

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**  
**Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal**

**Luciana Monteiro Aguiar**

**PERFIL DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO E RIZODEGRADAÇÃO  
POR ESPÉCIES ARBÓREAS DE SÍTIOS COM RESÍDUOS DE HERBICIDAS  
LIXIVIÁVEIS**

DIAMANTINA - MG  
2019

**Luciana Monteiro Aguiar**

**PERFIL DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO E RIZODEGRADAÇÃO  
POR ESPÉCIES ARBÓREAS DE SÍTIOS COM RESÍDUOS DE HERBICIDAS  
LIXIVIÁVEIS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Produção Vegetal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, área de concentração Produção Vegetal, para obtenção do título de “Doutor”.

Orientador  
Prof. Dr. José Barbosa dos Santos

DIAMANTINA - MG  
2019

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A282p

Aguiar, Luciana Monteiro

Perfil da comunidade microbiana do solo e rizodegradação por espécies arbóreas de sítios com resíduos de herbicidas lixiviáveis / Luciana Monteiro Aguiar. 2019.

82 p. : il.

Orientador: José Barbosa dos Santos

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

1. Atrazine. 2. Clomazone. 3. Cromatografia. 4. T-RFLP. 5. Sequenciamento de nova geração. I. Santos, José Barbosa dos. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

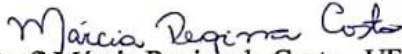
**CDD 577.57**

**PERFIL DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO E  
RIZODEGRADAÇÃO POR ESPÉCIES ARBÓREAS DE SÍTIOS COM  
RESÍDUOS DE HERBICIDAS LIXIVIÁVEIS**

**Luciana Monteiro Aguiar**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Produção Vegetal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA EM 15 / 03 / 2019

  
Prof.<sup>a</sup> Márcia Regina da Costa - UFVJM

  
Prof. Marcelo Luiz de Laia – UFVJM

  
Prof. Fábio Ribeiro Pires - UFES

  
Prof. José Barbosa dos Santos – UFVJM  
Presidente

DIAMANTINA  
2019

DEDICO

Aos meus pais e minha irmã,  
por todo apoio e amor incondicional.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por guiar, cuidar e me permitir chegar até aqui;

Aos meus pais, por acreditarem em mim e não medirem esforços para que eu realizasse meus sonhos;

A minha irmã, por todo apoio e conselhos precisos;

As minhas tias, por sempre se fazerem presentes;

Ao William, pelo companheirismo e paciência;

Ao professor José Barbosa dos Santos, pela oportunidade de realizar o mestrado e doutorado, pela confiança, orientação, incentivo, paciência e pelos valiosos ensinamentos;

A FAPEMIG e CAPES, pela concessão das bolsas no Brasil e exterior;

Às equipes do grupo de pesquisa INOVAHERB e Laboratório de Biotecnologia Vegetal, pelo suporte durante os experimentos, amizade e momentos de descontração;

Ao professor Marcelo Laia, por me receber no Laboratório de Biotecnologia Vegetal e me proporcionar os conhecimentos na área da biologia molecular;

À professora Marcia Costa, por sempre estar disponível para sanar minhas dúvidas;

Ao professor Eulogio Castro Galiano e aos colegas do Centro de Estudos Avançados em Energia e Meio Ambiente da Universidad de Jaen, por me receberem tão bem e pela ajuda nas análises;

À professora Janaína Melo do DCBIO, pela ajuda nas análises dos dados moleculares;

Ao Evander Alves Ferreira, por sempre estar disponível para ajudar;

A UFVJM, ao programa de Pós-graduação em Produção Vegetal e aos professores, pelo suporte e ensinamentos;

À banca, por aceitar o convite;

Aos amigos, pelo companheirismo, incentivo, carinho e amizade durante esses anos em Diamantina.

## RESUMO

LUCIANA MONTEIRO AGUIAR. **PERFIL DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO E RIZODEGRADAÇÃO POR ESPÉCIES ARBÓREAS DE SÍTIOS COM RESÍDUOS DE HERBICIDAS LIXIVIÁVEIS**. 2019. 82p. (Tese - Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

**Palavras-chave:** 2,4-D, atrazine, analisador de gases por infravermelho, clomazone, cromatografia, sequenciamento de nova geração, T-RFLP.

O uso de herbicidas na produção agrícola é uma prática comum que tem por objetivo manter a produção e garantir a demanda atual por alimentos. Embora esses compostos sejam benéficos para a produtividade, eventuais resíduos gerados são prejudiciais ao meio ambiente. A baixa sorção de algumas moléculas possibilita a lixiviação e deslocamento de áreas agrícolas a cursos hídricos. Nesse caso, o uso de espécies arbóreas, com capacidade de fitorremediação, impediria ou diminuiria a quantidade de herbicidas que, eventualmente, chegaria em locais à jusante de áreas agrícolas. Somado a isso, sabe-se que os microrganismos exercem papel importante na degradação de xenobióticos. Esse trabalho teve como objetivos avaliar a estrutura e diversidade das comunidades microbianas das rizosferas de *Caesalpinia ferrea*, *Calophyllum brasilienses*, *Eremanthus crotonoides*, *Inga striata*, *Kielmeyera latrophyton*, *Protium heptaphyllum*, *Richeria grandis* e *Tapirira guianensis* contaminados com atrazine, clomazone e 2,4-D; avaliar a tolerância e capacidade fitorremediadora de *E. crotonoides* e *I. striata* para atrazine e clomazone; e analisar o metagenoma das rizosferas de *C. ferrea* e *I. striata*, contaminadas com atrazine. A análise das comunidades microbianas foi realizada por meio do T-RFLP (Polimorfismo do comprimento de fragmentos terminais de restrição); os resíduos dos herbicidas no solo, após cultivo das espécies selecionadas, foram detectados por cromatografia líquida e espectrometria de massas; a análise metagenômica pelo sequenciamento de nova geração. Em relação ao T-RFLP, a estrutura das comunidades de *Archaea*, *Bacteria* e *Fungi* das rizosferas das oito espécies vegetais não foi influenciada pelos herbicidas. O clomazone reduziu a diversidade de *Bacteria* dos solos rizosféricos de *P. heptaphyllum* e aumentou a diversidade de *Fungi* dos solos rizosféricos de *P. heptaphyllum* e *R. grandis*. O 2,4-D aumentou a diversidade de *Fungi* do solo rizosférico de *P. heptaphyllum*. Para análise de tolerância e resíduos, apesar da redução nas taxas das variáveis fisiológicas, *E. crotonoides* e *I. striata*

podem ser usadas em processos de fitorremediação de solos contaminados com atrazine e clomazone. Pela metagenômica, detectou-se, na rizosfera de *C. ferrea*, os genes *atzE* e *atzF* e, na rizosfera de *I. striata*, os genes *atzD*, *atzE* e *atzF*, responsáveis pela via inferior na rota de degradação do atrazine. Além disso, foram detectados microrganismos ainda não relatados como degradadores desse herbicida.



## ABSTRACT

**Key words:** 2,4-D, atrazine, clomazone, chromatography, infrared gas analyzer, new generation sequencing, T-RFLP

The use of herbicides in agricultural production is a common practice and aims to maintain production and guarantee the current demand for food. Although these compounds are beneficial for productivity, any waste generated is harmful to the environment. The low sorption of some molecules allows the leaching and displacement of agricultural areas to the water courses. In this case, the use of arboreal species, with phytoremediation capacity, would prevent or reduce the amount of herbicides that would, eventually, arrive at sites downstream of agricultural areas. In addition, microorganisms are important in degradation of xenobiotics. This objective of this study was evaluate the microbial communities structure and diversity of *Caesalpinia ferrea*, *Calophyllum brasilienses*, *Eremanthus crotonoides*, *Inga striata*, *Kielmeyera latrophyton*, *Protium heptaphyllum*, *Richeria grandis* e *Tapirira guianensis* rhizospheres, contaminated with atrazine, clomazone and 2,4-D; evaluate the tolerance and phytoremediative capacity of *E. crotonoides* and *I. striata* for atrazine and clomazone; analyze the metagenome of the rhizospheres of *C. ferrea* and *I. striata*, contaminated with atrazine. The analysis of microbial communities was performed by T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism); the herbicide residues in the soil, after cultivation of the species, were detected by liquid chromatography and mass spectrometry; the metagenomic analysis was performed by new generation sequencing. Regarding T-RFLP analysis, *Archaea*, *Bacteria* and *Fungi* communities structure of the rhizospheres was not influenced by the herbicides. Clomazone reduced the bacterial diversity of *P. heptaphyllum* rhizospheric soil and increased *Fungi* diversity of *P. heptaphyllum* e *R. grandis* rhizospheric soils. 2,4-D increased the *Fungi* diversity of *P. heptaphyllum* rhizospheric soil. For tolerance and residue analysis, despite the reduction in the rates of physiological variables, *E. crotonoides* and *I. striata* can be used in phytoremediation processes of soils contaminated with atrazine and clomazone. For metagenomics, the genes *atzE* and *atzF* were detected in rhizosphere of *C. ferrea* and the genes *atzD*, *atzE* and *atzF* were detected in rhizosphere of *I. striata*, responsible for the lower route of the atrazine degradation. In addition, microorganisms not yet reported as atrazine degrading have been detected.

## LISTA DE FIGURAS

| Capítulo 1 |   | Pág. |
|------------|---|------|
| Figura 1   | Ordenação multidimensional não-métrica (NMDS) de <i>Archaea</i> , <i>Bacteria</i> e <i>Fungi</i> de solos rizosféricos de espécies arbóreas contaminados ou não por atrazine, clomazone e 2,4-D | 29   |
| Capítulo 2 |   | Pág. |
| Figura 1   | Taxa fotossintética de <i>E. crotonoides</i> e <i>I. striata</i> em solos contaminados com diferentes doses de atrazine e clomazone   | 49   |
| Figura 2   | Taxa de CO <sub>2</sub> consumido por <i>E. crotonoides</i> e <i>I. striata</i> em solos contaminados com diferentes doses de atrazine e clomazone  | 49   |
| Figura 3   | Condutância estomática e transpiração de <i>E. crotonoides</i> and <i>I. striata</i> em solos contaminados com clomazone  | 50   |
| Figura 4   | Resíduos de atrazine e clomazone (mg/kg) em amostras de solo sem cultivo e solos rizosféricos de <i>E. crotonoides</i> e <i>I. striata</i> .  | 50   |
| Capítulo 3 |   | Pág. |
| Figura 1   | Diagrama de Venn dos genes dos rizosféricos de <i>C. ferrea</i> e <i>I. striata</i>   | 67   |
| Figura 2   | Abundância de espécies dos solos rizosféricos de <i>I. striata</i> e <i>C. ferrea</i>   | 68   |
| Figura 3   | Abundância de espécies em nível de gênero nos solos rizosféricos de <i>I. striata</i> e <i>C. ferrea</i> .  | 68   |
| Figura 4   | Microrganismos e seus genes de degradação de atrazine detectados em solo rizosférico de <i>I. striata</i>   | 69   |
| Figura 5   | Anotação de função “Metabolismo” pelo banco de dados “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)”   | 70   |

- Figura 6 Rota de degradação do atrazine adaptado do KEGG pathway map contendo os genes e microrganismos correspondentes encontrados nessa pesquisa, no solo rizosférico de *I. striata*. 71
- Figura 7 Rota de degradação do atrazine adaptado do KEGG pathway map contendo os genes e microrganismos correspondentes encontrados nessa pesquisa, no solo rizosférico de *C. ferrea*. 72

## LISTA DE TABELAS

| Capítulo 1 |   | Pág. |
|------------|---|------|
| Tabela 1   | Primers para amplificação dos grupos-alvo na comunidade microbiana utilizados para o PCR  | 14   |
| Tabela 2   | Análise de similaridade (ANOSIM) one -way, par a par, para as comunidades de <i>Archaea</i> nos solos rizosféricos de diferentes espécies vegetais (* p < 0,001)  | 18   |
| Tabela 3   | Análise de similaridade (ANOSIM) one -way, par a par, para as comunidades de <i>Bacteria</i> nos solos rizosféricos de diferentes espécies vegetais (* p < 0,001)   | 19   |
| Tabela 4   | Análise de similaridade (ANOSIM) one -way, par a par, para as comunidades de <i>Fungi</i> nos solos rizosféricos de diferentes espécies vegetais (* p < 0,001)  | 20   |
| Tabela 5   | Diversidade da comunidade dos solos rizosféricos de diferentes espécies arbóreas contaminadas ou não por herbicidas   | 21   |
| Capítulo 2 |   | Pág. |
| Tabela 1   | Composição físico-química do solo na camada de 0-20 cm utilizado no experimento   | 34   |
| Tabela 2   | Dose padrão, concentração final aplicada e fracionamento das subdoses em cada tratamento proposto para avaliação da capacidade remediadora de <i>Eremanthus crotonoides</i> e <i>Inga striata</i> em substrato contaminado com atrazine e clomazone | 34   |
| Tabela 3   | Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de resíduos de herbicidas nas amostras de solo no sistema UHPLC-MS/MS   | 36   |
| Capítulo 3 |   | Pág. |
| Tabela 1   | Genes associados à degradação de atrazine, sua proteína correspondente e o caminho de degradação  | 55   |
| Tabela 2   | Genes associados à degradação de atrazine detectados nos solos rizosféricos de <i>I. striata</i> e <i>C. ferrea</i>   | 58   |
| Tabela 3   | Microrganismos e seus genes de degradação de atrazine detectados em solo rizosférico de <i>I. striata</i>   | 59   |

Tabela 4 Microrganismos e seus genes de degradação de atrazine detectados em solo rizosférico *C. ferrea*

## SUMÁRIO

|  | Pág. |
|--|------|
| INTRODUÇÃO GERAL.....  | 13   |
| OBJETIVOS.....   | 20   |
| <br>   |      |
| CAPÍTULO 1. PERFIL MICROBIANO EM SOLOS RIZOSFÉRICOS DE ESPÉCIES ARBÓREAS CONTAMINADOS POR HERBICIDAS.....  | 21   |
| 1 INTRODUÇÃO.....  | 24   |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS.....  | 24   |
| 3 RESULTADOS.....  | 27   |
| 4 DISCUSSÃO.....   | 34   |
| 5 CONCLUSÃO.....   | 35   |
| <br>   |      |
| CAPÍTULO 2. FITORREMEDIAÇÃO E SENSIBILIDADE DE <i>Eremanthus crotonoides</i> E <i>Inga striata</i> EM SOLOS CONTAMINADOS COM ATRAZINE E CLOMAZONE..... | 41   |
| 1 INTRODUÇÃO.....  | 44   |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS.....  | 45   |
| 3 RESULTADOS.....  | 48   |
| 4 DISCUSSÃO.....   | 50   |
| 5 CONCLUSÃO.....   | 53   |
| <br>   |      |
| CAPÍTULO 3. METAGENÔNICA DE SOLOS RIZOSFÉRICOS CONTAMINADOS COM ATRAZINE.....  | 61   |
| 1 INTRODUÇÃO.....  | 64   |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS.....  | 65   |
| 3 RESULTADOS.....  | 67   |
| 4 DISCUSSÃO.....   | 72   |
| 5 CONCLUSÃO.....   | 78   |
| <br>   |      |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS .....  | 94   |

## INTRODUÇÃO GERAL

Mais de 76 milhões de hectares, em 2017, foram destinados à produção agrícola no Brasil (Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias - GCEA/IBGE, 2018) e quase US\$ 9 bilhões gastos em pesticidas, sendo os herbicidas responsáveis por aproximadamente US\$ 3,1 bilhões (Sindiveg, 2018). Apesar da necessidade, a inobservância da correta tecnologia de aplicação, ou mesmo o comportamento de algumas moléculas no solo, comprometem o meio ambiente, como, por exemplo, por meio da contaminação de organismos não alvos (Pereira et al., 2009; Matozzo et al., 2018), deriva (Smith et al., 2017), escoamento superficial (Nachimuthu et al., 2016; Tayeb et al., 2017) e lixiviação (Azcarate et al., 2015; Hall et al., 2015; El-Nahhal & Hamdona, 2017). Essa última, é caracterizada pelo deslocamento das moléculas do produto químico no perfil do solo (Curran, 2016), fazendo com que, em contato com o lençol freático, atinjam ecossistemas à jusante de áreas agrícolas.

O Brasil possui 7,8% de sua área ocupada com atividades agrícolas e, dentre as áreas de pastagens nativas ou implantadas, 75% estão degradadas e podem ser recuperadas para produção de alimentos, fibras e energia (Embrapa Territorial, 2019). O uso eficiente dos solos, com rotação de cultivos ao longo do ano, depende do adequado preparo e rotação de produtos sanitários para evitar o aumento de pragas, doenças e plantas daninhas (Cordeiro et al., 2017; Duhatschek et al., 2018; Kumar et al., 2018). Em especial, no caso dos herbicidas, além do maior problema de ordem econômica - resistência de plantas daninhas - observa-se que produtos com efeito residual podem afetar a adequada rotação de culturas numa mesma área (moléculas de maior sorção) ou atingir sítios não alvo (moléculas menos sorvidas) (El-Nahhal & Hamdona, 2017; Hasenbein et al., 2017; Van Hoesel et al., 2017).

Diante disso, a utilização de técnicas sustentáveis, de baixo valor e fácil aplicação, devem ser valorizadas. Proposta inovadora como resposta aos problemas com resíduos de herbicidas é a fitorremediação, que visa a utilização de plantas e sua microbiota associada para remoção de compostos tóxicos ao meio ambiente (Cunningham et al., 1996). Em alguns países, muitos estudos abordam o uso de “faixas vegetativas”, que consiste no uso de vegetação permanente em faixas de terras, projetadas para interceptar poluentes (Burguet et al., 2018; Salah et al., 2018). No Brasil, a fitorremediação é, principalmente, aplicada para conter metais pesados (Mahar et al., 2016; Sarwar et al., 2017) e, de forma recente, estudada para herbicidas com características de maior adsorção, utilizando plantas herbáceas (Braga et al., 2016; Souza

et al., 2017; Alves et al., 2018). No caso dos herbicidas lixiviáveis, os estudos baseiam-se na utilização de espécies arbóreas, principalmente, na região das zonas ripárias. As matas ciliares podem melhorar as condições ecológicas de águas poluídas por práticas agrícolas (Novoa et al., 2018; Turunen et al., 2019). Para herbicidas, o mecanismo mais utilizado é o de rizodegradação. Na rizodegradação, também conhecida como fitoestimulação, a região da rizosfera é amplamente influenciada pelas raízes que, ao liberar exsudados, estimulam a proliferação microbiana, tornando um solo com maior riqueza e diversidade em relação a uma região não rizosférica (Eevers et al., 2017).

A microbiota do solo exerce papel fundamental na degradação de compostos (Diaz et al., 2016; Singh & Singh, 2016; Moorman, 2018). Plantas e microrganismos, agindo simultaneamente, poderiam acelerar o processo de degradação. Locais à jusante de áreas agrícolas, sobretudo margens de rios, revegetadas com espécies arbóreas nativas, com capacidade de remediação, e que se associam a microrganismos com poder de degradação, poderiam minimizar a quantidade do contaminante que, eventualmente, chegaria a esses ecossistemas. Para acessar essa comunidade microbiana, utiliza-se da metagenômica, que visa o estudo das comunidades microbianas, a partir da análise de DNA, diretamente de amostras ambientais (Bagg et al., 2014; Lindgreen et al., 2016). Essa abordagem, aliada a bioinformática, nos permite conhecer quais microrganismos estão, de fato, envolvidos no processo de degradação (Escobar-Zepeda et al., 2015; Aguiar-Pulido et al., 2016; Olson et al., 2017).

O Cerrado e a Mata Atlântica estão entre os maiores biomas do Brasil, apresentam grande biodiversidade e possuem cerca de 13 e 19 mil espécies vegetais catalogadas, respectivamente (MMA, 2016). No entanto, são os biomas que mais se deteriorizaram devido a ações antrópicas (Amaral et al., 2017; Bueno et al., 2018), principalmente advindas da agricultura (Hunk et al., 2015; da Rocha et al., 2017). Diante disso, a grande diversidade de espécies vegetais oriundas desses biomas sugere a possibilidade de representantes que possam contribuir para sua recuperação.

Esse trabalho foi dividido em três capítulos. No primeiro, a diversidade e estrutura das rizosferas de *Caesalpinia ferrea*, *Calophyllum brasilienses*, *Eremanthus crotonoides*, *Inga striata*, *Kielmeyera latrophyton*, *Protium heptaphyllum*, *Richeria grandis* e *Tapirira guianensis* contaminadas com resíduos de atrazine, clomazone e 2,4-D foram avaliadas. A partir de análises de crescimento e fisiologia e resultados de outras pesquisas em fitoremediação com essas espécies, *Eremanthus crotonoides* e *Inga striata* tiveram novo estudo em solo contaminado com



atrazine e clomazone, com seus resíduos no solo avaliados por cromatografia. Em relação ao potencial fitorremediador do atrazine, as espécies mais promissoras, *Inga striata* e *Caesalpinia ferrea* tiveram a rizosfera analisada por metagenômica. O comportamento das plantas em meios contaminados pelos produtos e um melhor entendimento das etapas de remediação, bem como identificação de novos microrganismos associados à degradação, foram verificados com êxito.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar-Pulido, V., Huang, W., Suarez-Ulloa, V., Cickovski, T., Mathee, K., & Narasimhan, G. 2016. Metagenomics, Metatranscriptomics, and Metabolomics Approaches for Microbiome Analysis. Supplementary Issue: Bioinformatics Methods and Applications for Big Metagenomics Data. *Evolutionary Bioinformatics*, 12 (S1): 5-16.

Alves, C., Galon, L., Kaizer, R.R., Holz, C.M., Winter, F.L., Basso, F.J.M., Perin, G.F., Forte, C.T. 2018. Selection of Species with Soil Phytoremediation Potential After the Application of Protox-Inhibiting Herbicides. *Planta Daninha*, 36: e018174765.

