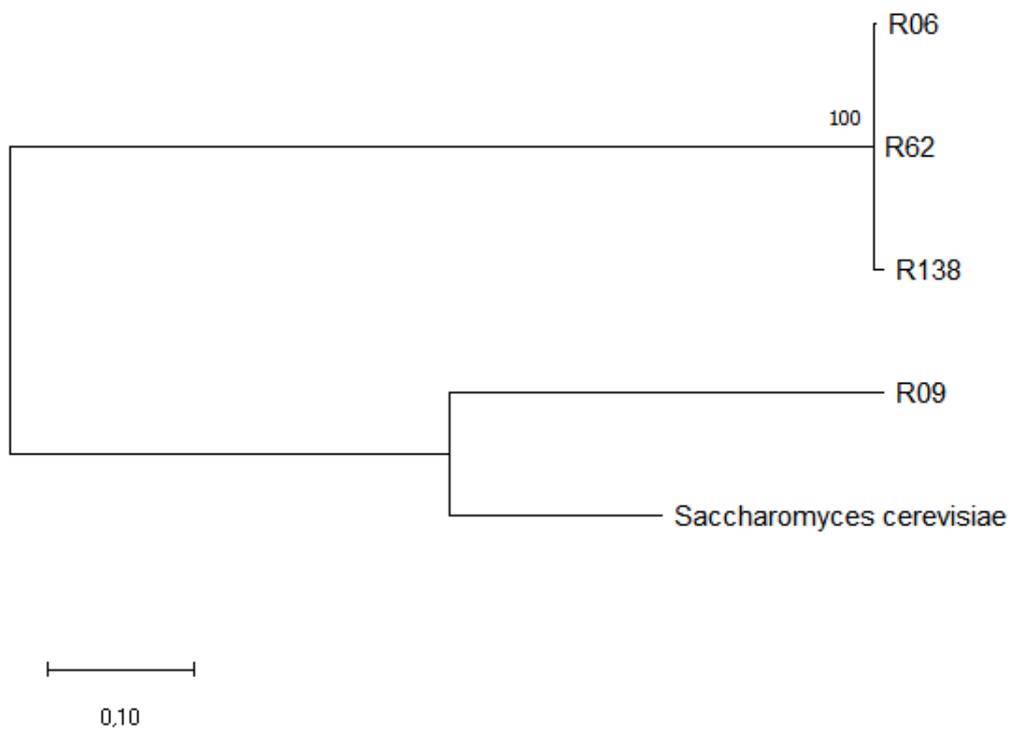
2. Cladograma das 109 morfoespécies para identificação de semelhança entre as morfoespécies classificados no mesmo gênero:

*Alternaria* sp.