Amaral, A.G., Munhoz, C.B., Walter, B.M., Aguirre-Gutiérrez, J., & Raes, N. 2017. Richness pattern and phytogeography of the Cerrado herb–shrub flora and implications for conservation. *Journal of Vegetation Science*, 28 (4): 848-858.

Azcarate, M.P., Montoya, J.C., & Koskinen, W.C. 2015. Sorption, desorption and leaching potential of sulfonylurea herbicides in Argentinean soils. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 50 (4): 229-237.

Braga, R.R., dos Santos, J.B., Zanuncio, J.C., Bibiano, C.S., Ferreira, E.A., Oliveira, M.C., Silva, D.V., Serrão, J.E. 2016. Effect of growing *Brachiria brizantha* on phytoremediation of picloram under different pH environments. *Ecological Engineering*, 94 (9): 102-106.

Bueno, M. L., de Oliveira-Filho, A. T., Pantara, V., Pott, A., & Damasceno-Junior, G. A. 2018. Flora Arbórea do Cerrado de Mato Grosso do Sul. *Iheringia. Série Botânica*, 73 (1): 53-64.

Burguet, M., Guzmán, G., Luna, E., Taguas, E.V., Gómez, J.A. 2018. Evaluation of disruption of sediment connectivity and herbicide transport across a slope by grass strips using a magnetic iron oxide tracer. *Soil and Tillage Research*, 180 (6): 268-281.

Cordeiro, L.A.M., Vilela, L., Marchão, R.L., Kluthcouski, J., Júnior, G.B.M. 2017. Integração lavoura-pecuária e integração lavoura-pecuária-floresta: estratégias para intensificação sustentável do uso do solo. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, 32 (1/2): 15-53.

Cunningham, S.D., Anderson, T.A., Schwab, A.P., Hsu, F.C. 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Advances in Agronomy*, 56 (1): 55-114.

Curran, W.S. 2016. Persistence of herbicides in soil. *Crops & Soils*, 49 (5): 16.

Diaz, J.M.C., Delgado-Moreno, L., Núñez, R., Nogales, R., & Romero, E. 2016. Enhancing pesticide degradation using indigenous microorganisms isolated under high pesticide load in bioremediation systems with vermicomposts. *Bioresource technology*, 214 (16): 234-241.

da Rocha Junior, P.R., Andrade, F.V., de Sá Mendonça, E., Donagemma, G.K., Fernandes, R. B. A., Bhattharai, R., Kalita, P. K. 2017. Soil, water, and nutrient losses from management alternatives for degraded pasture in Brazilian Atlantic Rainforest biome. *Science of the Total Environment*, 583 (9): 53-63.

Duhatschek, E., Santos, L.A., & Faria, C.M.D.R. 2018. Sensibilidade de isolados de *Phakopsora pachyrhizi* provenientes da região do centro oeste do Paraná a fungicidas. *Summa Phytopathologica*, 44 (2): 193-194.

Eevers, N., White, J.C., Vangronsveld, J., Weyens, N. 2017. Bio- and phytoremediation of pesticide-contaminated environments: a review. *Advances in Botanical Research*, 83 (3): 277-318.

El-Nahhal, Y., & Hamdona, N. 2017. Adsorption, leaching and phytotoxicity of some herbicides as single and mixtures to some crops. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*, 22 (1): 17-25.

Embrapa Territorial. Satélites de Monitoramento. Campinas, 2018. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/satelites-de-monitoramento> >. Acesso: 20.02.19

Escobar-Zepeda, A., Vera-Ponce de León, A., Sanchez-Flores, A. 2015. The road to metagenomics: from microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. *Frontiers in Genetics*, 6: 348.

Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias - GCEA/IBGE, 2018. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – LSPA. Disponível em <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistemico-da-producao-agricola.html?=&t=resultados> Acesso: 11.09. 2018.

Hall, K.E., Ray, C., Ki, S.J., Spokas, K.A., Koskinen, W.C. 2015. Pesticide sorption and leaching potential on three Hawaiian soils. *Journal of Environmental Management*, 159 (13): 227-234.

Hasenbein, S., Peralta, J., Lawler, S.P., Connon, R.E. 2017. Environmentally relevant concentrations of herbicides impact non-target species at multiple sublethal endpoints. *Science of the Total Environment*, 607 (26): 733-743.

Hunke, P., Mueller, E. N., Schröder, B., Zeilhofer, P. 2015. The Brazilian Cerrado: assessment of water and soil degradation in catchments under intensive agricultural use. *Ecohydrology*, 8 (6): 1154-1180.

Kumar, D., Jayaswal, D., Jangra, A., Mishra, K. K., & Yadav, S. 2018. Recent approaches for herbicide resistance management in weeds: A review. *International Journal of Chemical Studies*, 6 (4): 2844-2850.

Mahar, A., Wang, P., Ali, A., Awasthi, M. K., Lahori, A. H., Wang, Q., Li, R., Zhang, Z. 2016. Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126 (4): 111-121.

Matozzo, V., Fabrello, J., Masiero, L., Ferraccioli, F., Finos, L., Pastore, P., Gangi, I.M.D., Bogialli, S. 2018. Ecotoxicological risk assessment for the herbicide glyphosate to non-target aquatic species: A case study with the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Pollution*, 233 (2): 623-632.

MMA, 2016. Brasil: 5º relatório nacional para a Convenção Sobre Diversidade Biológica / Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas; Coordenador Carlos Alberto de Mattos Scaramuzza. Brasília: MMA.

Moorman, T.B. 2018. Pesticide degradation by soil microorganisms: environmental, ecological, and management effects. *Soil Biology: Effects on Soil Quality*, 127-172.

- Nachimuthu, G., Halpin, N.V., Bell, M.J. 2016. Effect of sugarcane cropping systems on herbicide losses in surface runoff. *Science of the Total Environment*, 557 (17): 773-784.
- Novoa, J., Chokmani, K., Lhissou, R. 2018. A novel index for assessment of riparian strip efficiency in agricultural landscapes using high spatial resolution satellite imagery. *Science of The Total Environment*, 644 (26): 1439-1451.
- Olson, N. D., Treangen, T. J., Hill, C. M., Cepeda-Espinoza, V., Ghurye, J., Koren, S., & Pop, M. 2017. Metagenomic assembly through the lens of validation: recent advances in assessing and improving the quality of genomes assembled from metagenomes. *Briefings in Bioinformatics*, 1-11.
- Pereira, J. L., Antunes, S. C., Castro, B. B., Marques, C. R., Gonçalves, A. M., Gonçalves, F., & Pereira, R. 2009. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. *Ecotoxicology*, 18 (4): 455-463.
- Salah, I., Kavian, A., Roushan, M.H., Jafarian, Z. 2018. The efficiency of vegetative buffer strips in runoff quality and quantity control. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 15 (4): 811-820.
- Sarwar, N., Imran, M., Shaheen, M. R., Ishaque, W., Kamran, M. A., Matloob, A., Rehim, A., & Hussain, S. 2017. Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives. *Chemosphere*, 171 (6): 710-721.
- Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa vegetal – SINDIVEG, 2018. Comercialização de defensivos agrícolas no Brasil.
- Souza, W. M. D., Guimarães, F. A. R., Souza, M. D. F., Silva, D. V., Melo, C. A. D. 2017. Rhizospheric activity of phytoremediation species in soil contaminated with picloram. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 47 (2): 127-133.
- Singh, B., & Singh, K. 2016. Microbial degradation of herbicides. *Critical Reviews in Microbiology*, 42 (2): 245-261.
- Smith, H.C., Ferrell, J.A., Webster, T.M., & Fernandez, J.V. 2017. Cotton response to simulated auxin herbicide drift using standard and ultra-low carrier volumes. *Weed Technology*, 31 (1): 1-9.

Tayeb, M. A., Ismail, B. S., Khairiatul-Mardiana, J. 2017. Runoff of the herbicides triclopyr and glufosinate ammonium from oil palm plantation soil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189 (11): 551.

Turunen, J., Markkula, J., Rajakallio, M., Aroviita, J. 2018. Riparian forests mitigate harmful ecological effects of agricultural diffuse pollution in medium-sized streams. *Science of The Total Environment*, 649 (4): 495-503.

Van Hoesel, W., Tiefenbacher, A., König, N., Dorn, V. M., Hagenguth, J. F., Prah, U., Widhalm, et al. 2017. Single and combined effects of pesticide seed dressings and herbicides on earthworms, soil microorganisms, and litter decomposition. *Frontiers in Plant Science*, 8: 215.

## 1 OBJETIVOS

### Geral

Avaliar o perfil da comunidade microbiana rizosférica e a capacidade fitorremediadora de espécies arbóreas em solos contaminados por herbicidas.

### Específicos

- Avaliar a influência dos herbicidas atrazine, clomazone e 2,4-D na estrutura e diversidade da comunidade microbiana dos solos rizosféricos de *Caesalpinia ferrea*, *Calophyllum brasilienses*, *Eremanthus crotonoides*, *Inga striata*, *Kielmeyera latrophyton*, *Protium heptaphyllum*, *Richeria grandis* e *Tapirira guianensis*;
- Avaliar a tolerância e capacidade fitorremediadora de *E. crotonoides* e *I. striata* aos herbicidas atrazine e clomazone;
- Análise taxonômica, funcional e detecção de genes associados à degradação de atrazine nos solos rizosféricos de *C. ferrea* e *I. striata*.

**CAPÍTULO 1**

**PERFIL MICROBIANO DE SOLOS RIZOSFÉRICOS DE ESPÉCIES ARBÓREAS  
CONTAMINADOS POR HERBICIDAS**

## RESUMO

**Palavras-chave:** 2,4-D, atrazine, clomazone, diversidade microbiana, estrutura da comunidade microbiana, T-RFLP.

A produção agrícola depende de herbicidas, mas o uso excessivo e inadequado desses compostos impacta negativamente o meio ambiente. O objetivo foi avaliar a influência de herbicidas na estrutura e diversidade da comunidade microbiana de solos rizosféricos. A rizosfera de mudas de *Caesalpinia ferrea*, *Calophyllum brasilienses*, *Eremanthus crotonoides*, *Inga striata*, *Kielmeyera latrophyton*, *Protium heptaphyllum*, *Richeria grandis* e *Tapirira guianensis* foi avaliada em solos contaminados com os herbicidas atrazine, clomazone e 2,4-D. Aos 80 dias após a primeira aplicação dos herbicidas, foram coletadas amostras de solos da região das rizosferas das espécies arbóreas e realizada a análise microbiana por T-RFLP (polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição terminais). A estrutura das comunidades de *Archaea*, *Bacteria* e *Fungi* não foi influenciada pelos herbicidas. O herbicida clomazone reduziu a diversidade de *Bacteria* do solo rizosférico de *P. heptaphyllum*. O herbicida clomazone aumentou a diversidade de *Fungi* dos solos rizosféricos de *P. heptaphyllum* e *R. grandis*. O herbicida 2,4-D aumentou a diversidade de *Fungi* do solo rizosférico de *P. heptaphyllum*.



## ABSTRACT

**Keywords:** 2,4-D, atrazine, clomazone, microbial diversity; microbial community structure, T-RFLP.

Agricultural production depends on herbicides, but the excessive and inappropriate use of these compounds negatively impacts the environment. The objective was to evaluate the influence of herbicides on the structure and diversity of the microbial community of rhizospheric soils. The rhizosphere of *Caesalpinia ferrea*, *Calophyllum brasilienses*, *Eremanthus crotonoides*, *Inga striata*, *Kielmeyera latrophyton*, *Protium heptaphyllum*, *Richeria grandis* and *Tapirira guianensis* was evaluated in soils contaminated with the atrazine, clomazone and 2,4-D herbicides. 80 days after the first application of the herbicides, soils samples were collected from the rhizosphere region of the tree species and the microbial analysis was performed by T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism). The structure of *Archaea*, *Bacteria* and *Fungi* communities was not influenced by herbicides. Clomazone reduced *Bacteria* diversity of *P. heptaphyllum* rhizospheric soil. Clomazone increased *Fungi* diversity of *P. heptaphyllum* and *R. grandis* rhizospheric soils. 2,4-D increased *Fungi* diversity of *P. heptaphyllum* rhizospheric soil.

## 1 INTRODUÇÃO

Os pesticidas são substâncias utilizadas a fim de prevenir ou repelir o aparecimento de pragas. Geralmente são utilizados na agricultura para melhorar o rendimento das culturas e, dentre os principais grupos, estão os fungicidas, os inseticidas e os herbicidas (Velasco & Capanema, 2006). No entanto, o uso destes produtos pode ocasionar efeitos negativos ao meio ambiente, como contaminação de organismos não-alvos, lixiviação e alteração na dinâmica das comunidades microbianas na região da rizosfera (Newman et al, 2016; Hasenbein et al, 2017, Matozzo et al, 2018).

A rizosfera é uma região que envolve o solo e as raízes das plantas, detém de uma alta diversidade, compreendendo todos os domínios da vida microbiana, e está diretamente relacionada aos ciclos biogeoquímicos, degradação de matéria orgânica e estrutura do solo (Wang et al., 2011; White et al., 2017). Entretanto, alguns herbicidas podem influenciar na quantidade e funcionalidade de uma comunidade microbiana (Saha et al, 2012). O estudo desses microrganismos por meio dos métodos tradicionais, dependentes de cultivo, impossibilita o acesso de toda a comunidade, visto que muitos deles não se desenvolvem em meios de culturas artificiais (Nesme et al., 2016). Diante disso, estudos de biologia molecular, por meio da análise das sequências dos genes 16rRNA e ITS, que permite a detecção de microrganismos, visando estrutura e diversidade da comunidade, são cada vez mais utilizados (Joo et al., 2010; Cong et al., 2013; Cycon et al. 2013). Esses métodos são alternativas seguras para se estudar a dinâmica das comunidades no solo (Dorst et al, 2014; Naleppa & Markiewicz, 2017). Uma técnica bastante utilizada para esse fim é o polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição terminais (T-RFLP) (Liu et al, 1997), que consiste no uso de oligonucleotídeos marcados com fluorescência para os grupos de microrganismos. Os produtos de PCR gerados são submetidos a enzimas de restrição e separados por eletroforese capilar (von Felten et al., 2011).

Neste contexto, esse trabalho teve como objetivo avaliar o perfil da comunidade microbiana em solos rizosféricos contaminados com os herbicidas atrazine, clomazone e 2,4-D, por meio da técnica de T-RFLP.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Experimento em casa de vegetação

O experimento foi realizado na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, campus JK, Diamantina – MG. Mudanças de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *leiostachya* Benth., *Calophyllum brasiliense* Cambess., *Eremanthus crotonoides* (DC.) Sch.Bip., *Inga striata* Benth., *Kielmeyera lathrophyton* Saddi, *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March., *Richeria grandis* Vahl e *Tapirira guianensis* (Aubl.), com aproximadamente 6 meses, foram cultivadas em Latossolo Vermelho distrófico com textura arenosa (56,2% de areia, 36% de argila e 7,8% de silte). O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação, em delineamento de blocos ao acaso, cujos tratamentos foram constituídos por fatorial 9 x 4, tendo, como primeiro fator, oito espécies arbóreas e solo sem vegetação e, o segundo, os herbicidas atrazine, clomazone e 2,4-D e o controle (solo sem herbicida). A unidade experimental foi constituída por uma muda por vaso de 10L, com quatro repetições cada.

A dose total estabelecida para cada herbicida (5 kg ha<sup>-1</sup>, 4 L ha<sup>-1</sup> e 1,61 kg ha<sup>-1</sup>, respectivamente para atrazine, clomazone e 2,4-D) foi fracionada em seis aplicações (uma a cada dez dias), depositada sobre pratos de contenção do vaso utilizando pipeta de precisão, simulando um lençol freático contaminado (Cabral et al., 2017). Cada aplicação foi correspondente a 1/3 da dose comercialmente recomendada (MAPA, 2018), portanto, o total aplicado foi equivalente a duas vezes a dose média informada pelo fabricante.

Amostras de solo da rizosfera das plantas foram coletadas utilizando um cano de PVC, 2 cm de distância do caule, aos 80 dias após a primeira aplicação dos herbicidas e mantidas a - 80° C, para posterior processamento para a análise de T-RFLP.

## 2.2 Experimento em laboratório

As análises foram realizadas no Laboratório de Genética e Biotecnologia da UFVJM, pertencente ao Departamento de Engenharia Florestal.

O DNA total contido nas amostras de solo foi extraído com o auxílio do PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA), seguindo o protocolo do fabricante com uma modificação, que incluiu a utilização de 0,5 g de solo. A quantidade do DNA foi verificada em gel de agarose a 0,8% em tampão TAE 1X. Para verificar a concentração de DNA nas amostras, as mesmas foram submetidas ao espectrofotômetro, conforme instruções do fabricante. Verificada a integridade, concentração e qualidade das amostras de DNA, foi realizada uma diluição padronizando-as para concentração de 25 µg.

Para a amplificação do DNA, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores marcados com fluorescência apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - oligonucleotídeos para amplificação dos grupos-alvo na comunidade microbiana utilizados para PCR.

| Primer       | Sequência de 5'<br>para 3' | Gene alvo      | Grupo           | Referência                   |
|--------------|----------------------------|----------------|-----------------|------------------------------|
| 63f          | AGGCCTAACA<br>CATGCAAGTC   | 16S rRNA       | <i>Bacteria</i> | Marchesi et al.,<br>(1998)   |
| 1087r (NED)  | CTCGTTGCGG<br>GACTTACCCC   | 16S rRNA       | <i>Bacteria</i> | Hauben et al.,<br>(1997)     |
| Ar3f         | TTCCGGTTGA<br>TCCTGCCGGA   | 16S rRNA       | <i>Archaea</i>  | Giovannoni et<br>al., (1988) |
| Ar927r (HEX) | CCCGCCAATTC<br>CTTTAAGTTTC | 16S rRNA       | <i>Archaea</i>  | Jurgens et al.,<br>(1997)    |
| ITS1f(6-FAM) | CTTGGTCATTTA<br>GAGGAAGTAA | ITS (18S rRNA) | <i>Fungi</i>    | Gardes & Bruns<br>(1993)     |
| ITS4r        | TCCTCCGCTT<br>ATTGATATGC   | ITS (18S rRNA) | <i>Fungi</i>    | White et al.,<br>(1990)      |

Foram realizadas mix de PCR- Multiplex. A mix de PCR foi constituída de: tampão de reação a 1 X, MgCl<sub>2</sub> a 2 mM, dNTP's a 200 µM de cada desoxinucleotídeo, iniciadores (63f (10 µM) a 200 nM, iniciador 1087R (10 µM) a 200 nM, iniciador ITS1F (20 µM) a 400 nM, iniciador ITS4 (20 µM) a 400 nM, iniciador Ar3f (20 µM) a 400 nM, iniciador Ar927 (20 µM) a 400 nM), enzima Taq polimerase a 2,5 u, 2 µL de DNA molde e água ultrapura para completar 50 µL de reação.

A amplificação do DNA foi realizada em termociclador automático (Biorad), conforme o seguinte programa: 5 minutos a 95 °C, seguido de 30 ciclos consistindo de desnaturação (30 segundos a 95 °C), anelamento (1 minuto a 55 °C) e extensão (1 minuto a 72 °C), e um passo de extensão final (10 minutos a 72 °C). O produto da amplificação (alíquota de 2 µL) foi verificado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 1X.

O produto da amplificação foi submetido à digestão enzimática utilizando a enzima de restrição *MspI*. A digestão foi conduzida em termociclador em um programa de 37 °C por 3 h, seguido de um período de inativação da enzima de 15 minutos a 95 °C.

Os produtos da digestão foram purificados com o QIAGEN – QIAquick PCR purification kit protocol, seguindo orientações do fabricante. Os produtos foram transferidos para placa de sequenciamento da seguinte maneira: 7,7 µL de formamida, 0,3 µL de LIZ 600 e 2 µL do produto de DNA gerado nas etapas anteriores e submetido a corridas de reações de genotipagem, no sequenciador automático com 96 capilares, ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California (CA)).

### 2.3 Análise estatística

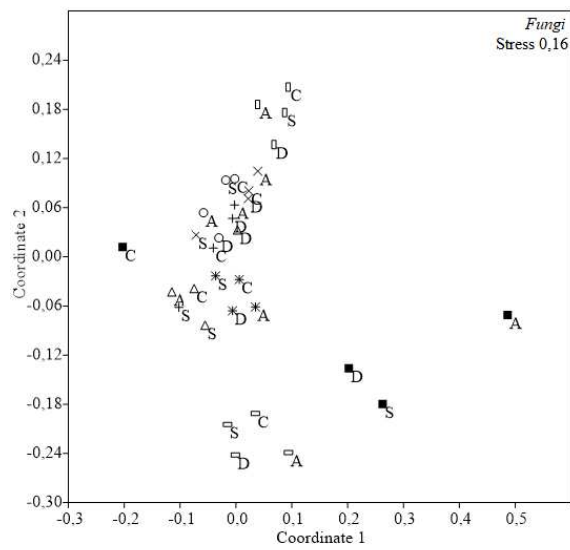
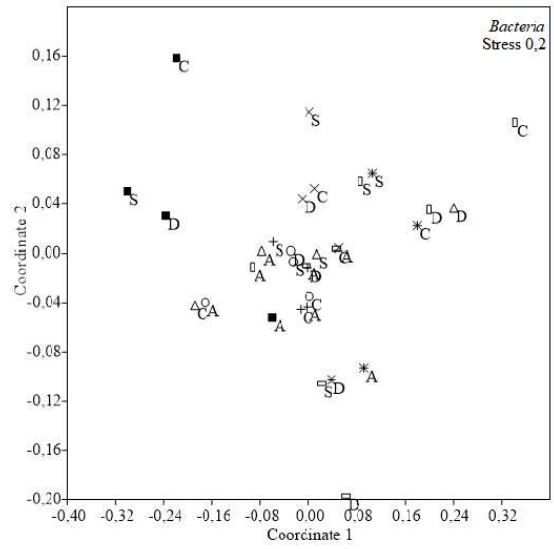
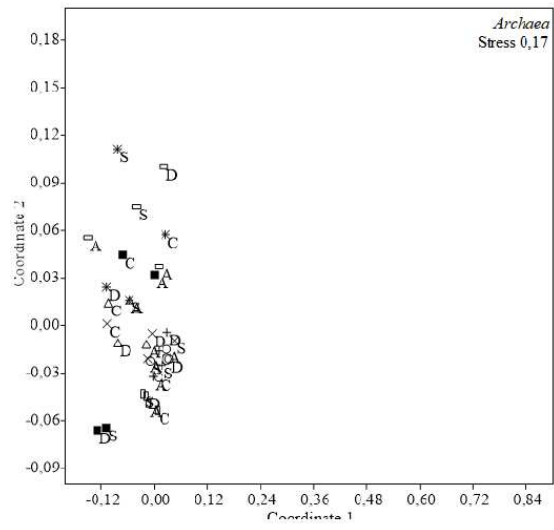
Os fragmentos detectados no software GeneMapper® v.4.0 (Applied Biosystems) foram analisados no programa T-REX (Culman et al., 2009). Em seguida, os dados foram exportados em planilha binária e ordenados por escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) (Clarck, 1993), representação 2D, usando matriz de similaridade de Bray-Curtis para análise de semelhanças (Culman et al., 2008). Diferenças na composição da comunidade microbiana entre as amostras foram testados usando o teste estatístico ANOSIM two-way e one-way (Clarck, 1993), 9999 permutações, usando medida de similaridade de Bray-Curtis. Valores de  $R > 0,75$  indicam separação total entre os grupos, 0,25 a 0,75, grupos separados, mas com sobreposição, e  $R < 0,25$ , grupos sem distinção (Clarke & Warwick, 1994). A análise multivariada de variância permutacional (PERMANOVA) também foi realizada para testar diferenças entre os tratamentos. Análises do teste ANOSIM one-way, quando significativos, foram submetidos à análise de porcentagem de similaridade (SIMPER) (Clarke & Warwick, 1994). A diversidade foi determinada pelo índice de Shannon ( $H'$ ) e submetida a análise de variância e, as médias, quando significativas, analisadas segundo teste de Tukey, com 5% de probabilidade de erro. As análises ANOSIM, PERMANOVA, SIMPER e Shannon ( $H'$ ) foram realizadas no programa Past, versão 3.04 (Hammer et al., 2001).

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Estrutura da comunidade microbiana

#### 3.1.1 Escalonamento multidimensional não métrico (NMDS)

As estruturas das comunidades das oito espécies vegetais, contaminadas ou não pelos herbicidas, são visualizadas em NMDS (Figura 1). A análise de NMDS dos perfis de T-RFLP das comunidades de *Archaea* dos solos rizosféricos, demonstra uma tendência de agrupamento de todos os tratamentos e sobreposições. Para *Bacteria*, o NMDS não demonstrou padrão de agrupamento segundo algum critério, mas apresentou sobreposições. Para *Fungi*, a análise de NMDS demonstrou uma tendência de agrupamento segundo o solo rizosférico, exceto para os solos rizosféricos de *C. ferrea*.



Solos rizoféricos: ■ *C. ferrea* \* *C. brasiliense* + *E. crotonoides* □ *I. striata* △ *K. latrophyton* × *P. heptaphyllum* □ *R. grandis* ○ *T. guianensis*  
Herbicidas: S (sem herbicida) A (atrazine) C (clomazone) D (2,4-D)

Figura 1: Ordenação multidimensional não-métrica (NMDS) de *Archaeae*, *Bacteria* e *Fungi* de solos rizosféricos de espécies arbóreas contaminados ou não por atrazine, clomazone e 2,4-D.

### 3.1.2 Análise de similaridade

O teste estatístico ANOSIM two-way para avaliar o efeito dos fatores (rizosfera das espécies vegetais e herbicidas) na estrutura das comunidades de *Archaea* foi significativo para o fator rizosfera ( $R_{\text{global}} = 0,05$  e  $p = 0,001$ ) e não significativo para o fator herbicidas ( $p > 0,005$ ). A análise PERMANOVA corroborou com os resultados do ANOSIM, com significância apenas para rizosferas ( $p = 0,00004$ ).

O teste ANOSIM one-way, par a par, para rizosferas, independente da presença dos herbicidas (Tabela 2), apresentou significância apenas entre a rizosfera de *C. ferrea* e *E. crotonoides* ( $R = 0,23$ ) e a rizosfera de *C. ferrea* e *R. grandis* ( $R = 0,24$ ). O teste ANOSIM one-way para herbicidas, em cada rizosfera, não apresentou significância ( $p > 0,05$ ).

Tabela 2: Análise de similaridade (ANOSIM) one-way, par a par, para as comunidades de *Archaea* nos solos rizosféricos de diferentes espécies vegetais (\*  $p < 0,001$ ).

| Solos rizosféricos | CF    | CB   | EC   | IS   | KL   | PH | RG   | TG |
|--------------------|-------|------|------|------|------|----|------|----|
| CF                 | -     |      |      |      |      |    |      |    |
| CB                 | 0,09  | -    |      |      |      |    |      |    |
| EC                 | 0,23* | 0,12 | -    |      |      |    |      |    |
| IS                 | 0,11  | 0,05 | 0,06 | -    |      |    |      |    |
| KL                 | 0,09  | 0    | 0,04 | 0,06 | -    |    |      |    |
| PH                 | 0,10  | 0    | 0,01 | 0,01 | 0    | -  |      |    |
| RG                 | 0,24* | 0,09 | 0,05 | 0,07 | 0,06 | 0  | -    |    |
| TG                 | 0,11  | 0    | 0,02 | 0,01 | 0    | 0  | 0,04 | -  |

CF: *C. ferrea*; CB: *C. brasiliensis*; EC: *E. crotonoides*; IS: *I. striata*; KL: *K. latrophyton*; PH: *P. heptaphyllum*; RG: *R. grandis*; TG: *T. guianensis*

O teste estatístico ANOSIM two-way para avaliar o efeito dos fatores (rizosfera das espécies vegetais e herbicidas) na estrutura das comunidades de *Bacteria* foi significativo para o fator rizosfera ( $R_{\text{global}} = 0,19$  e  $p = 0,0001$ ) e não significativo para herbicidas ( $p > 0,05$ ). O teste PERMANOVA corroborou com os resultados do ANOSIM, apresentando significância



apenas para rizosferas ( $p = 0,0001$ ). O stress do NMDS de *Bacteria* em 0,2 sugere uma representação mais fraca e difícil de interpretar (Boura et al., 2004; Bland et al., 2015): duas dimensões podem não ser suficientes para refletir as diferenças de forma precisa se a estrutura dos dados for complexa (Schütte et al., 2008); por esse motivo, verificou-se uma menor relação do gráfico com as análises estatísticas.

O teste ANOSIM one-way, par a par, para rizosferas, independente da presença dos herbicidas, apresentou significância para alguns pares de amostras (Tabela 3). A comunidade de *Bacteria* de *R. grandis* é a mais distinta de *C. ferrea* ( $R = 0,64$ ), *E. crotonoides* ( $R = 0,64$ ) e *T. guianensis* ( $R = 0,54$ ). O teste ANOSIM one-way para herbicidas em cada rizosfera não apresentou significância ( $p > 0,05$ ).

Tabela 3: Análise de similaridade (ANOSIM) one -way, par a par, para as comunidades de *Bacteria* nos solos rizosféricos de diferentes espécies vegetais (\*  $p < 0,001$ ).

| Solos rizosféricos | CF    | CB    | EC    | IS    | KL    | PH    | RG    | TG |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| CF                 | -     |       |       |       |       |       |       |    |
| CB                 | 0,22* | -     |       |       |       |       |       |    |
| EC                 | 0,35* | 0,22* | -     |       |       |       |       |    |
| IS                 | 0,10* | 0,07  | 0,10  | -     |       |       |       |    |
| KL                 | 0,10  | 0,03  | 0,10  | 0,09  | -     |       |       |    |
| PH                 | 0,06* | 0     | 0,06  | 0,03  | 0     | -     |       |    |
| RG                 | 0,64* | 0,38* | 0,64* | 0,42* | 0,45* | 0,30* | -     |    |
| TG                 | 0     | 0,12  | 0     | 0,05  | 0     | 0     | 0,54* | -  |

CF: *C. ferrea*; CB: *C. brasiliensis*; EC: *E. crotonoides*; IS: *I. striata*; KL: *K. latrophyton*; PH: *P. heptaphyllum*; RG: *R. grandis*; TG: *T. guianensis*

O teste estatístico ANOSIM two-way para avaliar o efeito dos fatores (rizosfera das espécies vegetais e herbicidas) na estrutura das comunidades de *Fungi* foi significativo para o fator rizosfera ( $R_{global} = 0,28$  e  $p = 0,0001$ ) e não significativo para o fator herbicidas ( $p > 0,05$ ). O teste PERMANOVA corroborou com ANOSIM, apresentando significância apenas para rizosferas ( $p = 0,0001$ ).

O teste ANOSIM one-way, par a par, para rizosferas, independente da presença dos herbicidas, apresentou significância para a maioria dos pares de amostras (Tabela 4). As comunidades microbianas rizosféricas que mais se diferiram foi a de *I. striata* com as de *C. brasiliense* (R = 0,53), *E. crotonoides* (R = 0,56) e *R. grandis* (R = 0,74).

O teste ANOSIM one-way para cada rizosfera apresentou significância apenas para o solo rizosférico de *C. ferrea* (R = 0,63 e p = 0,0008). Segundo a análise SIMPER, a comunidade do solo rizosférico de *C. ferrea* sem herbicida apresentou 67% de similaridade com a do solo contaminado com 2,4-D, 21% de similaridade com a do solo contaminado com atrazine e 0% de similaridade com a do solo contaminado com clomazone.

Tabela 4: Análise de similaridade (ANOSIM) one-way, par a par, para as comunidades de *Fungi* nos solos rizosféricos de diferentes espécies vegetais (\* p < 0,001).

| Solos rizosféricos | CF    | CB    | EC    | IS    | KL   | PH   | RG   | TG |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|----|
| CF                 | -     |       |       |       |      |      |      |    |
| CB                 | 0,34* | -     |       |       |      |      |      |    |
| EC                 | 0,45* | 0,11  | -     |       |      |      |      |    |
| IS                 | 0,42* | 0,53* | 0,56* | -     |      |      |      |    |
| KL                 | 0,19  | 0     | 0,12  | 0,43* | -    |      |      |    |
| PH                 | 0,35* | 0,20  | 0,04  | 0,58* | 0,16 | -    |      |    |
| RG                 | 0,24  | 0,48* | 0,35* | 0,74* | 0,42 | 0,06 | -    |    |
| TG                 | 0,08  | 0,17  | 0,10  | 0,44* | 0,11 | 0,01 | 0,06 | -  |

CF: *C. ferrea*; CB: *C. brasiliensis*; EC: *E. crotonoides*; IS: *I. striata*; KL: *K. latrophyton*; PH: *P. heptaphyllum*; RG: *R. grandis*; TG: *T. guianensis*

### 3.2 Diversidade da comunidade microbiana

A diversidade da comunidade de *Archaea* não foi influenciada pelos herbicidas. A diversidade da comunidade de *Bacteria* foi afetada negativamente no solo rizosférico de *P. heptaphyllum* contaminado com clomazone, e não diferiu dos tratamentos com atrazine e 2,4-D. A diversidade da comunidade de *Fungi* foi afetada no solo rizosférico de *P. heptaphyllum* e *R. grandis*, contaminados com 2,4-D, e no solo rizosférico de *P. heptaphyllum*, contaminado com clomazone, que apresentaram diversidade superior ao controle.

Tabela 5: Diversidade da comunidade dos solos rizosféricos de diferentes espécies arbóreas contaminadas ou não por herbicidas.

|  | Sem herbicida | Atrazine | 2,4-D  | Clomazone |
|--|---------------|----------|--------|-----------|
| <i>Archaea</i> <sup>n.s.</sup> (p> 0,05) |               |          |        |           |
| <i>Caesalpineia ferrea</i>               | 3,16          | 2,59     | 2,42   | 2,90      |
| <i>Calophyllum brasilienses</i>          | 2,36          | 2,56     | 2,75   | 2,52      |
| <i>Eremanthus crotonoides</i>            | 2,77          | 2,72     | 2,74   | 2,62      |
| <i>Inga striata</i>                      | 2,79          | 3,17     | 3,02   | 3,09      |
| <i>Kielmeyera latrophyton</i>            | 2,66          | 2,74     | 2,79   | 2,40      |
| <i>Protium hepthaphyllum</i>             | 2,48          | 2,37     | 2,90   | 2,62      |
| <i>Richeria grandis</i>                  | 2,05          | 2,72     | 2,51   | 2,54      |
| <i>Tapirira guianensis</i>               | 2,74          | 2,46     | 2,69   | 2,85      |
| CV (%)                                   | 26,6          |          |        |           |
| <i>Bacteria</i>                          |               |          |        |           |
| <i>Caesalpineia ferrea</i>               | 1,68a         | 1,62a    | 1,94a  | 1,61a     |
| <i>Calophyllum brasilienses</i>          | 1,97a         | 2,28a    | 2,39a  | 1,74a     |
| <i>Eremanthus crotonoides</i>            | 2,46a         | 2,42a    | 2,45a  | 2,62a     |
| <i>Inga striata</i>                      | 2,26a         | 2,10a    | 1,33a  | 1,99a     |
| <i>Kielmeyera latrophyton</i>            | 2,18a         | 1,62a    | 1,94a  | 1,61a     |
| <i>Protium hepthaphyllum</i>             | 2,55a         | 2,32ab   | 1,82ab | 1,47b     |
| <i>Richeria grandis</i>                  | 1,63a         | 1,79a    | 1,77a  | 1,83a     |
| <i>Tapirira guianensis</i>               | 2,60a         | 2,42a    | 2,34a  | 2,26a     |
| CV (%)                                   | 23,56         |          |        |           |
| <i>Fungi</i>                             |               |          |        |           |
| <i>Caesalpineia ferrea</i>               | 2,33a         | 2,29a    | 2,66a  | 2,13a     |
| <i>Calophyllum brasilienses</i>          | 1,58ab        | 2,32a    | 1,66ab | 0,79b     |
| <i>Eremanthus crotonoides</i>            | 2,58a         | 1,9a     | 2,25a  | 2,45a     |
| <i>Inga striata</i>                      | 2,32a         | 1,61a    | 2,24a  | 2,23a     |
| <i>Kielmeyera latrophyton</i>            | 2,19a         | 2,25a    | 1,93a  | 2,34a     |
| <i>Protium hepthaphyllum</i>             | 1,76b         | 2,36b    | 2,89a  | 2,83a     |
| <i>Richeria grandis</i>                  | 1,28b         | 1,06b    | 2,43a  | 0,84b     |
| <i>Tapirira guianensis</i>               | 2,01ab        | 1,54b    | 2,58a  | 1,92ab    |
| CV (%)                                   | 19,58         |          |        |           |

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro. <sup>n.s./</sup>: não significativo estatisticamente.

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Estrutura da comunidade microbiana

As comunidades de *Archaea* e *Bacteria* dos diferentes solos rizosféricos, contaminados ou não pelos herbicidas, são bastante similares, ou seja, não foram influenciadas pelas espécies vegetais cultivadas ou pelos herbicidas, demonstrando a não toxicidade dos herbicidas (Ding et al., 2017). Ausência de impacto na estrutura da comunidade microbiana também foi relatada na rizosfera de *Lolium perenne* e *Festuca arundinacea* durante a dissipação dos pesticidas atrazine, chlorpyrifos e iprodione e em solos agrícolas contaminados com ametryn e clomazone (Peters et al., 2014; Elgueta et al., 2017). Como a análise microbiana foi realizada 80 dias após a primeira aplicação dos herbicidas, não se sabe se, em um primeiro momento, as comunidades foram influenciadas e, após período de fitorremediação, se recuperaram. Isso pode ser aventado pois há registros de influência seguida de recuperação na estrutura de comunidades microbianas, após período de bio/fitorremediação, foi relatado para chlorimuron-ethyl e atrazine (Diez et al., 2018; Wang et al., 2018). Por outro lado, o atrazine, afetou as comunidades da rizosfera de *Pennisetum americanum* e de águas superficiais costeiras (Ariole & Benson, 2016; Cao et al., 2018) e 2,4-D e glifosate afetaram a estrutura da comunidade de bactérias fixadoras de nitrogênio após aplicação (Ding et al., 2017; Fan et al., 2017).

Para as comunidades de *Fungi*, a significância observada apenas para o fator rizosfera e os altos valores de R observados na análise de similaridade par a par, demonstram que a espécie vegetal foi determinante na estrutura da comunidade e não o produto químico, confirmando a importância do exsudado radicular das diferentes plantas para regular a estrutura da comunidade fúngica (Broeckling et al., 2008). As concentrações e constituintes dos exsudados podem diferir entre as espécies (El Amrani et al., 2015), fazendo com que a comunidade microbiana presente em solos cultivados com a mesma espécie vegetal, seja a mesma. Espécies diferentes podem selecionar comunidades diferentes, mesmo que pertencentes à mesma família, como relatado para *Trifolium pratense* e *Phaseolus vulgaris* cv. Tilla (Wieland et al., 2001). A diferença detectada nas comunidades de *Fungi* nos solos rizosféricos de *C. ferrea*, demonstra que os herbicidas, mesmo após o período adotado para fitorremediação, influenciaram a estrutura desse grupo de microrganismos, principalmente os solos

contaminados com atrazine e clomazone. Solos cultivados com *C. ferrea* apresentaram altas taxas de descontaminação dos herbicidas atrazine e clomazone (dados não apresentados), e é possível que a estrutura da comunidade tenha sido alterada pela proliferação de microrganismos degradadores desses herbicidas, que usaram os contaminantes como substrato (Singh & Singh, 2014; Diez et al., 2018).

#### 4.2 Diversidade da comunidade microbiana

A redução da diversidade de *Bacteria* nos solos rizosféricos de *P. heptaphyllum* demonstra que as bactérias presentes são sensíveis ao clomazone e foram inibidas (Tomco et al., 2013; Wang et al., 2018). Bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> foram inibidas quando contaminadas com clomazone (Du et al., 2018). O aumento da diversidade de *Fungi* dos solos rizosféricos de *R. grandis* contaminado com 2,4-D e *P. heptaphyllum* contaminado com 2,4-D e clomazone, sugere adaptação ou tolerância dos microrganismos aos herbicidas (Tortella et al., 2013), como em *Brachiaria decumbens* após aplicação de glyphosate (Damin et al., 2010) e *Medicago sativa* após aplicação de atrazine, agindo como indutores e potenciadores de crescimento microbiano (Cuadrado et al., 2010). Assim como observado para o solo rizosférico de *P. heptaphyllum*, a redução da diversidade bacteriana e aumento na abundância de fungos já foi relatada (Du et al., 2018). De acordo com esses autores isso se deve à adaptação gradual dos fungos ao estresse com clomazone. *Richeria grandis* e *P. heptaphyllum* apresentaram redução da fotossíntese quando contaminadas com clomazone e 2,4-D (Aguiar et al., 2018). Algumas plantas, em situações de estresse, como a presença do produto químico, podem aumentar a quantidade de exsudados e, conseqüentemente, aumentar as comunidades microbianas (Chaudhry et al., 2005), explicando assim o aumento da diversidade em solos rizosféricos com os herbicidas.

## 5 CONCLUSÃO

A estrutura das comunidades de *Archaea*, *Bacteria* e *Fungi* não foi influenciada pelos herbicidas. O herbicida clomazone reduziu a diversidade de *Bacteria* do solo rizosférico de *P. heptaphyllum* e aumentou a diversidade de *Fungi* dos solos rizosféricos de *P. heptaphyllum* e *R. grandis*. O herbicida 2,4-D aumentou a diversidade do solo rizosférico de *P. heptaphyllum*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, L.M., Santos, J.B., Ferreira, E.A., Cabral, C.M., Pereira, I.M., Barroso, G.M., Santos, N.M.C. 2018. Physiological characteristics of trees recommended for the phytoremediation of soils contaminated with herbicides. *Planta Daninha*, 36: e018177021.
- Ariole, C.N., & Benson, H. 2016. The effect of atrazine on microbial population and diversity in marine coastal surface water. *Nigerian Journal of Microbiology*, 30 (1): 3310-3315.
- Broeckling, C.D., Broz, A.K., Bergelson, J., Manter, D.K., Vivanco, J.M. 2008. Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. *Applied Environmental Microbiology*, 74 (3): 738-44.
- Cabral, C.M., Santos, J.B., Ferreira, E.A., Machado, V.M., Pereira, I.M., Silva, D.V., Souza, M.F. 2017. Tolerance to the herbicide clomazone and potential for changes of forest. *Bioscience Journal*, 33 (4): 897-904.
- Cao, B., Zhang, Y., Wang, Z., Li, M., Yang, F., Jiang, D., & Jiang, Z. 2018. Insight into the variation of bacterial structure in atrazine-contaminated soil regulating by potential phytoremediator: *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. *Frontiers in Microbiology*, 9: 864.
- Chaudhry, Q., Blom-Zandstra, M., Gupta, S., Joner, E. 2005. Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environmental and Science Pollution Research*, 12 (1): 34-48.
- Clarke, K.R. 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, 18 (1): 117-143.
- Clarke, K.R. & Warwick, R.M. 1994. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. Natural Environment Research Council, U.K. 144 pp.
- Cong, L.V.X., Huang, R.L., Chen, F., Zhang, W., Rao, P., NI, L. 2013. Bacterial community dynamics during the traditional brewing of Wuyi Hong Qu glutinous rice wine as determined by culture-independent methods. *Food Control*, 34 (2): 300-306.
- Cuadrado, V., Merini, L., & Giuliotti, A.M. 2010. Phytostimulation of atrazine degradation by alfalfa (*Medicago sativa*, L.) extracts and exudates. *Journal of Biotechnology*, 150: 251.
- Culman, S.W., Bukowski, R., Gauch, H.G., Cadillo-Quiroz, H., Buckley, D.H. 2009. T-REX: Software for the processing and analysis of T-RFLP data. *BMC Bioinformatics*, 10:171.