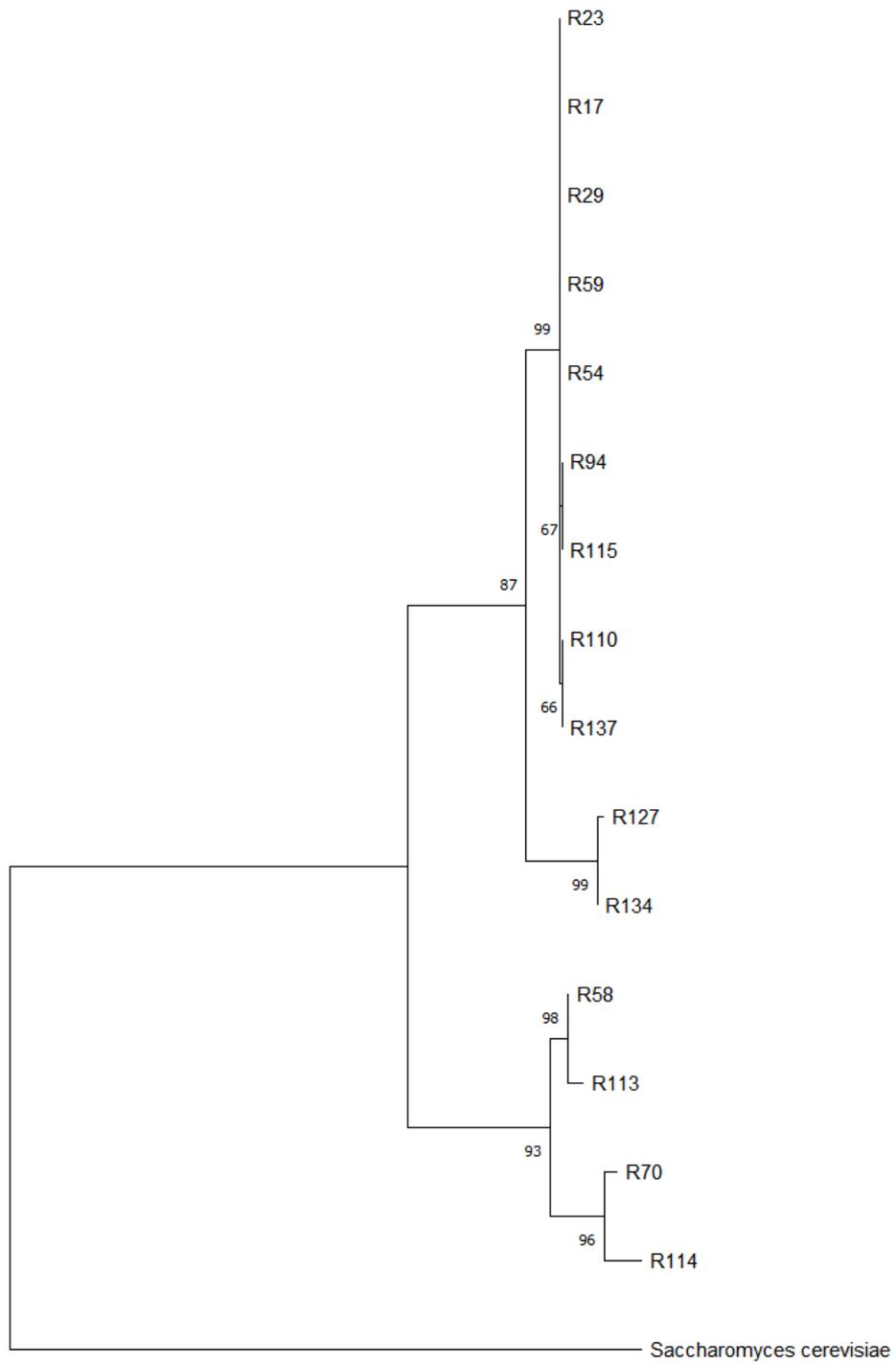


*Aspergillus* sp.*Bjerkandera* sp.

*Chloridium* sp.*Clonostachys* sp.

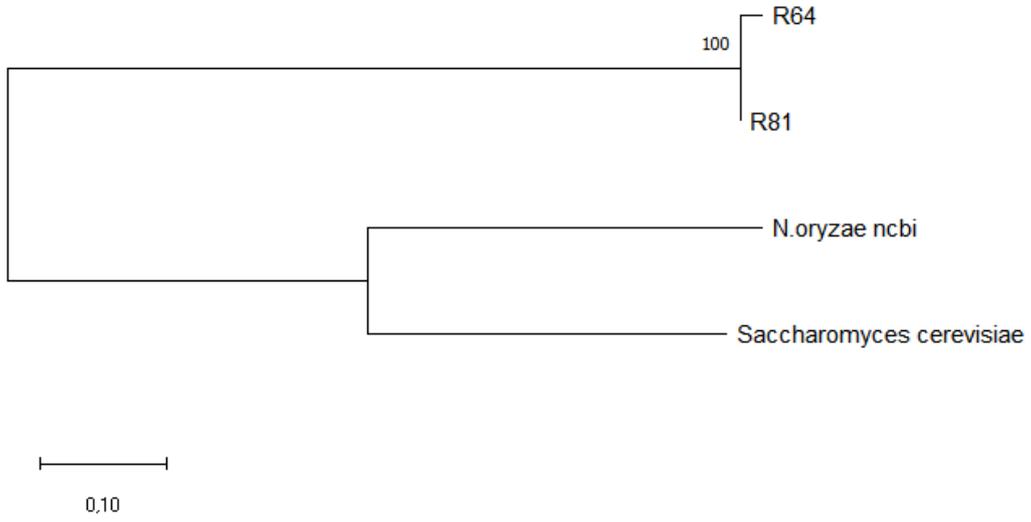
*Diaporthe* sp.*Epicoccum* sp.

*Metarhizium* sp.

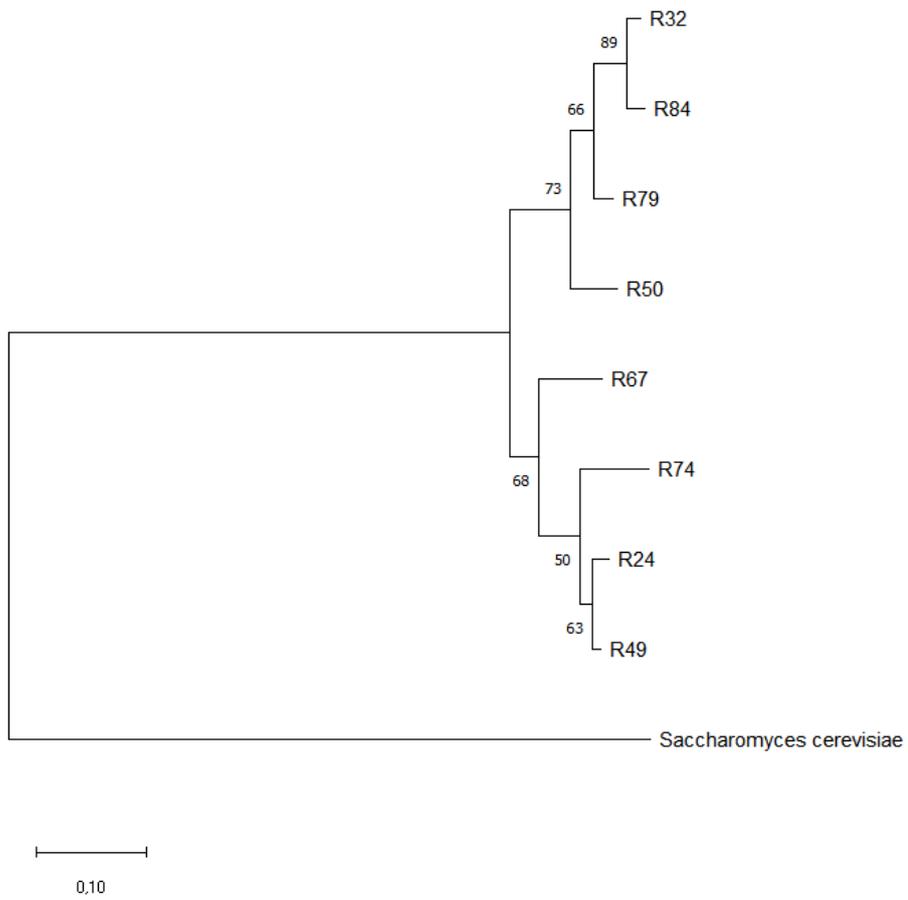


0.10

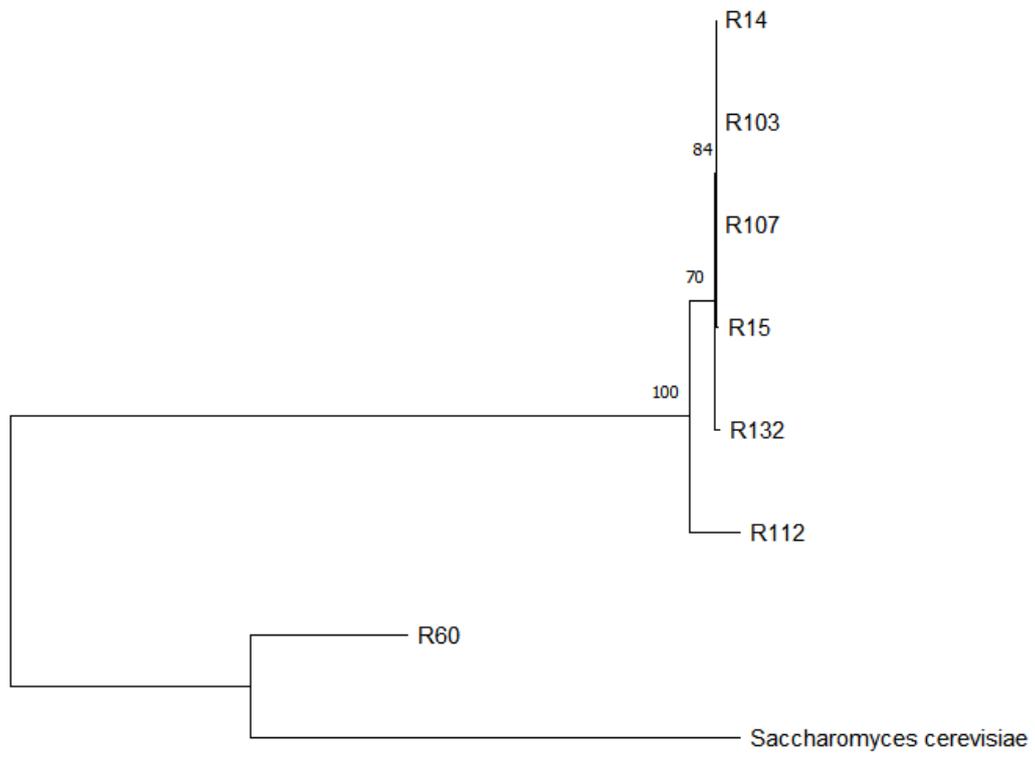
*Nigrospora* sp.



*Penicillium* sp.