- Culman, S.W., Gauch, H.G., Blackwood, C.B., & Thies, J.E. 2008. Analysis of T-RFLP data using analysis of variance and ordination methods: a comparative study. *Journal of Microbiological Methods*, 75 (1): 55-63.
- Cycoń, M., Markowicz, A., & Piotrowska-Seget, Z. 2013. Structural and functional diversity of bacterial community in soil treated with the herbicide napropamide estimated by the DGGE, CLPP and r/K-strategy approaches. *Applied Soil Ecology*, 72: 242-250.
- Damin, V., Trivelin, P.C.O., Carvalho, S.J.P., Moraes, M.F., & Barbosa, T.G. 2010. Herbicide application increases nitrogen ( $^{15}\text{N}$ ) exudation and root detachment of *Brachiaria decumbens* Stapf. *Plant and Soil*, 334 (1-2): 511–519.
- Diez, M.C., Leiva, B., Gallardo, F. 2018. Novel insights in biopurification system for dissipation of a pesticide mixture in repeated applications. *Environmental and Science Pollution Research*, 25: 21440–21450.
- Ding, H., Zhang, J., Fang, Y., Zheng, X., Zhang, Y., Chen, D. 2017. Impact of herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid butyl ester on soil nitrogen-transforming bacterial populations in two soils. *International Journal of Agriculture and Biology*, 19 (4): 812 -816.
- Du, P., Wu, X., Xu, J., Dong, F., Liu, X., Zhang, Y., & Zheng, Y. 2018. Clomazone influence soil microbial community and soil nitrogen cycling. *Science of The Total Environment*, 644: 475-485.
- El Amrani, A., Dumas, A.S., Wick, L.Y., Yergeau, E., Berthome, R. 2015. “Omics” insights into PAH degradation toward improved green remediation biotechnologies. *Environmental and Science Technology*, 49: 11281–11291.
- Elgueta, S., Correa, A., Campo, M., Gallardo, F., Karpouzas, D., & Diez, M.C. 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*, 52 (9): 651-657.
- Fan, L., Feng, Y., Weaver, D.B., Delaney D.P., Wehtje G.R., Wang, G., Singh, B., Singh, K. 2017. Glyphosate effects on symbiotic nitrogen fixation in glyphosate-resistant soybean. *Applied Soil Ecology*, 121: 11-19.

- Gardes, M., & Bruns, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2 (2): 113-118.
- Giovannoni, S.J., DeLong, E.F., Olsen, G.J., Pace, N.R. 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *Journal of Bacteriology*, 170 (2): 720-726.
- Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistic software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*, 4 (1): 1-9.
- Hauben, L., Vauterin, L., Swings, J., Moore, E.R.B. 1997. Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47 (2): 328-335.
- Hasenbein, S., Peralta, J., Lawler, S.P., & Connon, R.E. 2017. Environmentally relevant concentrations of herbicides impact non-target species at multiple sublethal endpoints. *Science of the Total Environment*, 607: 733-743.
- Joo, S., Lee, S.R., & Park, S. 2010. Monitoring of phytoplankton community structure using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). *Journal of Microbiological Methods*, 81 (1): 61-68.
- Jurgens, G., Lindström, K., & Saano, A. 1997. Novel group within the kingdom Crenarchaeota from boreal forest soil. *Applied Environmental Microbiology*, 63 (2): 803-805.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H. 1997. Forney characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology Journal*, 63 (11): 4516-4522.
- MAPA - Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2018. Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons) Acesso: 27.05. 2018.
- Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., Wade, W.G. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*, 64 (2): 795-799.
- Matozzo, V., Fabrello, J., Masiero, L., Ferraccioli, F., Finos, L., Pastore, P., Gangi, I.M.D., Bogialli, S. 2018. Ecotoxicological risk assessment for the herbicide glyphosate to non-target



aquatic species: A case study with the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Pollution*, 233 (2): 623-632.

Nalepa, B., Markiewicz, L.H. 2017. PCR-DGGE markers for qualitative profiling of microbiota in raw milk and ripened cheeses. *LWT - Food Science and Technology*, 84 (10): 168-174.

Nesme, J., Achouak, W., Agathos, S. N., Bailey, M., Baldrian, P., Brunel, D., Fostegard, A., et al. 2016. Back to the Future of Soil Metagenomics. *Frontiers in Microbiology*, 7:73.

Newman, M. M., Hoilett, N., Lorenz, N., Dick, R. P., Liles, M. R., Ramsier, C., Kloepper, J. W. 2016. Glyphosate effects on soil rhizosphere-associated bacterial communities. *Science of the Total Environment*, 543: 155-160.

Peters L.P., Carvalho G., Martins P.F., Dourado M.N., Vilhena M.B., Pileggi M., Azavedo, R.A. 2014. Differential responses of the antioxidant system of ametryn and clomazone tolerant bacteria. *PLoS ONE*, 9 (11): e112271.

Saha, S., Dutta, D., Karmakar, R., & Ray, D. P. 2012. Structure–toxicity relationship of chloroacetanilide herbicides: relative impact on soil microorganisms. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34 (2): 307-314.

Singh, B. & Singh, K. 2014. Microbial degradation of herbicides. *Critical Reviews in Microbiology*, 42 (2): 245-261.

Tomco, P.L., Holmes, W.E., Tjeerdema, R.S. 2013. Biodegradation of clomazone in a california rice field soil: carbon allocation and community effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (11): 2618–2624.

Tortella, G.R., Mella-Herrera, R.A., Sousa, D.Z., Rubilar, O., Acuña, J.J., Briceño, G., Diez, M.C. 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*, 260 (17): 459-67.

van Dorst, J., Bissett, A., Palmer, A.S., Brown, M., Snape, I., Stark, J.S., ... Ferrari, B.C. 2014. Community fingerprinting in a sequencing world. *FEMS Microbiology Ecology*, 89 (2): 316-330.

Velasco, L.O.M.D. & Capanema, L.X.D.L. 2006. O setor de agroquímicos. BNDES Setorial, 24: 69-96.

von Felten, A., Meyer, J. B., Défago, G., Maurhofer, M. 2011. Novel T-RFLP method to investigate six main groups of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing pseudomonads in environmental samples. *Journal of Microbiological Methods*, 84 (3): 379-387.

Wang, J., Li, X., Li, X., Wang, H., Su, Z., Wang, X., Zhang, H. 2018. Dynamic changes in microbial communities during the bioremediation of herbicide (chlorimuron-ethyl and atrazine) contaminated soils by combined degrading bacteria. *PLoS ONE*, 13 (4): e0194753.

Wieland, G†., Neumann R., Backhaus, H. 2001. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development. *Applied Environmental Microbiology Journal*, 67 (12): 5849-5854.

White III, R. A., Rivas-Ubach, A., Borkum, M. I., Köberl, M., Bilbao, A., Colby, S. M., Hoyt, D.W., et al. 2017. The state of rhizospheric science in the era of multi-omics: A practical guide to omics technologies. *Rhizosphere*, 3: 212-221.

White, T.J. 1990. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal genes. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 315-22.

## **CAPÍTULO 2**

### **FITORREMEDIAÇÃO E FISIOLOGIA DE *Eremanthus crotonoides* E *Inga striata* EM SOLOS CONTAMINADOS COM ATRAZINE E CLOMAZONE**

## RESUMO

**Palavras-chave:** CO<sub>2</sub> consumido, condutância estomática, fotossíntese, transpiração, resíduos de herbicidas

As moléculas de atrazine e clomazone possuem características que lhes conferem potencial de contaminação ambiental, sobretudo dos recursos hídricos. A descontaminação por fitorremediação em áreas adjacentes a cursos d'água, impediria ou diminuiria a quantidade daqueles produtos que chegariam a esses ecossistemas. Diante disso, objetivou-se com esse trabalho avaliar o potencial remediador e a sensibilidade fisiológica das espécies *Eremanthus crotonoides* e *Inga striata*, em solos contaminados com os herbicidas atrazine e clomazone. Foram avaliados fotossíntese, CO<sub>2</sub> consumido, condutância estomática e transpiração de *E. crotonoides* e *I. striata*, cultivadas em solos contaminados com diferentes concentrações, correspondentes a 0, 0,5, 1 e 2 vezes a dose comercial recomendada para atrazine e clomazone. Os resíduos dos herbicidas, após cultivo das espécies, foram detectados por cromatografia (UHPLC-MS/MS - ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry). *Eremanthus crotonoides* e *I. striata* reduziram suas taxas de fotossíntese e CO<sub>2</sub> consumido em solos contaminados por atrazine e clomazone. *Inga striata* diminuiu a condutância estomática e transpiração em solo contaminado com clomazone. Os resíduos de atrazine e clomazone foram diminuídos após cultivo de *E. crotonoides* e *I. striata*. Apesar da redução nas taxas das variáveis fisiológicas, *E. crotonoides* e *I. striata* podem ser usadas em processos de fitorremediação de solos com resíduos de atrazine e clomazone.

## ABSTRACT

**Keywords:** CO<sub>2</sub> consumed, herbicidal residues, stomatal conductance, transpiration, photosynthesis

The atrazine and clomazone molecules have potential to contaminate environments, especially water resources. Phytoremediation in adjacent areas to watercourses can prevent or reduce the amount of these products reaching these ecosystems. The objective was to evaluate the remedial potential and the physiological sensitivity of *Eremanthus crotonoides* (DC.) Sch. Bip and *Inga striata* Benth to atrazine and clomazone in soils contaminated with 0.0, 0.5, 1.0 and 2.0 times the recommended commercial dose of these herbicides. The photosynthesis, CO<sub>2</sub> consumed, stomatal conductance and transpiration of *E. crotonoides* and *I. striata*, in soils contaminated with atrazine and clomazone, were evaluated. The herbicide residues were detected by ultra-highperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) 30 days after the last herbicides application. The photosynthesis rate and CO<sub>2</sub> consumed by *E. crotonoides* and *I. striata* were lower in soils contaminated by atrazine and clomazone. *Inga striata* had lower stomatal conductance and transpiration in soil contaminated with clomazone. *Eremanthus crotonoides* and *I. striata* reduced the residues of these herbicides. Atrazine and clomazone reduced the physiological variables of *E. crotonoides* and *I. striata* but these plants phytoremediate soils contaminated with these herbicides.

## 1 INTRODUÇÃO

O atrazine (2-chloro-4-(ethylamino)-6-(isopropylamino)-s-triazine) é um herbicida bastante utilizado no Brasil e, em 2017, foram produzidos mais de 19 bilhões do seu ingrediente ativo (MAPA, 2018). Apesar de ser bastante popular no mundo, existe uma preocupação com seus efeitos nos ecossistemas e na saúde humana (Murphy & Coats, 2011). É aplicado em pré ou pós-emergência das plantas infestantes, principalmente, nas culturas de cana-de-açúcar, milho e sorgo (Brasil, 2018). Esse herbicida apresenta baixa adsorção às partículas do solo, persistência moderada (Barchanska et al., 2014) e potencial contaminação de cursos hídricos (Sequinatto et al., 2013). Devido à contaminação de lençóis freáticos, há restrição de seu uso na União Europeia desde 2004 (EU, 2018). Esse herbicida pode afetar os sistemas endócrino e reprodutivo e estudos recentes sugerem que atrazine afeta o crescimento de células tumorais em humanos (Tian et al., 2018; Hu et al., 2018).

O clomazone (2-[(2-chlorophenyl methyl)-4,4-dimethyl-3-isoxazolidinone) é um herbicida utilizado em pré emergência para algodão, arroz, tabaco, cana-de-açúcar, mandioca e soja (Brasil, 2018). Esse herbicida apresenta solubilidade em água de 1100 mg L<sup>-1</sup> (Djurdjic et al., 2018) e meia vida variando de 5 a 60 dias (Scoy & Tjeerdema, 2014). Suas características indicam que clomazone, provavelmente, persiste na coluna de água (Tomco et al., 2010). Foi detectado em mananciais e águas agrícolas no Brasil (Zanella et al., 2002; Grützmacher et al., 2008; Silva et al., 2009), distantes da área de aplicação (Sequinatto et al., 2013) e demonstrou efeitos negativos em anfíbios e peixes (Crestani et al., 2007; Freitas et al., 2017; Stevanovic et al., 2017). Existe preocupação, ainda, quanto ao impacto nos ecossistemas de água potável (Scoy & Tjeerdema, 2014).

A proposta de uso de arbóreas para fitorremediação de áreas com resíduos de herbicidas tornou-se interessante para a agricultura brasileira (Aguiar et al., 2017; Cabral et al., 2017; Santos et al., 2018), visando à descontaminação por essas espécies e sua microbiota associada (Rainbird et al., 2017; Cao et al., 2018). Herbicidas lixiviáveis podem atingir ecossistemas à jusante das áreas agrícolas (Calderon et al., 2016). Nesse sentido, recomenda-se que zonas ripárias degradadas sejam reconstituídas com espécies arbóreas que apresentam capacidade de fitorremediação de herbicidas (Cabral et al., 2017). Essas espécies funcionariam como filtros, impedindo ou diminuindo a quantidade de resíduos que, eventualmente, chegariam a essas áreas (Chellaiah & Yule, 2018; Satkowski et al., 2018).

O Cerrado e a Mata Atlântica estão entre os maiores biomas do Brasil, apresentam grande biodiversidade e possuem cerca de 13 e 19 mil espécies vegetais catalogadas, respectivamente (MMA, 2016). A grande diversidade de espécies vegetais oriundas desses biomas sugere a possibilidade de representantes que possam contribuir para sua recuperação. *Eremanthus crotonoides* pertence à família Asteraceae é endêmica do Brasil no Cerrado e Mata Atlântica (Gastauer et al., 2012, Loeuille, 2015) e ocupa as bordas das florestas ribeirinhas (Loeuille, 2011). É classificada como pioneira (Oliveira Filho et al., 2008) e utilizada para construção de mourões, retirada de óleos essenciais e apresenta funções medicinais (Galdino et al., 2006; Ribeiro et al., 2010; Lobo et al., 2012). *Inga striata*, pertencente à família Fabaceae, é de ocorrência nas Guianas, Bolívia, Peru, Equador e Colômbia. No Brasil, é encontrada na Amazônia, Nordeste, Sul e Sudeste (Silva et al., 2011; Mata et al., 2013) e classificada como uma espécie clímax exigente de luz (Felitto et al., 2017). Espécies do gênero *Inga* são, principalmente, utilizadas para a recomposição de florestas ciliares e recuperação de áreas degradadas (Silva & Souza-Lima, 2013).

O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial remediador e sensibilidade fisiológica das espécies *Eremanthus crotonoides* e *Inga striata* em solos contaminados com os herbicidas atrazine e clomazone.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta de sementes e preparo de mudas

As sementes de *Eremanthus crotonoides* e *Inga striata* foram beneficiadas e colocadas para germinar em tubetes com 55 cm<sup>3</sup> de substrato composto por uma mistura de três partes, sendo um terço de solo esterilizado, um terço de casca de arroz carbonizada e um terço de areia (Venturin et al., 2005). As mudas que continham dois pares de folhas e aproximadamente 4 cm de altura foram selecionadas e retiradas dos tubetes, com posterior destorroamento do substrato, lavagem das raízes em água deionizada e transplântio de uma muda por vaso de polietileno contendo 10 kg de substrato.

### 2.2 Solo

Amostra de Neosolo de textura franco arenosa foi coletada e preparada como substrato sendo sua composição física e química descrita na Tabela 01.

Tabela 1: Atributos físicos e químicos do solo, na camada de 0-20 cm, utilizado no experimento

| Análise Granulométrica (dag Kg <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup> |                    |      |                       |                  |                  |      |               |        |        |
|---|--------------------|------|-----------------------|------------------|------------------|------|---------------|--------|--------|
| Areia<br>71,7   |                    |      | Silte<br>18,8         |                  |                  |      | Argila<br>9,5 |        |        |
| Análise química <sup>2</sup>                                |                    |      |                       |                  |                  |      |               |        |        |
| pH  | P                  | K    | Ca <sup>2+</sup>      | Mg <sup>2+</sup> | Al <sup>3+</sup> | H+Al | SB            | CTC(t) | CTC(T) |
| H <sub>2</sub> O  | mg/dm <sup>3</sup> |      | cmolc/dm <sup>3</sup> |                  |                  |      |               |        |        |
| 5,5   | 0,4                | 18   | 1,0                   | 0,1              | 0,1              | 2,64 | 1,15          | 1,25   | 3,79   |
| V   | m                  | MO   | P-rem                 | Zn               | Fe               | Mn   | Cu            | B      |        |
| %   | dag/kg             | mg/L | mg/dm <sup>3</sup>    |                  |                  |      |               |        |        |
| 30  | 8                  | 2,18 | 16,3                  | 1,1              | 81,6             | 5,0  | 0,2           | 0,2    |        |

<sup>1</sup>Análise física realizada no Laboratório de Análise de Solo de Viçosa; <sup>2</sup>Análise química realizada no Laboratório de Fertilidade do Solo da UFVJM.

### 2.3 Herbicidas e design do experimento

O experimento foi conduzido em delineamento em blocos ao acaso com tratamentos constituídos em esquema fatorial triplo (3 x 2 x 4). O primeiro fator foi constituído por duas espécies vegetais e solo sem vegetação; o segundo pelos herbicidas atrazine e clomazone e o terceiro por 4 doses dos herbicidas, correspondentes a 0, 0,5, 1 e 2 vezes a dose comercial recomendada (Brasil, 2018), totalizando 24 tratamentos, com quatro repetições cada. As doses dos herbicidas atrazine e clomazone foram convertidas em relação à área do vaso e volume do solo, sendo a concentração final fracionada e aplicada a cada sete dias conforme apresentado na Tabela 02. A aplicação foi feita em pratos de contenção do vaso utilizando pipeta de precisão, simulando um lençol freático contaminado (Cabral et al., 2017).

Tabela 2: Dose padrão, concentração final aplicada e fracionamento das subdoses

| Doses <sup>(1)</sup> (L ha <sup>-1</sup><br>do P.C.) | Concentração final no solo<br><sup>(2)</sup> (mg kg <sup>-1</sup> ) |           | Aplicações <sup>(3)</sup> |                |                |                |
|--|---|-----------|---------------------------|----------------|----------------|----------------|
|  | Atrazine  | Clomazone | 1 <sup>a</sup>            | 2 <sup>a</sup> | 3 <sup>a</sup> | 4 <sup>a</sup> |
| 0  | 0   | 0         | -                         | -              | -              | -              |
| 0,5  | 1,25  | 0,18      | -                         | -              | -              | 0,5            |
| 1  | 2,5   | 0,36      | -                         | -              | 0,5            | 0,5            |
| 2  | 5   | 0,72      | 0,5                       | 0,5            | 0,5            | 0,5            |

<sup>1</sup>Dose do produto comercial (P.C.), sendo Primóleo<sup>®</sup> para atrazine e Gamit 360<sup>®</sup> para clomazone (Brasil, 2018); <sup>2</sup>Concentração total do herbicida no solo ao final da última aplicação; <sup>3</sup>Aplicações de metade da dose comercial a cada sete dias.



## 2.4 Análise de gases por infravermelho

Aos 30 dias após a última aplicação dos herbicidas foram realizadas avaliações fisiológicas na última folha adulta em plena maturidade fisiológica (4ª a 5ª folha contando da gema apical para a extremidade inferior) das plantas utilizando um analisador de gases no infravermelho (IRGA), marca ADC, modelo LCA PRO (Analytical Development Co. Ltd, Hoddesdon, UK). Foram medidos taxa fotossintética ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),  $\text{CO}_2$  consumido ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ), condutância estomática ( $\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) e taxa de transpiração ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Essas avaliações foram realizadas entre 7 e 9 horas da manhã, em dia de céu limpo e com iluminação artificial de  $1.200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , de forma a manter as condições ambientais homogêneas durante as avaliações em casa de vegetação aberta, permitindo livre circulação do ar.

## 2.5 Extração de resíduos do solo e análise

Para a análise das amostras de solo foi realizada extração por método QuEChERS modificado (Prestes et al., 2009) e análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS, do inglês ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry). O procedimento do método QuEChERS modificado empregou como solvente de extração acetonitrila acidificada e, para a etapa de partição, os sais utilizados foram sulfato de magnésio e cloreto de sódio. Após a adição dos sais, os tubos foram agitados e centrifugados. A limpeza dos extratos foi realizada através da extração em fase sólida dispersiva (SPE, do inglês dispersive solid phase extraction). Para a etapa de d-SPE empregou-se: sulfato de magnésio, carbono grafitizado (GCB) e o sorvente amina primária secundária (PSA). Os extratos foram então agitados, centrifugados e filtrados. Antes da análise por UHPLC-MS/MS, as amostras foram diluídas cinco vezes em água ultrapura.

As amostras foram analisadas no sistema UHPLC-MS/MS da Waters (EUA), equipado com: cromatógrafo a líquido; detector MS do tipo triplo quadrupolo, modelo Xevo TQ; interface/fonte de ionização por eletronebulização; gerador de nitrogênio peak; sistema controlador de solventes (sistema binário de bombas) para operação de gradientes a alta pressão; coluna analítica Acquity UPLC® BEH C18 ( $50 \times 2,1 \text{ mm}$ ,  $1,7 \mu\text{m}$ ) da Waters (EUA); sistema de aquisição de dados através do software MassLynx 4.1 (Waters, EUA). Monitoramento de reações selecionadas foram utilizadas para a quantificação e identificação dos analitos.