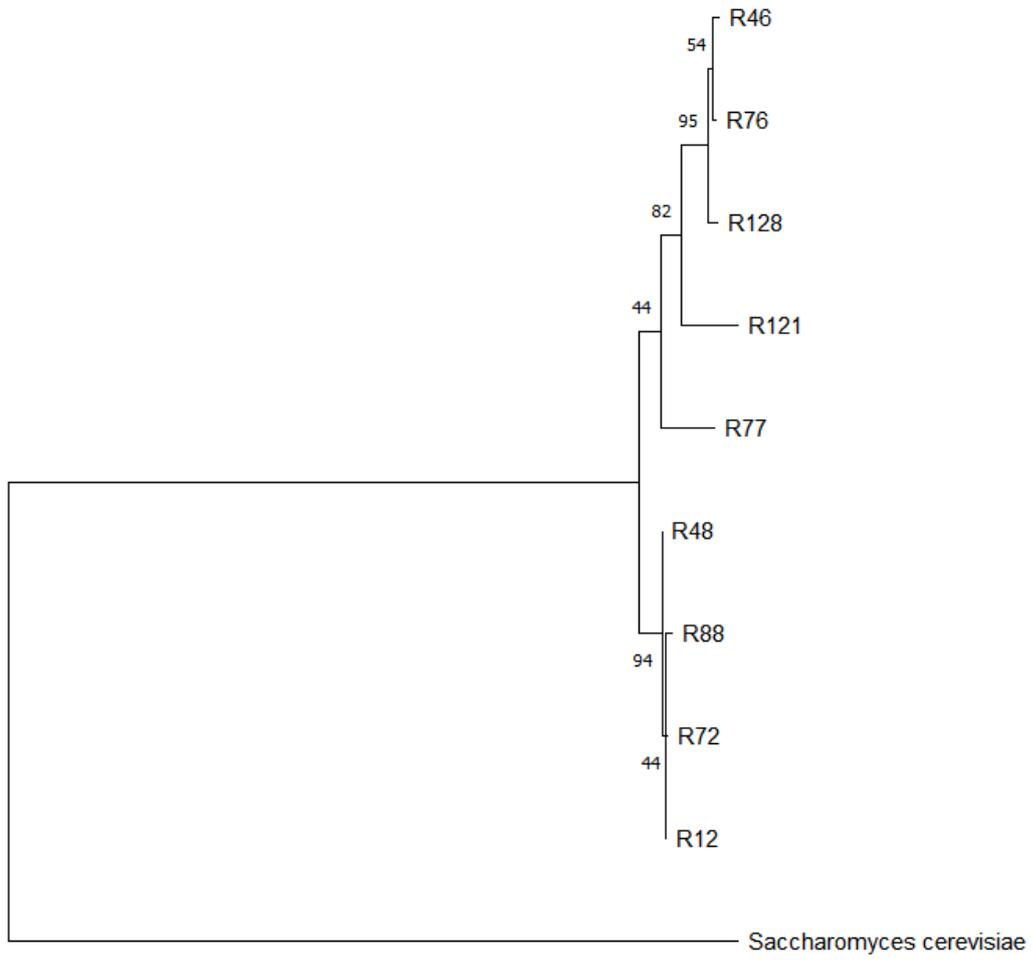


*Purpureocillium* sp.