A fase móvel empregada foi (A) água: metanol (98:2, v/v) e (B) metanol, ambas contendo 5 mmol L<sup>-1</sup> de formiato de amônio e ácido fórmico 0,1% (v/v); com vazão 0,225 ml min<sup>-1</sup> e 10 µL de volume de injeção (Kemmerich et al., 2018). Utilizou-se modo de eluição gradiente de acordo com a tabela 3 a seguir

Tabela 3: Gradiente da fase móvel utilizado para determinação de resíduos de herbicidas nas amostras de solo no sistema UHPLC-MS/MS

| Tempo (min) | % A | % B |
|-------------|-----|-----|
| 0           | 95  | 5   |
| 0,25        | 95  | 5   |
| 7,75        | 5   | 95  |
| 8,50        | 5   | 95  |
| 8,51        | 95  | 5   |
| 10,0        | 95  | 5   |

## 2.6 Análises estatísticas

As variáveis fotossíntese, CO<sub>2</sub> consumido, condutância estomática e transpiração foram determinadas por regressão linear a 5% de significância. Os dados de resíduos de herbicidas no solo foram submetidos aos testes de homogeneidade e normalidade, à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey a 5% de significância.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Análise de gases por infravermelho

As doses de atrazine e clomazone não mataram as plantas de *E. crotonoides* e *I. striata*, mas as folhas dessas plantas apresentaram sintomas de intoxicação, como amarelamento e necrose foliar em solos contaminados por atrazine, e branqueamento nas folhas jovens, naquelas com clomazone, principalmente na dose mais alta. As taxas de fotossíntese e CO<sub>2</sub> consumido por *E. crotonoides* foram maiores que as de *I. striata* com ou sem herbicidas (Figuras 1 e 2). A fotossíntese e CO<sub>2</sub> consumido de *E. crotonoides* e *I. striata* foram inibidos após a exposição à atrazine e reduziram-se com o aumento da dose deste herbicida. *Eremanthus crotonoides* teve

uma leve recuperação nas doses mais altas de herbicidas (Figuras 1 e 2).

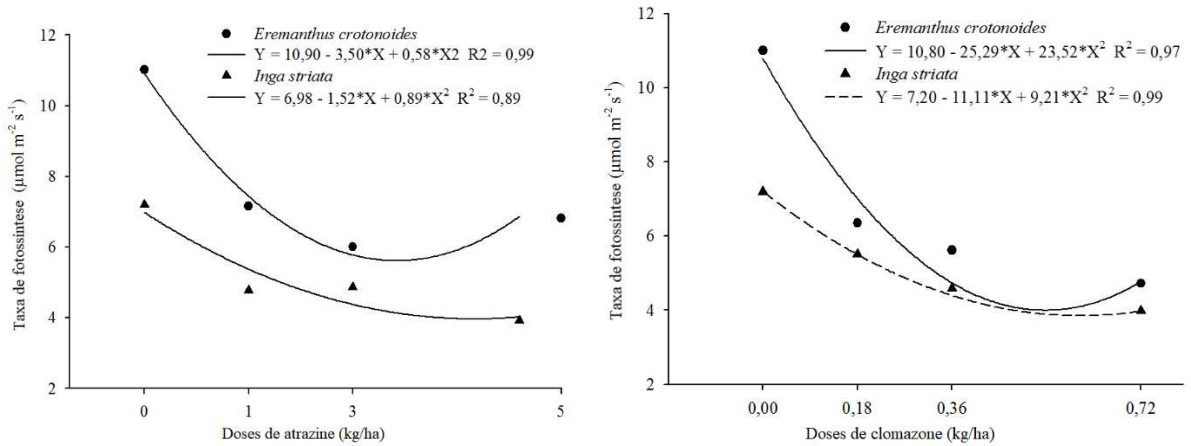


Figura 1- Taxa fotossintética de *Eremanthus crotonoides* e *Inga striata* em solos contaminados com diferentes doses de atrazine e clomazone

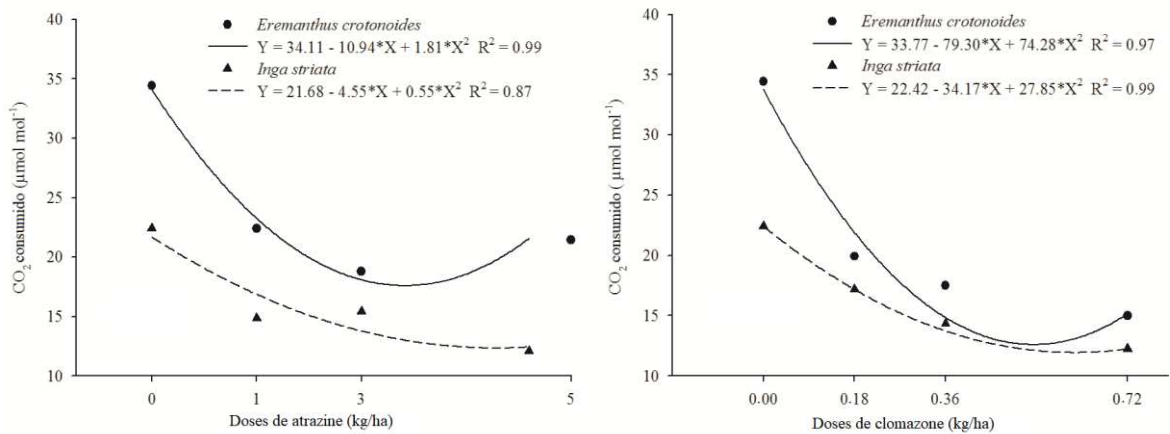


Figura 2- Taxa de  $\text{CO}_2$  consumido por *Eremanthus crotonoides* e *Inga striata* em solos contaminados com diferentes doses de atrazine e clomazone

A condutância estomática e transpiração de *E. crotonoides* e *I. striata* foram similares com o herbicida atrazine e o controle. O clomazone reduziu a condutância estomática e transpiração de *I. striata* e mostrou uma tendência de recuperação na dose mais alta (Figura 3). A condutância estomática e transpiração de *E. crotonoides* apresentou baixa variação no solo com ou sem o herbicida clomazone.

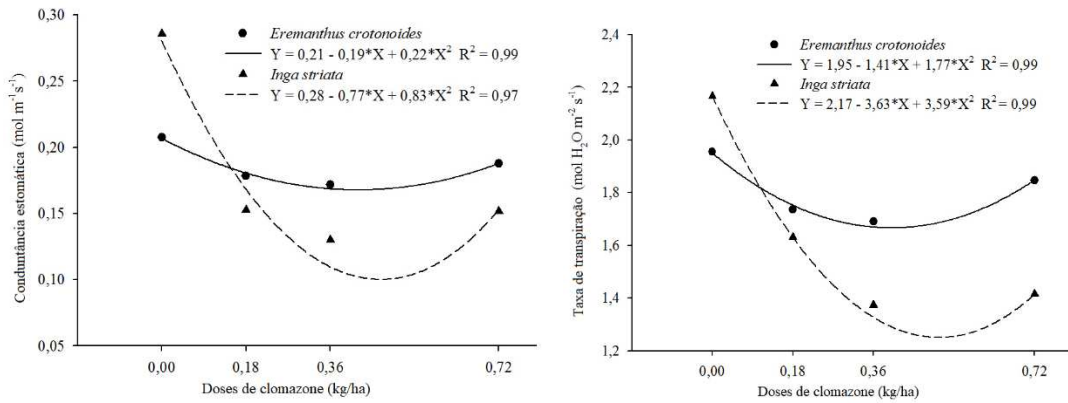


Figura 3- Condutância estomática e transpiração de *Eremanthus crotonoides* e *Inga striata* em solos contaminados com clomazone.

### 3.2 Análise de fitorremediação

Os resíduos totais de atrazine e clomazone remanescentes nos solos após a fitorremediação foram menores do que aqueles encontrados no controle, sem remediação (Figura 4). A eficiência de degradação do herbicida aumentou com suas doses.

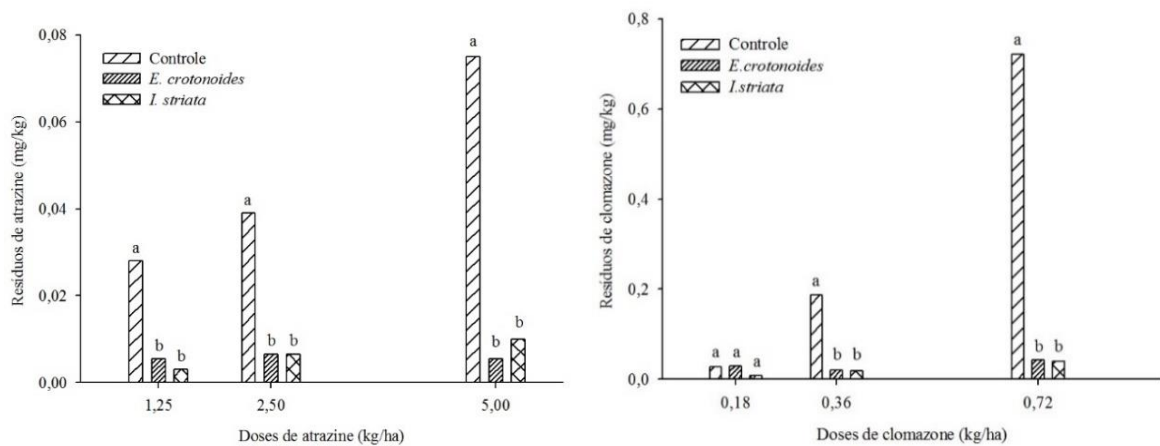


Figura 4: Resíduos de atrazine e clomazone ( $\text{mg/kg}$ ) em amostras de solo sem cultivo e solos rizosféricos de *E. crotonoides* e *I. striata*. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 4 DISCUSSÃO

Elevada taxa de fotossíntese de *E. crotonoides* é característico de seu grupo ecológico, que corresponde a uma espécie pioneira (Meir et al., 2007; Sampaio Filho, 2018). Além disso,

a epiderme do caule de *E. crotonoides* apresenta cloroplastos, o que pode contribuir para maiores taxas fotossintéticas (Lusa et al., 2018). A diminuição na taxa de fotossíntese de *E. crotonoides* e *I. striata* em solos contaminados por atrazine está relacionada ao estágio de desenvolvimento das plantas e ao mecanismo de ação desse herbicida, que é um inibidor de fotossistema II (Park et al., 2016). A molécula do atrazine se liga à proteína D1, bloqueando a transferência de elétrons para a plastoquinona (Duke, 1990). Essa inibição impede a conversão da energia da luz em energia eletroquímica, resultando na produção de clorofila tripla e oxigênio singlete, induzindo a um estresse oxidativo e, conseqüentemente, redução da fixação de CO<sub>2</sub> e crescimento da planta (Fuerst & Norman, 1991; Qian et al., 2013; Park et al., 2016).

O aumento da fotossíntese de *E. crotonoides* na maior dose pode ser devido a um mecanismo de desintoxicação do atrazine, transformando-o em um metabólito inativo e restaurando o fluxo normal de elétrons (Weber et al., 2017). Além de alterações na atividade fotossintética, herbicidas podem alterar o dano oxidativo e ativar o sistema de defesa das plantas (Langaro et al., 2016). O aumento na concentração de atrazine pode induzir o aumento das atividades de enzimas antioxidantes, a fim de combater aumento de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica (Erinle et al., 2018). Plantas tolerantes ao atrazine podem apresentar uma estratégia de transformação ou detoxicação da molécula, que pode ser mediada por enzimas do citocromo P450 (Tan et al., 2015) e glutatona S-transferases (Zhang et al., 2014).

A redução da fotossíntese e CO<sub>2</sub> consumido por *E. crotonoides* e *I. striata* em solo contaminado pelo clomazone se deve ao mecanismo de ação desse herbicida e, também, ao estágio de desenvolvimento das plantas como fator determinante na sensibilidade ao herbicida (Santos et al., 2018). O clomazone é um inibidor da síntese de carotenoides, molécula responsável pela proteção contra radiação excessiva da clorofila (Dayan et al., 2015). Os inibidores da biossíntese dos carotenoides levam ao branqueamento dos tecidos verdes, uma vez que, na falta de carotenoides, a molécula de clorofila é fotodegrada (Boger & Sandmann, 1998). Os sintomas, como necrose e branqueamento foliar, reduziram a área fotossinteticamente ativa na folha, diminuindo a taxa de fotossíntese da planta (Piveta et al., 2018). Além disso, o herbicida clomazone pode reduzir a fotossíntese pela interferência na cadeia transportadora de elétrons, limitando a re-oxidação do NADPH e levando a regeneração da RuBP ou na sua restauração (Darwish et al., 2015; Weber et al., 2017).

A redução da condutância estomática de *E. crotonoides* e *I. striata*, limitou a perda de água e, conseqüentemente, afetou as trocas gasosas (Langaro et al., 2016). Quando a planta está em uma situação de stress, ela tende a diminuir a condutância estomática (He et al., 2018; Sahoo et al., 2018; Wu et al., 2018). Herbicidas podem reduzir a condutância estomática em plantas sensíveis e tolerantes (Piveta et al., 2018). Ao reduzir a condutância estomática, a planta reduz a transpiração, uma vez que a condutância estomática controla a entrada e saída de água e CO<sub>2</sub> pelos estômatos (Piveta et al., 2018). As células epidérmicas da folha de *E. crotonoides* apresentam cutícula espessa e presença de tricomas na superfície das folhas (Lusa et al., 2018), o que pode contribuir para o armazenamento de água, conferindo estabilidade mesmo em situação de stress, como a presença do herbicida. Em estádios avançados, atrazine e clomazone não provocam danos significativos a espécies arbustivas ou arbóreas (Brasil, 2018). O estudo com plantas em fase inicial de desenvolvimento é fundamental para estabelecer o nível de tolerância quando da recomposição de matas e faixas vegetadas às margens dos campos agrícolas. Além de garantir melhor desenvolvimento das mudas em campo, nossos resultados permitem concluir que a fitorremediação pode ser efetiva já nas etapas iniciais do processo de recomposição de zonas ripárias ou outras áreas degradadas.

Plantas de *E. crotonoides* e do gênero *Inga* exibem tolerância à atrazine e ao clomazone e apresentam potencial para fitorremediação (Aguiar et al., 2017; Cabral et al., 2017). A diminuição dos resíduos dos herbicidas em solos cultivados com as espécies vegetais, sugere que essas plantas acumularam ou transformaram as moléculas dos herbicidas em seus tecidos, uma vez que os herbicidas foram absorvidos pelas plantas. Apesar da análise utilizada nesse estudo ser feita apenas para resíduos no solo, pode-se afirmar que eventual resíduo remanescente nos tecidos das plantas são menos prejudiciais que sua permanência no ambiente.

A literatura traz informações sobre as estratégias de fitorremediação. *Inga marginata*, pertencente ao mesmo gênero de *I. striata*, apresentou concentração de clomazone em seus tecidos, com rápida degradação (Cabral et al., 2017). Sabe-se, contudo, que exsudados radiculares tem grande influência na diversidade de microrganismos na rizosfera (Weyens et al., 2009), aumentando a biomassa microbiana, atividade metabólica e degradação (Lin et al., 2018, Kuiper et al., 2003). Alguns trabalhos evidenciam maior degradação do atrazine em ambiente rizosférico quando comparado ao não rizosférico (Lin et al., 2018; Qu et al., 2018) e a degradação microbiana é considerada a principal via de degradação do clomazone (Van Scoy & Tjeerdema, 2014).

No caso do uso de espécies arbóreas para fitorremediação, como esse trabalho, a via de degradação mais provável é pela rizodegradação, que é considerada a remediação dos contaminantes na região da rizosfera (Gerhardt et al., 2009; Megharaj et al., 2011). Como o solo utilizado no estudo foi arenoso e com baixo teor de matéria orgânica, evidencia-se pouca retenção e maior disponibilidade dos produtos para degradação (Bindumol & Harilal, 2017; Paredelo et al., 2018), podendo atribuir quase em sua totalidade a diminuição do resíduo do solo ao conjunto solo-planta. O aumento da eficiência de degradação na maior dose se deve à repetida aplicação dos herbicidas no solo, que foi de metade da dose comercial a cada semana até atingir a maior dose (Martinazzo et al., 2010), acelerando a degradação devido ao estabelecimento de populações microbianas já adaptadas aos herbicidas.

## 5 CONCLUSÃO

*Eremanthus crotonoides* e *I. striata* são eficientes no processo de remediação. Os herbicidas atrazine e clomazone alteraram as variáveis fisiológicas dessas plantas, mas sem comprometer seu desenvolvimento. A eficiência para diminuir os resíduos dessas plantas por *E. crotonoides* e *I. striata* é alta mesmo com altas concentrações desses herbicidas no solo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, L.M., Santos, J.B., Costa, V.A., Brito, L.A., Ferreira, E.A., Pereira, I.M., Aspiazu, I. 2016. Herbicide tolerance and water use efficiency in forest species used in degraded areas recovery programs. *Bosque*, 37 (3): 493-500.
- Barchanska, H., Babilas, B., Gluzicka, K., Zralek, D., Baranowska, I. 2014. Rapid determination of mesotrione, atrazine and its main degradation products in selected plants by MSPD– HPLC and indirect estimation of herbicides phytotoxicity by chlorophyll quantification. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 94 (2): 99–114.
- Bindumol, G.P., Harilal, C.C. 2017. Mobility and dissipation of chlorpyrifos and quinalphos in sandy clay loam in an agroecosystem—a laboratory-based soil column study. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189 (10): 506.
- Boger, P., Sandmann, G. 1998. Carotenoid biosynthesis inhibitor herbicides - Mode of action and resistance mechanisms. *Pesticide Outlook*, 9 (6): 29-35.

Cabral, C.M., Santos, J.B., Ferreira, E.A., Costa, S.S.D., Dalvi, V.C., Francino, D.M.T. 2017. Structural evaluation of damage caused by herbicide clomazone in leaves of arborescent species native to Brazil. *Planta Daninha*, 35: e017152000.

Cabral, C.M., Santos, J.B., Ferreira, E.A., Machado, V.M., Pereira, I.M., Silva, D.V. 2017. Tolerance to the herbicide clomazone and potential for changes of forest species. *Bioscience Journal*, 33 (4): 897-904.

Calderon, M.J., Luna, E.D., Gomez, J.A., Hermosin, C.M. 2016. Herbicide monitoring in soil, runoff waters and sediments in an olive orchard. *Science of the Total Environment*, 569 (18): 416-422.

Cao, B., Zhang, Y., Wang, Z., Li, M., Yang, F., Jiang, D., Jiang, Z. 2018. Insight into the variation of bacterial structure in atrazine-contaminated soil regulating by potential phytoremediator: *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. *Frontiers in Microbiology*, 9: 864.

Chellaiah, D., Yule, C.M. 2018. Effect of riparian management on stream morphometry and water quality in oil palm plantations in Borneo. *Limnologica*, 69 (2):72-80.

Crestani, M., Menezes, C., Glusczak, L., Miron, D.S., Spanevello, R., Silveira, A., Gonçalves, F.F., Zanella, R., Loro, V.L. 2007. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere*, 67 (11): 2305 - 2311.

Dayan, F.E., Owens, D.K., Corniani, N., Silva, F.M.L., Watson, S.B., Howell, J.L., Shaner, D.L. 2015. Biochemical markers and enzyme assays for herbicide mode of action and resistance studies. *Weed Science*, 63 (SP1): 23-63.

Darwish, M., Lauri, F.L., Vidal, V., Maataoui, M., Sallanon, H. 2015. Alternation of light/dark period priming enhances clomazone tolerance by increasing the levels of ascorbate and phenolic compounds and ROS detoxification in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plantlets. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 148 (7): 9-20.

Djurđić, S., Vukojević, V., Jevtić, S., Pergal, M.V., Petković, B.B., Stanković, D.M. 2018. Herbicide clomazone detection using electroanalytical approach using boron doped diamond electrode. *International Journal of Electrochemical Science*, 13 (9): 2791 – 2799.



Duke, S.O. 1990. Overview of herbicide mechanisms of action. *Environmental Health Perspectives*, 87: 263-271.

Enrinle, K.O., Jiang, Z., Ma, B., Ur-Rehman, K., Shahla, A., Zhang, Y. 2018. Physiological and molecular responses of pearl millet seedling to atrazine stress. *International Journal of Phytoremediation*, 20 (4): 343-351.

EU, 2018. EU pesticide database. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database>. Acesso em 28.09.2018.

Felitto, G., Lozano, E.D., Canestraro, B.K., Kersten, R.A. 2017. Diversity and structure of the lower strata in two successional stages in a subtropical forest, Southern Brazil. *Hoehnea*, 44 (4): 490-504.

Freitas, J.S., Felício, A.A., Teresa, F.B., Almeida, E.A. 2017. Combined effects of temperature and clomazone (Gamit®) on oxidative stress responses and B-esterase activity of *Physalaemus nattereri* (Leiuperidae) and *Rhinella schneideri* (Bufonidae) tadpoles. *Chemosphere*, 185 (20): 548-562.

Fuerst, E.P., Norman, M.A. 1991. Interactions of herbicides with photosynthetic electron transport. *Weed Science Society of America*, 39 (3): 458-464.

Gastauer, M., Messias, M.C.T., Neto, J.A.M. 2012. Floristic composition, species richness and diversity of campo rupestre vegetation from the Itacolomi State Park, Minas Gerais, Brazil. *Environment and Natural Resources Journal*, 2 (3): 115-130.

Gerhardt, K.E., Huang, X.D., Glick, B.R., Greenberg, B.M. 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant Science*, 176 (1): 20-30.

Grützmacher, D.D., Grützmacher, A.D., Agostinetto, D., Loeck, A.E., Roman, R., Peixoto, S.C., Zanella, R. 2008. Monitoring of pesticides in two water sources in southern Brazil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 12 (6): 632-637.

He, B., Gu, M., Wang, X., He, X. 2018. The effects of lead on photosynthetic performance of waxberry seedlings (*Myrica rubra*). *Photosynthetica*, 56 (4): 1147-1153.

- Hu, K., Tian, Y., Du, Y., Huang, L., Chen, J., Li, N., Liu, W., Liang, Z., Zhao, L. 2016. Atrazine promotes RM1 prostate cancer cell proliferation by activating STAT3 signaling. *International Journal of Oncology*, 48 (5): 2166-2174.
- Kemmerich, M., Bernardi, G., Prestes, O. D., Adaime, M. B., Zanella, R. 2018. Comprehensive method validation for the determination of 170 pesticide residues in pear employing modified QuEChERS without clean-up and ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, 11 (2): 556-577.
- Kuiper, I., Legendijk, E.L., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J. 2004. Rhizoremediation: A beneficial plant-microbe interaction. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 17 (1): 6–15.
- Langaro, A.C., Agostinetto, D., Oliveira, C., Silva, J.D.G., Bruno, M.S. 2016. Biochemical and physiological changes in rice plants due to the application of herbicides. *Planta Daninha*, 34 (2): 227-289.
- Lin, Z., Zhen, Z., Chen, C., Li, Y., Luo, C., Zhong, L., Hu, H., Li, J., Zhang, Y., Liang, Y., Yang, J., Zhang, D. 2018. Rhizospheric effects on atrazine speciation and degradation in laterite soils of *Pennisetum alopecuroides* (L.) Spreng. *Environmental Science and Pollution Research*, 25 (13): 12407-12418.
- Lobo, J.F.R., Castro, E.S., Gouvea, D.R., Fernandes, C.P., Almeida, F.B., Amorin, L.M.F., Burth, P., Rocha, L., Santos, M.G., Harmerski, L., Lopes, N.P., Pinto, A.C. 2012. Antiproliferative activity of *Eremanthus crotonoides* extracts and centratherin demonstrated in brain tumor cell lines. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22 (6): 1295-1300.
- Lusa, M.G., Loeuille, B.F.P., Ciccarelli, D., Appezzato da Glória, B. 2018. Evolution of stem and leaf structural diversity: a case study in Lychnophorinae (Asteraceae). *The Botanical Review*, 84 (3): 203-241.
- Martinazzo, R., Jablonowski, N.D., Hamacher, G., Dick, D.P., Burauel, P. 2010. Accelerated degradation of C-14-atrazine in Brazilian soils from different regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (13): 7864–7870.
- Mata, M.F., Silva, K.B., Bruno, R.L.A., Felix, L.P., Filho, S.M., Alves, E.U. 2013. Physiological maturity of ingazeiro *Inga striata* Benth. Seeds. *Semina: Ciências Agrárias*, 34 (2): 549-566.

- Megharaj, M., Ramakreishnan, B., Vankateswarlu, k., Sethunathan, N., Naidu, R. 2011. Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective. *Environmental International*, 37 (8): 1362-1375.
- Meir, P., Levy, P.E., Grace, J., Jarvis, P.G. 2007. Photosynthetic parameters from two contrasting woody vegetation types in west Africa. *Plant Ecology*, 192 (2): 277–287.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2018. Relatório de produção por ingredientes ativos. Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em 11.09.2018.
- Murphy, I.J., Coats, J.R. 2011. The capacity of switchgrass (*Panicum virgatum*) to degrade atrazine in a phytoremediation setting. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30 (3): 715-722.
- Oliveira Filho, A.T., Van Den Beg, E., Sobral, M.E.G., Pifano, D.S., Santos, R. M., Valente, A.S.M., Machado, E.L.M., Martins, J.C., Silva, C.P.C. 2008. Espécies de ocorrência do domínio atlântico e do cerrado. In: Oliveira Filho, A.T., Scolforo, J.R. (Ed.). *Inventário Florestal de Minas Gerais: Espécies Arbóreas da Flora Nativa*. Lavras: UFLA, 217-418.
- Park, J., Brown, M.T., Depuydt, S., Kim, J.K., Won, D.S., Han, T. 2017. Comparing the acute sensitivity of growth and photosynthetic endpoints in three Lemna species exposed to four herbicides. *Environmental Pollution*, 220: 818-827.
- Paradelo, R., Conde-Cid, M., Abad, E.M., Nóvoa-Munoz, J.C., Fernandez-Calvino, D., Arias-Estévez, M. Retention and transport of mecoprop on acid Sandy-loam soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148: 82-88.
- Piveta, L.B., Pinto, J.J.O., Avila, L.A., Noldin, J.A., Santos, L.O. 2018. Selectivity of imazapic + imazapyr herbicides on irrigated rice as affected by seed treatment with dietholate and clomazone applied in preemergence. *Planta Daninha*, 36: e018149361.
- Prestes, O.D., Friggi, C.A., Adaime, M. B., Zanella, R. 2009. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Química Nova*, 32 (6): 1620-1634.

Qian, H., Han, X., Zhang, Q., Sun, Z., Sun, L., Fu., Z. 2013. Imazethapyr enantioselectively affects chlorophyll synthesis and photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (6): 1172–1178.

Rainbird, B., Bentham, R.H., Soole, K.L. 2018. Rhizoremediation of residual sulfonylurea herbicides in agricultural soils using *Lens culinaris* and a commercial supplement. *International Journal of Phytoremediation*, 20 (2): 104-113.

Sahoo, M.R., Dasgupta, M., Kole, P.C., Mukherjee, A. 2018. Photosynthetic, physiological and biochemical events associated with polyethylene glycol-mediated osmotic stress tolerance in taro (*Colocasia esculenta* L. Schott). *Photosynthetica*, 56 (4): 1069-1080.

Santos, N.M.C., Costa, V.A.M., Araújo, F.V., Alencar, T.B., Ribeiro, V.H., Okumura, F., Simeone, M.L.F., Santos, J.B. 2018. Phytoremediation of Brazilian tree species in soils contaminated by herbicides. *Environmental Science and Pollution Research*, 25 (27): 27561-27568.

Sampaio Filho, I.J., Jardine, K.J., de Oliveira, R.C.A., Gimenez, B.O., Cobello, L.O., Piva, L.R.O., Candido, L.A., et al. 2018. Below versus above ground plant sources of abscisic acid (ABA) at the heart of tropical forest response to warming. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (7): 2023.

Satkowski, L.E., Goyne, K.W., Anderson, S.H., Lerch, R.N., Webb, E.B., Snow, D.D. 2018. Imidacloprid sorption and transport in cropland, grass buffer, and riparian buffer soils. *Vadose Zone Journal*, 7 (1):170139.

Sequinatto, L., Reichert, J.M., Santos, D.R., Reinert, D.J., Copetti, A.C.C. 2013. Occurrence of agrochemicals in surface waters of shallow soils and steep slopes cropped to tobacco. *Química Nova*, 36 (6): 768-722.

Silva, E.D., Lobo, J.F.R., Vinther J.M., Borges, R.M., Staerk, D. 2016. High-resolution  $\alpha$ -glucosidase inhibition profiling combined with hplc-hrms-spe-nmr for identification of antidiabetic compounds in *Eremanthus crotonoides* (Asteraceae). *Molecules*, 21 (6): 782.

Silva, E.D., Tozzi, A.M.G.A. 2011. Leguminosae in ombrophilous dense forest of Picinguaba nucleus, Serra do Mar State Park, São Paulo, Brazil. *Biota Neotropica*, 11 (4): 299-325.

- Silva, R.R. & Souza-Lima, E.S.S. 2013. Fabaceae of the Rio São Francisco River sub-basin, Nova Marilândia, Mato Grosso, Brazil. *Biota Neotropica*, 13 (2): 297-302.
- Stevanovica, M., Gasic, S., Pipal, M., Blahova, M., Brkic, D., Neskovic, N., Hilscherov, K. 2017. Toxicity of clomazone and its formulations to zebrafish embryos (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 188 (3): 54-63
- Tan, L.R., Lu, Y.C., Zhang, J.J., Luo, F., Yang, H. 2015. A collection of cytochrome P450 monooxygenase genes involved in modification and detoxification of herbicide atrazine in rice (*Oryza sativa*) plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 119 (9): 25–34.
- Tian, Y., He, J., Liu, N., Huang, D., Liu, Z., Yang, Y., Chen, J., Zhao, B., Zhao, S., Liang, B. 2018. Atrazine exposure improves the proliferation of H22 cells *in vitro* and *in vivo*. *RSC Advances*, 8 (39) 21759–21767.
- Tomco, P.L., Holstege, D.M., Tjeerdema, R.S. 2010. Microbial degradation of clomazone under simulated California rice field conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (6): 3674–3680.
- Van Scoy, A.R., Tjeerdema R.S. 2014. Environmental fate and toxicology of clomazone. In: *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer, Cham, 229: 35-49.
- Venturin, N., Souza, P.A., Macedo, R.L.G., Nogueira, F.D. 2005. Adubação mineral da candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish). *Floresta*, 35 (2): 211-219.
- Weber, J.F., Kunz, C., Peteinatos, G.G., Santel, H.J., Gerhands, R. 2017. Utilization of chlorophyll fluorescence imaging technology to detect plant injury by herbicides in sugar beet and soybean. *Weed Technology*, 31 (4): 523-535.
- Weyens, N., Leite, D.I., Taghavi, S., Newman, L., Vangronsveld, J. 2009. Exploiting plant–microbe partnerships to improve biomass production and remediation. *Trends Biotechnology*, 27 (10): 591-598.
- Wu, X.H., Wang, W., Xie, X.L., Yin, C.M., Xie, K.J. 2018. Photosynthetic and yield responses of rice (*Oryza sativa* L.) to different water management strategies in subtropical China. *Photosynthetica*, 56 (4): 1031-1038.

Zanella, R., Primel, E.G., Machado, S.L.O., Gonçalves, F.F., Marchezan, E. 2002. Monitoring of the herbicide clomazone in environmental water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Chromatographia*, 55 (9–10): 573–577.

Zhang, J.J., Lu, Y.C., Yang, H. 2014. Chemical modification and degradation of atrazine in *Medicago sativa* through multiple pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (40): 9657–9668.

**CAPÍTULO 3**

**METAGENÔNICA DE SOLOS RIZOSFÉRICOS CONTAMINADOS COM**  
**ATRAZINE**

## RESUMO

**Palavras-chave:** genes de degradação de atrazine, microrganismos, sequenciamento de nova geração

O estudo da metagenômica vem proporcionando a descoberta de genes e vias metabólicas envolvidos na degradação de xenobióticos. Alguns microrganismos possuem a capacidade de metabolizar esses compostos, potencializando processos de fitorremediação quando associados a espécies vegetais. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo o estudo do metagenoma e a ocorrência de genes de degradação do atrazine em solos rizosféricos das espécies fitorremediadoras *Inga striata* e *Caesalpinhia ferrea*. As comunidades microbianas foram analisadas pelo sequenciamento de nova geração Illumina-Hiseq2000. Os gêneros de microrganismos mais detectados foram *Mycobacterium*, *Conexibacter*, *Bradyrhizobium*, *Solirubrobacter*, *Rhodoplanes*, *Streptomyces*, *Geothrix*, *Gaiella*, *Nitrospira* e *Haliangium*. Foi possível observar a presença de 9205 números de genes relacionados a metabolismo de xenobióticos. Nos solos rizosféricos de *I. striata* detectou-se os genes atzD, atzE e atzF e nos solos rizosféricos de *C. ferrea*, detectou-se os genes atzE e atzF. Apesar de não ter sido possível detectar o caminho completo de degradação do atrazine pelos microrganismos presentes nesse estudo, os resultados contribuem para o meio científico pela confirmação de novas espécies ainda não descritos como degradadores desse herbicida.



## ABSTRACT

**Keywords:** atrazine degradation genes, microorganisms, new generation sequencing

The metagenomic studies has been providing the discovery of genes and metabolic pathways involved in the degradation of xenobiotics. Some microorganisms have the capacity to metabolize these compounds, potentiating phytoremediation processes when associated with plant species. In this context, this study aimed to analyze the metagenome and the occurrence of atrazine degradation genes in rhizospheric soils of the phytoremediate species *Inga striata* and *Caesalpinia ferrea*. The microbial communities were analyzed by the new generation sequencing of the Illumina-Hiseq2000 platform. The most detected genera of microorganisms were *Mycobacterium*, *Conexibacter*, *Bradyrhizobium*, *Solirubrobacter*, *Rhodoplanes*, *Streptomyces*, *Geothrix*, *Gaiella*, *Nitrospira* and *Haliangium*. 9205 numbers of genes related to xenobiotic metabolism were detected. In the rhizosphere soils of *I. striata* the genes atzD, atzE and atzF were detected and in the rhizospheric soils of *C. ferrea* the genes atzE and atzF were detected. Although it was not possible to detect the complete pathway of atrazine degradation by the microorganisms present in this study, the results contribute to the scientific environment by the confirmation of new species not yet described as degraders of this herbicide.

## 1 INTRODUÇÃO

O atrazine, pertencente ao grupo das triazinas, é um herbicida bastante popular e muito utilizado nas culturas do milho e cana de açúcar. No entanto, apresenta características que lhe confere potencial mobilidade no perfil do solo (Singh et al., 2014; Martins et al., 2018) e, dessa forma, atingir áreas e organismos não-alvos (Fernández-Naveira et al., 2016; Figueira et al., 2017; Zhao et al., 2018). Diante disso, a necessidade de adotar estratégias que visem a remoção e/ou diminuição de atrazine que poderia chegar aos cursos d'água à jusante das áreas agrícolas se torna interessante. Uma das principais estratégias é pela degradação por microrganismos do solo (Ma et al., 2017, Zhao et al., 2017; Gao et al., 2018; Yang et al., 2018).

A principal via de degradação do atrazine por bactérias se inicia na presença do gene *atzA*, que o converte em hidroxiatrazine (HA) por meio da atrazine clorohidrolase. A hidroxidecloroatrazina etilaminohidrolase, codificada pelo gene *atzB*, converte o HA em N-isopropilamina (IPA) e a enzima isopropilaminohidrolase, codificada pelo gene *atzC*, em ácido cianúrico. Posteriormente, o ácido cianúrico é convertido em biureto, alofanato e CO<sub>2</sub>, pelas enzimas ácido cianúrico amidohidrolase, biureto amidohidrolase e alofanato hidrolase, codificadas pelos genes *atzD*, *atzE* e *atzF* (Seffernick et al., 2002; Shapir et al., 2002; Fruchey et al., 2003; Cheng et al., 2005; Kanamori et al., 2005; Kanamori et al., 2005; Shapir et al., 2005; Shapir et al., 2006; Seffernick et al., 2007; Balotra et al., 2015).

A mineralização completa por organismo individual já foi relatada para *Pseudomonas* sp. estirpe ADP, que possui os genes *atzABCDEFG* (Wackett et al. 2002). Há também a degradação por consórcios microbianos, contendo diferentes espécies de microrganismos, com diferentes combinações dos genes *atz* (Madariaga-Navarrete et al., 2017; Nasser et al., 2014).

Além disso, sabe-se que a região da rizosfera é um ambiente altamente favorável ao crescimento microbiano (Sindhu et al., 2014; Venturi et al., 2016; Chen et al., 2017; Xu et al., 2018). Exsudados liberados por plantas estimulam a atividade de microrganismos que podem degradar resíduos de pesticidas (Ma et al., 2017). Alguns trabalhos relataram a degradação acelerada com plantas e microrganismos agindo simultaneamente (Lu et al., 2014; Moubaster et al., 2015; dos Santos et al., 2018). O uso de plantas fitorremediadoras que se associam a microrganismos capazes de degradar o atrazine limitaria a quantidade desse herbicida que poderia chegar aos ecossistemas à jusante das áreas agrícolas.

O acesso aos genomas microbianos diretamente de amostras ambientais, conhecido como metagenômica (Bagg et al., 2014), permite o estudo taxonômico e funcional dos microrganismos presentes nessas comunidades (Bengtsson-Palme et al., 2014; Quince et al., 2017). Devido à complexidade e quantidade de dados gerados nessas abordagens, uso de ferramentas computacionais se tornam essenciais para análise (Woloszynek et al., 2018). Essas análises, aliadas à bioinformática, nos permite investigar quais microrganismos estão presentes, seus genes e as rotas metabólicas envolvidas (Lindgreen et al., 2016).

*Caesalpinia ferrea* e *Inga striata* são relatadas como tolerantes a atrazine (Aguiar et al., 2016; Fiore et al., 2016), além de opções interessantes à recomposição de áreas de preservação (Bilia et al., 2003; Gallão et al., 2013). Conhecer a rizosfera dessas espécies por técnicas baseadas em análises do DNA pode fornecer a relação de organismos diretamente envolvidos no processo de degradação, contribuindo para manejo eficiente das áreas revegetadas.

Nesse contexto, esse trabalho descreve a análise taxonômica e funcional de comunidades microbianas presentes em solos rizosféricos de espécies fitorremediadoras e a presença de genes de degradação de atrazine.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras constituíram-se de solos rizosféricos de mudas de *Caesalpinia ferrea* e *Inga striata* contaminados pelo herbicida atrazine. A dose de 5 kg ha<sup>-1</sup> foi fracionada em seis aplicações (uma a cada dez dias), depositada sobre pratos de contenção do vaso utilizando pipeta de precisão, simulando um lençol freático contaminado (Cabral et al., 2017). Cada aplicação correspondendo a 1/3 da dose comercialmente recomendada (MAPA, 2018). Portanto, total equivalente a duas vezes a dose média informada pelo fabricante. Aos 80 dias após a primeira aplicação, as amostras foram coletadas e mantidas a -80° C.

### 2.1 Extração de DNA e sequenciamento metagenômico

O DNA metagenômico foi extraído e purificado com o auxílio do PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. A concentração e qualidade do DNA foram avaliadas pelo equipamento Qubit (Thermofisher) e eletroforese em gel de agarose. O sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina Hiseq2000 (Illumina, EUA).

### 2.2 Bioinformática

A pré filtragem dos dados foi realizada pelo programa Readfq (v8 <https://github.com/cjfields/readfq>) que incluiu: a) Remoção das leituras que continham bases de baixa qualidade, b) Remoção das leituras em que N atingiu proporção superior a 10%; c) Remoção das leituras em que o adaptador tinha sobreposição superior a 15 pb.

Em seguida, as leituras de alta qualidade de cada amostra foram montadas (MEGAHIT), gerando “Scaffolds”. A partir dos “Scaffolds” foram obtidos os scaftigs (Mende et al., 2012; Nielsen et al., 2014) (SoapAligner - soap2.21, <http://soap.genomics.org.cn/soapaligner.html>). Os fragmentos maiores ou iguais a 500 pb foram usados para análises posteriores.

Os scaftigs ( $\geq 500$ bp) foram usados para previsão de ORFs (Open Reading Frame) (MetaGeneMark, Versão 2.10, <http://exon.gatech.edu/GeneMark/metagenome/Prediction>) (Li et al., 2014; Oh et al., 2014; Zhu et al., 2010). As ORFs inferiores a 100 nt foram filtradas (Zeller et al., 2014; Sunagawa et al., 2015) e excluídas das análises.

O software CD-HIT (Versão 4.5.8, <http://www.bioinformatics.org/cd-hit>) (Li et al., 2006; Fu et al., 2012) foi usado para reduzir a redundância de sequências e gerar o catálogo de genes. O gene mais longo foi escolhido como representativo (unigene).

Por meio de uso do software DIAMOND (Versão 0.7.9, <https://github.com/bbuchfink/diamond/>) as sequências foram analisadas contra banco de dados genômicos de bactérias, fungos, archaea e vírus. Utilizou-se a ferramenta blastx. Para identificar os *taxa* bacterianos, foi utilizado o algoritmo de ancestral comum mais baixo (LCA) no software MEGAN (Huson et al., 2011). Para cada unigene, os resultados blastx cujo valor inferior ou igual a  $10 \times \text{min\_valor}$  (Qin et al., 2010) foram escolhidos para posterior análise.

A anotação funcional dos metagenomas foi realizada usando o software DIAMOND (V0.7.9) por meio da ferramenta blast. Os unigenes foram analisados no banco de dados Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas (KEGG) (Versão 201609, <http://www.kegg.jp/kegg/>) (Kanehisa et al., 2006; Ondov et al., 2011).

### 2.3 Detecção de genes e microrganismos degradadores de atrazine

Do banco de dados criado a partir das amostras de solos rizosféricos de *C. ferrea* e *I. striata*, buscaram-se os genes relacionados à degradação de atrazine, conforme a tabela 1.

Tabela 1: Genes associados à degradação de atrazine, sua proteína corresponde e o caminho de degradação

| Gene        | Proteína                                    | Caminho de degradação   |
|-------------|---|---|
| <i>atzA</i> | Atrazine clorohidrolase                     | atrazine → hydroxyatrazine  |
| <i>atzB</i> | Hidroxidecloroatrazine etilaminohidrolase   | hidroxiatrazine → N-isopropilamino (IPA)<br>2-cloro-4-hidroxi-6-amino-1,3,5-triazine (chaTRZ) → amelide |
| <i>atzC</i> | N-isopropilamelida isopropilamino hidrolase | N-isopropilamelide (IPA) → ácido cianúrico<br>amelide → ácido cianúrico                                 |
| <i>atzD</i> | Ácido cianúrico amidohidrolase              | Ácido cianúrico → biureto   |
| <i>atzE</i> | Biureto hidrolase                           | Biureto → alofanato   |
| <i>atzF</i> | Alofanato hidrolase                         | Alofanato → NH <sub>3</sub> e CO <sub>2</sub>   |
| <i>trzN</i> | triazine hidrolase                          | atrazine → hidroxiatrazine  |

Adaptado de Fang et al., 2015.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Análise descritiva

Do total de genes identificados nas rizosferas de *C. ferrea* e *I. striata*, 328.653 foram comuns as duas espécies (Figura 1). No entanto, a rizosfera de *C. ferrea* e *I. striata* apresentaram 77.424 e 93.288 genes exclusivos, respectivamente.

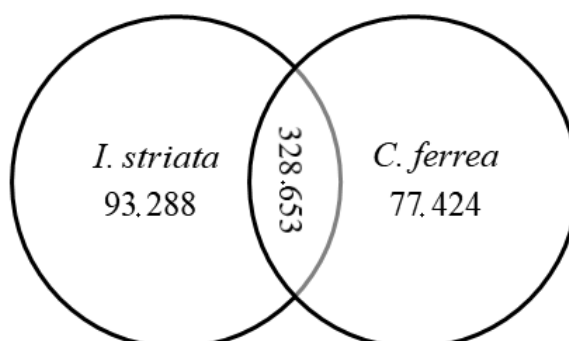


Figura 1: Diagrama de Venn dos genes dos solos rizosféricos de *C. ferrea* e *I. striata*

Nos solos rizosféricos de *I. striata* e *C. ferrea*, o grupo de microrganismos predominante foi *Bacteria*, com 92% e 91%, respectivamente (Figura 2). Em torno de 6% e 7% não foram identificados.