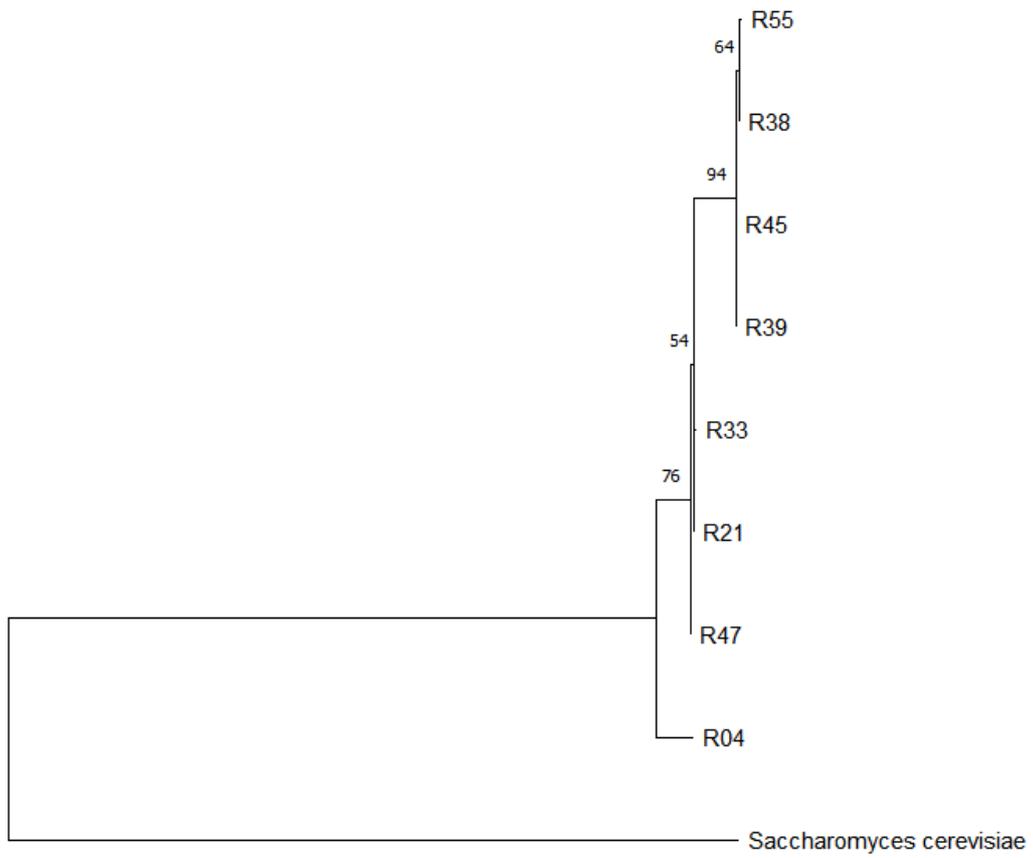


0.10

*Talaromyces* sp.



*Trichoderma* sp.



0,10