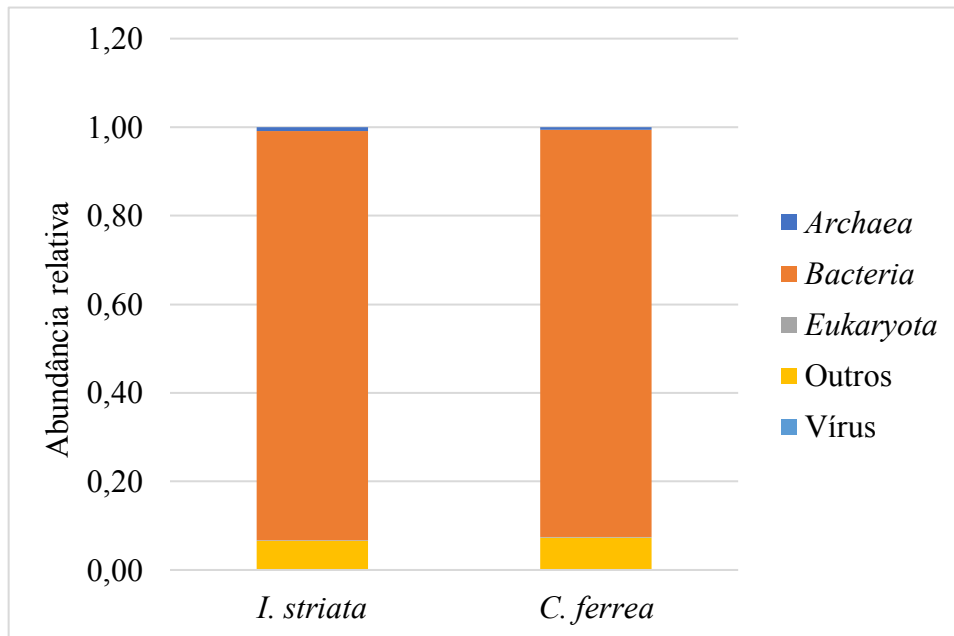


Figura 2: Abundância relativa de espécies em diferentes grupos de microrganismos em rizosféricos de *I. striata* e *C. ferrea*

Os gêneros de microrganismos mais abundantes nas rizosferas de *C. ferrea* e *I. striata* consistiram de *Mycobacterium*, *Conexibacter*, *Bradyrhizobium*, *Solirubrobacter*, *Rhodoplanes*, *Streptomyces*, *Geothrix*, *Gaiella*, *Nitrospira* e *Haliangium* (Figura 3).

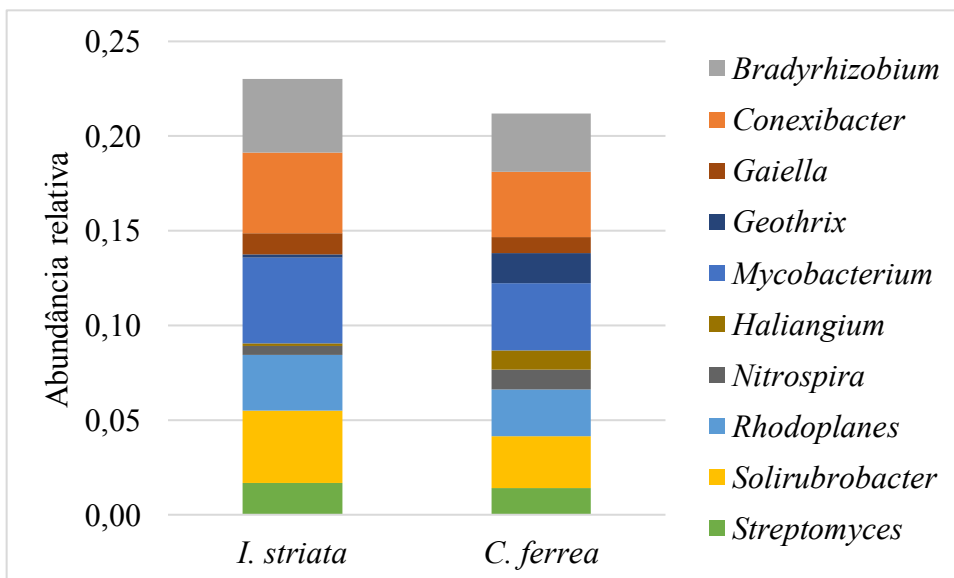


Figura 3: Abundância relativa de espécies em nível de gênero nos solos rizosféricos de *I. striata* e *C. ferrea*.

### 3.2. Análise de função

A anotação baseada no banco de dados KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) permitiu identificar as funções gênicas de Doenças humanas, Metabolismo, Processamento de informação ambiental e genética, Processos celulares e Sistemas organizáveis, nas amostras em estudo (Figura 4).

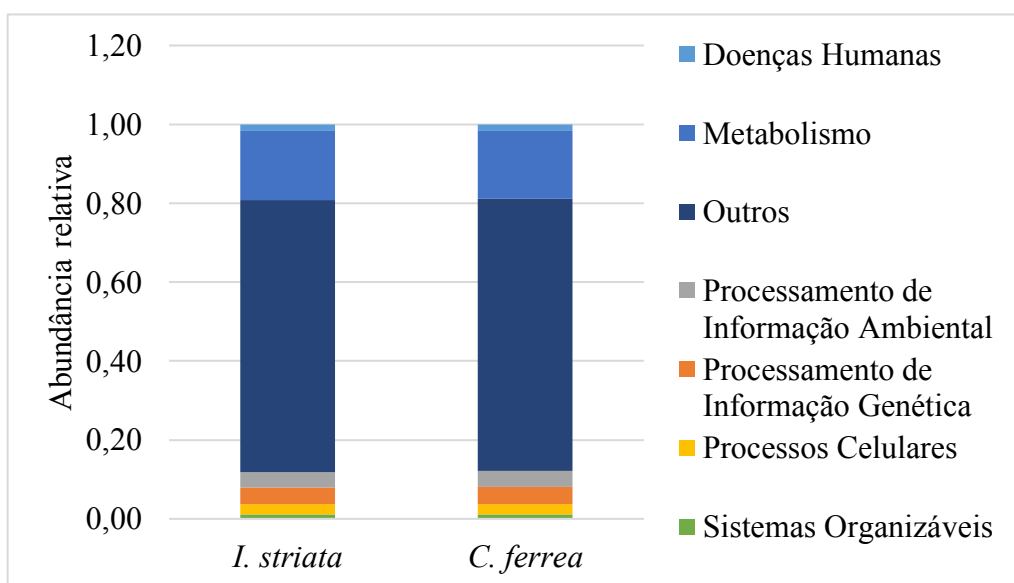


Figura 4: Abundância relativa de funções metabólicas nos solos rizosféricos de *I. striata* e *C. ferrea*.

Na função “Metabolismo”, detectou-se genes relacionados a Biossíntese e metabolismo de glicanos, Biossíntese e outros metabolismos secundários, Degradação e metabolismo de xenobióticos, Mapas globais e de visão geral, Metabolismo de aminoácidos, Metabolismo de carboidratos, Metabolismo de cofatores e vitaminas, Metabolismo energético, Metabolismo de lipídeos, Metabolismo de nucleotídeos, Metabolismo de outros aminoácidos e Metabolismo de terpenóides e policetilenos (Figura 5).

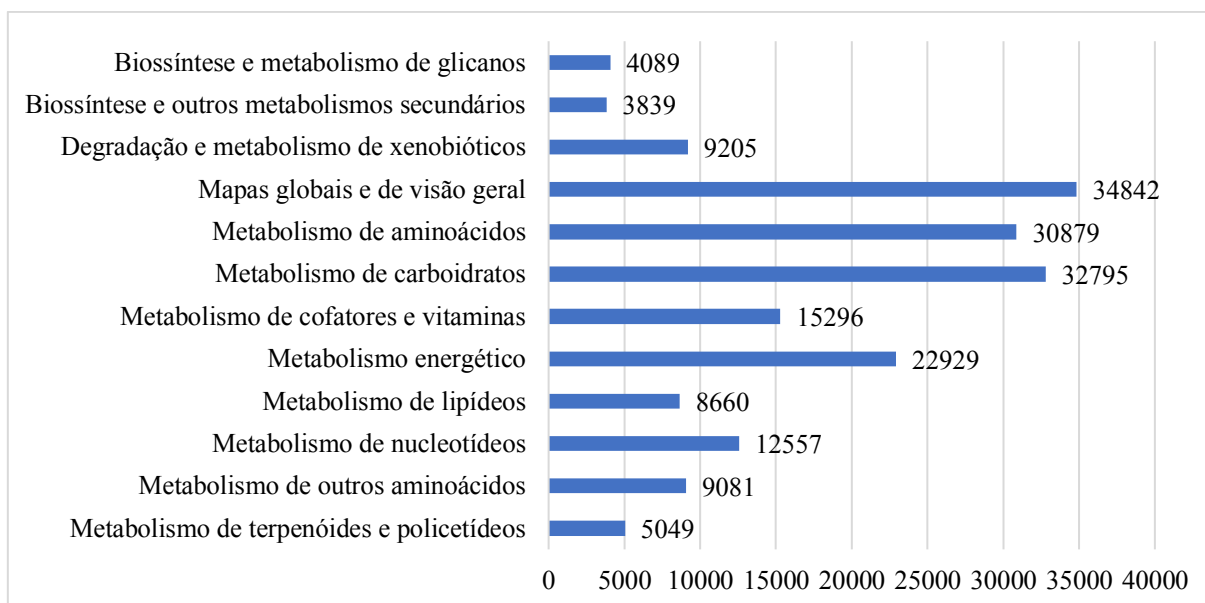


Figura 5: Anotação de função “Metabolismo” pelo banco de dados “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)”

### 3.2.1. Detecção dos genes de degradação do atrazine

Nos solos rizosféricos de *I. striata* foram detectados os genes *atzD*, *atzE* e *atzF* e nos solos rizosféricos de *C. ferrea* foram detectados os genes *atzE* e *atzF* (Tabela 2).

Tabela 2: Genes associados à degradação de atrazine detectados nos solos rizosféricos de *I. striata* e *C. ferrea*

|                                       | <i>trzN</i> | <i>atzA</i> | <i>atzB</i> | <i>atzC</i> | <i>atzD</i> | <i>atzE</i> | <i>atzF</i> |
|---------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Solo rizosférico de <i>I. striata</i> | -           | -           | -           | -           | +           | +           | +           |
| Solo rizosférico de <i>C. ferrea</i>  | -           | -           | -           | -           | -           | +           | +           |

Nos solos rizosféricos de *I. striata* foram detectados diferentes microrganismos contendo algum gene de degradação do atrazine, no entanto, apenas alguns em um nível taxonômico mais detalhado (Tabela 3). Os genes detectados no solo rizosférico de *I. striata*, com seus respectivos genes no caminho de degradação do atrazine, estão apresentados na figura 6.



Tabela 3: Microrganismos e seus genes de degradação de atrazine detectados em solo rizosférico de *Inga striata*.

| Microrganismos                   | Genes                     |
|----------------------------------|---------------------------|
| <i>Agrobacterium rhizogenes</i>  | <i>atzD</i>               |
| <i>Bradyrhizobium</i> sp. Ec3.3  | <i>atzE</i>               |
| <i>Granulicella mallensis</i>    | <i>atzF</i>               |
| <i>Micromonospora</i>            | <i>atzF</i>               |
| <i>Pseudolabrys</i> sp. Root1462 | <i>atzD</i>               |
| <i>Rhodoplanes</i> sp. Z2-YC6860 | <i>atzD</i> , <i>atzE</i> |

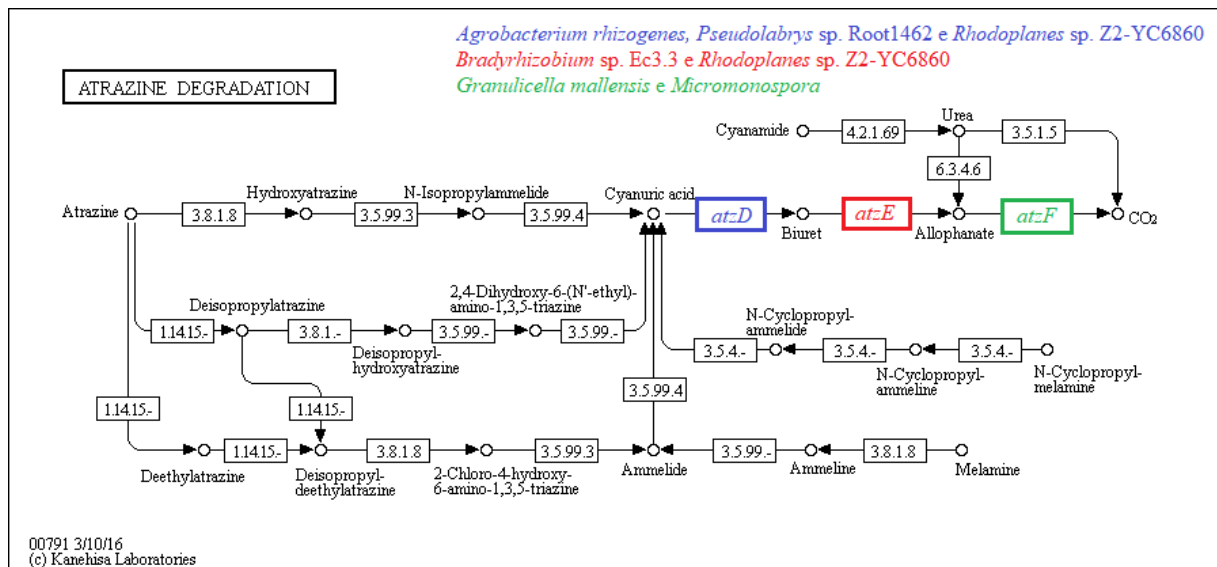


Figura 6: Rota de degradação do atrazine adaptado do KEGG pathway map contendo os genes e microrganismos correspondentes encontrados nessa pesquisa, no solo rizosférico de *I. striata*.

No solo rizosférico de *C. ferrea* foram detectados diferentes microrganismos contendo algum gene de degradação do atrazine, no entanto, apenas alguns apresentaram um nível taxonômico mais detalhado (Tabela 4). Os genes detectados no solo rizosférico de *C. ferrea* com seus respectivos genes no caminho de degradação do atrazine estão apresentados na figura 7.

Tabela 4: Microrganismos e seus genes de degradação de atrazine detectados em solo rizosférico de *C. ferrea*.

| Microrganismos   | Genes       |
|--|-------------|
| Bradyrhizobiaceae  | <i>atzE</i> |
| <i>Bradyrhizobium</i>                                    | <i>atzF</i> |
| <i>Candidatus Muproteobacteria bacterium</i> RBG_16_60_9 | <i>atzF</i> |
| <i>Thioalkalivibrio sulfidiphilus</i>                    | <i>atzF</i> |

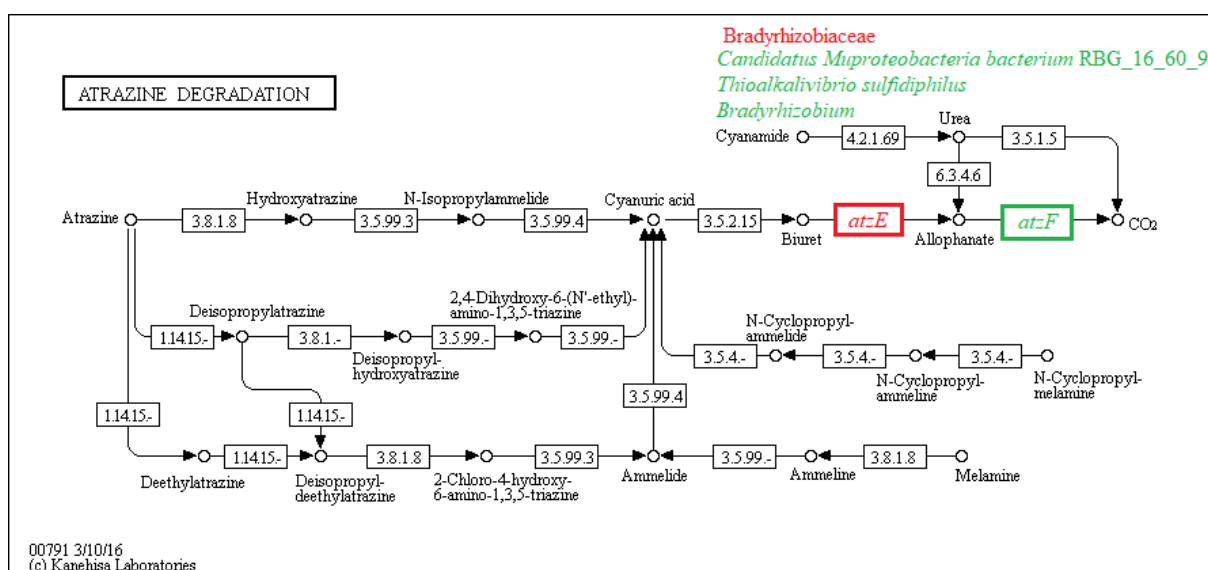


Figura 7: Rota de degradação do atrazine adaptado do KEGG pathway map contendo os genes e microrganismos correspondentes encontrados nessa pesquisa, no solo rizosférico de *C. ferrea*.

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Análise descritiva

A grande quantidade de genes detectados nas amostras se deve a rizosfera ser uma região bastante diversa e favorável ao crescimento microbiano, devido à liberação de exsudados pelas plantas que servem como alimentos para as comunidades (Eevers et al., 2017). As espécies vegetais utilizadas nesse estudo são pertencentes a mesma família, Fabaceae, que possuem raízes capazes de associar com rizóbios e fungos formadores de micorrizas (Souza et al., 2012). Esses microrganismos contribuem para o desenvolvimento das plantas (Wu et al., 2012; Fan & Song, 2014) e para a degradação de herbicidas (Zhang et al., 2018). O predomínio de *Bacteria* observado nas amostras de solo é devido esse grupo ser considerado o mais

abundante e diverso dentre os microrganismos do solo (Buckley & Schimidt, 2002; Garrity et al., 2002). No entanto, grande quantidade de informação relacionada à diversidade microbiana ainda é desconhecida (Fierer et al., 2007).

Os gêneros de microrganismos mais abundantes detectados nas amostras consistiram em *Mycobacterium*, *Conexibacter*, *Bradyrhizobium*, *Solirubrobacter*, *Rhodoplanes*, *Streptomyces*, *Geothrix*, *Gaiella*, *Nitrospira* e *Haliangium*. *Mycobacterium*, *Conexibacter*, *Solirubrobacter*, *Streptomyces* e *Gaiella* são gêneros pertencentes ao filo Actinobacteria. *Mycobacterium* é caracterizado por apresentar espécies patogênicas como *M. tuberculosis* e *M. leprae* causadores da tuberculose e hanseníase, respectivamente, e que são importantes problemas de saúde pública no mundo (Berry et al., 2010; Sampaio et al., 2011; Pfyffer, 2015). Além disso, existem mais de 150 espécies que são caracterizadas como micobactérias não tuberculosas, oportunistas, cujos reservatórios incluem solo rico em turfa e água potável em prédios e agregados familiares (Falkinham, 2013).

O gênero *Streptomyces* é caracterizado por possuir espécies que produzem metabólitos secundários bioativos, como antifúngicos, antivirais, antitumorais, anti-hipertensivos, imunossupressores e antibióticos (de Lima Procópio et al., 2012). Cepas de *Streptomyces* são habitualmente encontradas em rizosferas e exercem atividade de biocontrole contra patógenos em plantas (Bonaldi et al., 2015; Chen et al., 2016; Viaene et al., 2016; Sujarit et al., 2016). O gênero *Solirubrobacter* (Singleton et al., 2003) é representado por poucas espécies (Whitman, 2015). Possui membros isolados de solos agrícolas, caules, raízes de plantas e esponjas marinhas (Kim et al., 2007; An et al., 2011; Kampfer et al., 2014; Zhang et al., 2014; Wei et al., 2014). O gênero *Conexibacter* (Monciardini et al., 2003) tem como representante a espécie *Conexibacter woesei*. Essa espécie é de vida livre e é um patógeno (Pukall et al., 2010). Já foi detectada em turfeiras (Dedysh et al., 2006), rizosfera (Mirete et al., 2007) e solo (Seki et al., 2012). O gênero *Gaiella* é representada pela espécie *Gaiella oculta* que foi isolada de um aquífero em Portugal (Albuquerque et al., 2011).

*Bradyrhizobium*, *Rhodoplanes* e *Haliangium* pertencem ao filo Proteobacteria. O gênero *Bradyrhizobium* é constituído por bactérias que realizam associações simbióticas com leguminosas e induzem à formação de nódulos fixadores de nitrogênio em suas raízes (Rivas et al., 2009), e são caracterizados como organismos ecologicamente e economicamente importantes (Vanlnsberghe et al., 2015). Esses microrganismos se associam benéficamente com leguminosas, como *Cytisus villosus* (Chahboune, et al., 2011), soja (Brenchenmacher et al.,

2010; Delmotte et al., 2010) e amendoim (Wang et al., 2013). No entanto, existem membros não simbióticos e com associações não-leguminosas (Vanlnsberghe et al., 2015). Membros de *Rhodoplanes* foram encontrados em lodo ativado, solo, água e rizosfera (Hiraishi & Ueda, 1994; Laksmi et al., 2009; Chakravarthy et al., 2012; Srinivas et al., 2014) e uma cepa foi identificada como patógeno humano (Zhang et al., 2011). Algumas espécies do gênero *Haliangium* (Fudou et al., 2002) possuem função de desnitrificação em estações de águas residuais (McIlroy et al., 2016).

*Geothrix* pertence ao filo Acidobacteria e é um grupo relevante de bactérias em ambientes contaminados por hidrocarbonetos; é redutora de Ferro (III) e a espécie *Geothrix fermentans* é produtora de magnetita (Coates et al., 1999; Nevin & Lovley, 2002; Klueglein et al., 2013). *Nitrospira* pertence ao filo Nitrospirae e estão associados à oxidação de nitrito e amônia (Daims et al., 2015; Gruber-Dorninger et al., 2015; Koch et al., 2015).

## 4.2 Análise de função

O KEGG é um conjunto de banco de dados que possibilita acesso às informações de genoma e vias metabólicas e tem como principal objetivo estabelecer as ligações entre os genes e funções da célula e do organismo (Kanehisa et al., 2015). Além de dados genômicos, esse banco de dados é utilizado para análises de transcriptômica, proteômica, glicômica e metabolômica (Kanehisa et al., 2016). O “KEGG PATHWAY” é uma coleção de mapas de rotas e consiste em seis categorias: Metabolismo, Processamento de Informação Genética, Processamento de Informação Ambiental, Processos Celulares, Sistemas Organizáveis e Doenças Humanas (Kanehisa et al., 2019).

### 4.2.1 Detecção dos genes de degradação do atrazine

A não detecção dos genes de degradação do atrazine da via superior da rota (genes *atzABC*), pode ser devido ao fato de os genes estarem em níveis muito baixos e/ou as comunidades que estão envolvidas não estar presentes quando o DNA da comunidade foi extraído (Omotayo et al., 2011), ou ainda o atrazine não ser a fonte primária de substrato para esses microrganismos (Yale et al., 2017). Isso também sugere que a degradação do atrazine nos solos rizosféricos de *C. ferrea* e *I. striata* envolvem microrganismos que possuem caminhos cooperativos, como um consórcio microbiano (Dehghani et al., 2013; Douglass et al., 2017). Diferentes consórcios microbianos vêm sendo relatados como capazes de degradar atrazine, como a cooperação de *Klebsiella* sp. A1 e *Comamonas* sp. A2 (Yang et al., 2009) e

*Rhodococcus* e *Bacillus* (Kolekar et al., 2019). Poucas bactérias isoladas conseguem mineralizar o atrazine por completo (Sagarkar et al., 2014), como por exemplo, *Pseudomonas* sp. estirpe ADP (Mandelbaum et al., 1995), que é considerada o organismo modelo na degradação de atrazine. Essa linhagem, utiliza o atrazine como única fonte de nitrogênio para crescimento (de Souza et al., 1998). *Pseudomonas* sp. estirpe ADP apresenta os genes responsáveis pela via de degradação completa, *atzABCDEF*, localizados no plasmídeo ADP-1 (Martinez et al., 2001).

A detecção dos genes da via inferior (*atzDEF*) pode ser devido ao momento adotado para análise do metagenoma, que foi feita aos 80 dias após a primeira aplicação do atrazine. Nesse momento, foram estimados 99% de degradação nos solos rizosféricos de *C. ferrea* e *I. striata*, respectivamente, por testes de bioensaio (dados não apresentados). A presença dos genes *atzD*, *atzE* e *atzF* sugere que a existência do ácido cianúrico pode ter levado à proliferação de bactérias que possuem os genes de quebra do anel, pela pressão de seleção, para transformá-lo nos metabólitos finais (Reardon et al., 2004). Na rota inferior, a clivagem do anel s-triazina é considerada o passo mais importante na degradação do atrazine, que pode resultar na remoção completa do herbicida do meio ambiente (Bhardwaj et al., 2015). A partir de biureto e alofanato também pode gerar como produto final, ureia, CO<sub>2</sub> e NH<sub>3</sub> (Wang et al., 2014). É possível que no presente trabalho tenha produzido ureia, devido à detecção dos genes *UreA*, *UreB* e *UreC*. O gene *atzD* também é utilizado como marcador molecular para estimar o desempenho das comunidades microbianas mineralizando atrazine, por ser o primeiro da via inferior (Monard, et al., 2013; Whang et al., 2014). Os genes *atzDEF* são regulados por um operon, enquanto os genes *atzA*, *atzB* e *atzC* são dispersos, principalmente, no plasmídeo das bactérias (Devers et al., 2005), mas, também, no cromossomo (Devers et al., 2007). Os genes catabólicos do atrazine podem ser recrutados ou perdidos (Devers et al., 2005) por transferência horizontal e conjugação de plasmídeos (Devers et al., 2007), o que contribui para dispersão no ambiente.

#### 4.2.2 Microrganismos contendo os genes de degradação de atrazine

*Agrobacterium rhizogenes*, detectada no solo rizosférico de *I. striata*, é uma bactéria patogênica por causar proliferação de raízes pilosas devido à transferência de seu DNA para o genoma da planta (Moore et al., 1979; Nilsson & Olsson, 1997; Peláez et al., 2017). Essa espécie é caracterizada pela produção de grande quantidade de metabólitos secundários que possuem fins comerciais (Gabr et al., 2016; Parr, 2016). *Agrobacterium rhizogenes* não foi

relacionada anteriormente a nenhuma etapa da degradação de atrazine e, nesse trabalho, foi associada à amidohidrolase de ácido cianúrico pela presença do gene *atzD*.

*Bradyrhizobium* sp. ec3.3, detectada no solo rizosférico de *I. striata*, já foi detectada em raízes de outras leguminosas, como *Clitoria javitensis*, *Erythrina costaricensis*, *Rhynchosia pyramidalis* e *Desmodium axillare* (Parker, 2001; Reeve et al., 2015) e foi associado a amidohidrolase de ácido cianúrico (*atzD*) (Wackett et al., 2014) e, nesse trabalho, detectado o gene *atzF*.

*Granulicella mallensis* (Rawat et al., 2013) e *Rhodoplanes* sp. Z2-YC6860 (GCA\_001579845.1), detectadas no solo rizosférico de *I. striata*, já tiveram seus genomas sequenciados e foram associados à degradação de atrazine pelo KEGG Orthology (KO). O KO é um banco de dados de funções moleculares representadas por genes ortólogos funcionais, ou seja, que apresentam um ancestral comum. Quando uma rota é definida, cada gene associado a ela apresenta um identificador, número K, e genes e proteínas que são detectados experimentalmente são usados para encontrar ortólogos funcionais em outros organismos (Mao et al., 2005; Kanehisa et al., 2011). *G. mallensis* foi isolada de um solo de tundra (Männistö et al., 2012) e associado a hidrolase de alofanato (gene *atzE*) (K01457; BR:gma00001) e, nesse trabalho, associado a hidrolase de alofanato, pela detecção do gene *atzF*. *Rhodoplanes* sp. Z2-YC6860 já foi associado a amidohidrolase de ácido cianúrico, biureto e alofanato (genes *atzD*, *atzE* e *atzF*) (K03383, K19837 e K01457; BR:rhz00001) e, nesse trabalho, detectado esses mesmos genes.

O gênero *Micromonospora*, detectado no solo rizosférico de *I. striata*, é considerado importante fonte de antibióticos (Wagman, 1980) e alguns representantes já foram isolados de solos rizosféricos e ambientes marinhos (Martínez-Hidalgo et al., 2015; Baun et al., 2018; Carro et al., 2018). Seus membros apresentam atividade promotora de crescimento em plantas leguminosas e não leguminosas e biodegradação (Martínez-Hidalgo et al., 2015; Baun et al., 2018). Esse gênero, recentemente, foi detectado em solo contaminado com propazine, herbicida também pertencente ao grupo das triazinas (Jian et al., 2017) e é frequentemente associado à degradação de pesticidas, como lindano, aldrin, carbofuran, chlorpyrifos, diazinon e diuron (Benimeli et al., 2006; Fuertes et al., 2011; Li et al., 2011; Huang et al., 2018). No entanto, até o momento não há relatos da presença de genes de degradação do atrazine nos genomas de membros de *Micromonospora*, sendo o gene *atzF* detectado nesse trabalho.

*Pseudolabrys* sp. Root1462, detectada no solo rizosférico de *I. striata*, foi isolada da raiz de *Arabidopsis thaliana* na Alemanha, teve seu genoma completo sequenciado (Bai et al., 2015) e foi associada à degradação de ácido cianúrico pelo BioCyc, gerado computacionalmente, sem revisão manual, pela detecção do gene *atzD* que também foi detectado nesse trabalho. O BioCyc é um portal da web com informações sobre genomas microbianos e vias metabólicas (Karp et al., 2015). Esse portal combina informações de outras bases de dados por meio de programas de computador (Karp et al., 2017). Os bancos de dados da BioCyc são organizados em dados que receberam curadoria manual pelo menos durante um ano, receberam revisão moderada equivalente há menos de um ano e dados criados computacionalmente que não receberam nenhuma revisão ou atualização manual (Caspi et al., 2014).

Membros da família Bradyrhizobiaceae e, principalmente, do gênero *Bradyrhizobium*, detectados no solo rizosférico de *C. ferrea*, são comumente detectados em solos contaminados com atrazine e associados a sua degradação (Laurent et al., 2006; Fang et al., 2015; Rehan, 2016; Rehan et al., 2017) e, nesse trabalho, foi detectado o gene *atzF* especificamente no gênero e o gene *atzE* em Bradyrhizobiaceae.

*Candidatus Muproteobacteria bacterium* RBG\_16\_60\_9 (GCA\_001785035.1), detectado no solo rizosférico de *C. ferrea*, é um organismo ainda não cultivado, com nome provisório e derivado de metagenoma (Anantharaman et al., 2016), mas sem informações de genes disponíveis nos bancos de dados, sendo esse o primeiro relato dessa espécie contendo genes de degradação do atrazine, e, nesse trabalho, detectado o gene *atzF*.

*Thioalkalivibrio sulfidiphilus* (Muyzer et al., 2011), detectado no solo rizosférico de *C. ferrea*, foi isolada de um biorreator oxidante de sulfureto (Sorokin et al., 2012) e foi associado à hidrolase de alofanato (*atzE*) (K01457; BR:tgr00001) e, nesse trabalho, detectado o gene *atzF*.

## 5 CONCLUSÃO

- Os gêneros de microrganismos predominantes nos solos rizosféricos de *I. striata* e *C. ferrea* foram *Mycobacterium*, *Conexibacter*, *Bradyrhizobium*, *Solirubrobacter*, *Rhodoplanes*, *Streptomyces*, *Geothrix*, *Gaiella*, *Nitrospira* e *Haliangium*;
- Os genes *atzD*, *atzE* e *atzF* foram detectados nos solos rizosféricos de *I. striata* e *atzE* e *atzF* nos solos rizosféricos de *C. ferrea*;

- A rizodegradação compõe o processo para diminuição de resíduos do atrazine pelas espécies *I. striata* e *C. ferrea*;
- Primeiro relato do gênero *Micromonospora* como degradador de atrazine;
- Primeiro relato de *Agrobacterium rhizogenes* e *Candidatus Muproteobacteria bacterium* RBG\_16\_60\_9 como degradadores de atrazine.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- An, D.S., Wang, L., Kim, M.S., Bae, H.M., Lee, S.T., Im, W.T. 2011. *Solirubrobacter ginsenosidimutans* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61 (11): 2606-2609.
- Anantharaman, K., Brown, C.T., Hug, L.A., Sharon, I., Castelle, C.J., Probst, A.J., Thomas, B.C., et al. 2016. Thousands of microbial genomes shed light on interconnected biogeochemical processes in an aquifer system. *Nature Communications*, 7: 13219.
- Albuquerque, L., França, L., Rainey, F.A., Schumann, P., Nobre, M.F., da Costa, M.S. 2011. *Gaiella occulta* gen. nov., sp. nov., a novel representative of a deep branching phylogenetic lineage within the class Actinobacteria and proposal of Gaiellaceae fam. nov. and Gaiellales ord. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 34 (8): 595-599.
- Aguiar, L.M., Barbosa dos Santos, J., Antunes da Costa, V., Almeida Brito, L., Alves Ferreira, E., Marinho Pereira, I., Aspiazú, I. 2016. Herbicide tolerance and water use efficiency in forest species used in degraded areas recovery programs. *Bosque*, 37 (3): 493-500.
- Balotra S., Warden A.C., Newman J., Briggs L.J., Scott C., Peat T.S. 2015. X-Ray structure and mutagenesis studies of the N-Isopropylammelide Isopropylaminohydrolase, AtzC. *PLoS One*, 10: e0137700.
- Bengtsson-Palme, J., Boulund, F., Fick, J., Kristiansson, E., Larsson, D.G. 2014. Shotgun metagenomics reveals a wide array of antibiotic resistance genes and mobile elements in a polluted lake in India. *Frontiers in Microbiology*, 5: 648.
- Benimeli, C.S., Castro, G.R., Chaile, A.P., Amoroso, M.J. 2006. Lindane removal induction by *Streptomyces* sp. M7. *Journal of Basic Microbiology*, 46 (5): 348-357.



- Berry, M.P., Graham, C.M., McNab, F.W., Xu, Z., Bloch, S.A., Oni, T., Wilkinson, K.A., et al. 2010. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature*, 466 (7309): 973.
- Bhardwaj, P., Sharma, A., Sagarkar, S., Kapley, A. 2015. Mapping atrazine and phenol degradation genes in *Pseudomonas* sp. EGD-AKN5. *Biochemical Engineering Journal*, 102: 125-134.
- Bonaldi, M., Chen, X., Kunova, A., Pizzatti, C., Saracchi, M., Cortesi, P. 2015. Colonization of lettuce rhizosphere and roots by tagged *Streptomyces*. *Frontiers in Microbiology*, 6: 25.
- Bragg, L., Tyson, G.W. 2014. Metagenomics using next-generation sequencing. *Environmental Microbiology*, 183–201.
- Braun, D. R., Chevrette, M.G., Acharya, D.D., Currie, C.R., Rajsiki, S.R., Bugni, T.S. 2018. Draft genome sequence of *Micromonospora* sp. strain WMMA1996, a marine Sponge-associated bacterium. *Genome Announcements*, 6 (8): e00077-18.
- Brechenmacher, L., Lei, Z., Libault, M., Findley, S., Sugawara, M., Sadowsky, M.J., Sumner, L.Y., Stacey, G. 2010. Soybean metabolites regulated in root hairs in response to the symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiology*, 153 (4): 1808-1822.
- Buckley, D.H., & Schmidt, T.M. 2002. Exploring the biodiversity of soil - a microbial rain forest. *Biodiversity of Microbial Life*, 183-208.
- Carro, L., Veyisoglu, A., Cetin, D., Igual, J.M., Klenk, H.P., Trujillo, M.E., Sahin, N. 2018. A study of three bacteria isolated from marine sediment and description of *Micromonospora globispora* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.11.003>.
- Caspi, R., Altman, T., Billington, R., Dreher, K., Foerster, H., Fulcher, C.A., Holland, T.A., et al. 2014. "The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases." *Nucleic Acids Research*, 42 (1): D459-D471.
- Chahboune, R., Carro, L., Peix, A., Barrijal, S., Velázquez, E., Bedmar, E.J. 2011. *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61 (12): 2922-2927.

- Chakravarthy, S.K., Ramaprasad, E.V.V., Shobha, E., Sasikala, C., Ramana, C.V. 2012. *Rhodoplanes piscinae* sp. nov. isolated from pond water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62 (12): 2828-2834.
- Chen, S., Li, X., Lavoie, M., Jin, Y., Xu, J., Fu, Z., Qian, H. 2017. Diclofop-methyl affects microbial rhizosphere community and induces systemic acquired resistance in rice. *Journal of Environmental Sciences*, 51: 352–360.
- Chen, X., Pizzatti, C., Bonaldi, M., Saracchi, M., Erlacher, A., Kunova, A., Berg, G., et al. 2016. Biological control of lettuce drop and host plant colonization by rhizospheric and endophytic streptomycetes. *Frontiers in Microbiology*, 7: 714.
- Cheng G, Shapir N, Sadowsky MJ, Wackett LP. 2015. Allophanate hydrolase, not urease, functions in bacterial cyanuric acid metabolism. *Applied Environmental Microbiology*, 71 (8): 4437-45.
- Coates, J.D., Ellis, D.J., Gaw, C.V., Lovley, D.R. 1999. *Geothrix fermentans* gen. nov., sp. nov., a novel Fe (III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49 (4): 1615-1622.
- Daims, H., Lebedeva, E.V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, M., et al. 2015. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, 528 (7583): 504.
- de Lima Procópio, R.E., da Silva, I.R., Martins, M.K., de Azevedo, J.L., de Araujo, J.M. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16 (5): 466-471.
- de Souza, M.L., Sadowsky, M.J., Wackett, L.P. 1996. Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. strain ADP: gene sequence, enzyme purification, and protein characterization. *Journal of Bacteriology*, 178 (16): 4894-900.
- Dedysh, S.N., Pankratov, T.A., Belova, S.E., Kulichevskaya, I.S., Liesack, W. 2006. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria community composition in an acidic Sphagnum peat bog. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (3): 2110-2117.
- Dehghani, M., Nasseri, S., Hashemi, H. 2013. Study of the bioremediation of atrazine under variable carbon and nitrogen sources by mixed bacterial consortium isolated from corn field

soil in Fars province of Iran. Journal of Environmental and Public Health. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/973165>.

Delmotte, N., Ahrens, C.H., Knief, C., Qeli, E., Koch, M., Fischer, H.M., Volhert, J.A., et al. 2010. An integrated proteomics and transcriptomics reference data set provides new insights into the *Bradyrhizobium japonicum* bacteroid metabolism in soybean root nodules. Proteomics, 10 (7): 1391-1400.

Devers, M., El Azhari, N., Kolic, N.U., Martin-Laurent, F. 2007. Detection and organization of atrazine-degrading genetic potential of seventeen bacterial isolates belonging to divergent taxa indicate a recent common origin of their catabolic functions. FEMS Microbiology Letters, 273 (1): 78-86.

Devers, M., Henry, S., Hartmann, A., & Martin-Laurent, F. 2005. Horizontal gene transfer of atrazine-degrading genes (atz) from *Agrobacterium tumefaciens* St96-4 pADP1::Tn5 to bacteria of maize-cultivated soil. Pest Management Science, 61(9): 870–880.

dos Santos, N.M.C., da Costa, V.A.M., de Araújo, F.V., Alencar, B.T.B., Ribeiro, V.H.V., Okumura, F., Simeone, L.M.F., dos Santos, J.B. 2018. Phytoremediation of Brazilian tree species in soils contaminated by herbicides. Environmental Science and Pollution Research, 25 (27): 27561-27568.

Douglass, J.F., Radosevich, M., & Tuovinen, O.H. 2017. Microbial attenuation of atrazine in agricultural soils: biometer assays, bacterial taxonomic diversity, and catabolic genes. Chemosphere, 176, 352-360.

Fan X., Song, F. 2014. Bioremediation of atrazine: recent advances and promises. Journal of Soils and Sediments 14 (10): 1727–1737.

Falkinham III, J.O. 2013. Ecology of nontuberculous mycobacteria - where do human infections come from? In Seminars in respiratory and critical care medicine. Thieme Medical Publishers, 34 (1): 095-102.

Fernández-Naveira, A., Rioboo, C., Cid, A., Herrero, C. 2016. Atrazine induced changes in elemental and biochemical composition and nitrate reductase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. European Journal of Phycology, 51 (3): 338-345.

Figueira, F.H., de Aguiar, L.M., da Rosa, C.E. 2017. Embryo-larval exposure to atrazine reduces viability and alters oxidative stress parameters in *Drosophila melanogaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 191: 78-85.

Fierer, N., Breitbart, M., Nulton, J., Salamon, P., Lozupone, C., Jones, R., Robeson, M., et al. 2007. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (21): 7059-7066.

Fiore, R.D.A., Santos, J.B.D., Ferreira, E.A., Cabral, C.M., Pereira, I.M. 2016. Growth and nutritional analysis of tree species in contaminated substrate by leachable herbicides. *Revista Árvore*, 40 (4): 585-594.

Fruchey, I., Shapir, N., Sadowsky, M.J., Wackett, L.P. 2003. On the origins of cyanuric acid hydrolase: purification, substrates, and prevalence of AtzD from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 3653-7.

Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., Li, W. 2012. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 28 (23): 3150-3152.

Fudou, R., Jojima, Y., Iizuka, T., Yamanaka, S. 2002. *Haliangium ochraceum* gen. nov., sp. nov. and *Haliangium tepidum* sp. nov.: novel moderately halophilic myxobacteria isolated from coastal saline environments. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 48 (2): 109-115.

Fuentes, M.S., Sáez, J.M., Benimeli, C.S., Amoroso, M.J. 2011. Lindane biodegradation by defined consortia of indigenous *Streptomyces* strains. *Water, Air, & Soil Pollution*, 222 (1-4): 217–231.

Gabr, A.M., Mabrok, H.B., Ghanem, K.Z., Blaut, M., Smetanska, I. 2016. Lignan accumulation in callus and *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root cultures of flax (*Linum usitatissimum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 126 (2): 255-267.

Gallão, M.I., Normando, L.D.O., Vieira, Í.G., Mendes, F.N., Ricardo, N.M., de Brito, E.S. 2013. Morphological, chemical and rheological properties of the main seed polysaccharide from *Caesalpinia ferrea* Mart. *Industrial Crops and Products*, 47: 58-62.

Gao, J., Song, P., Wang, G., Wang, J., Zhu, L., Wang, J. 2018. Responses of atrazine degradation and native bacterial community in soil to *Arthrobacter* sp. strain HB-5. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 159: 317-323.

Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T.G. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg.

Gruber-Dorninger, C., Pester, M., Kitzinger, K., Savio, D. F., Loy, A., Rattei, T., Wagner, M., et al. 2015. Functionally relevant diversity of closely related *Nitrospira* in activated sludge. *The ISME Journal*, 9 (3): 643.

Hiraishi, A., Ueda, Y. 1994. *Rhodoplanes* gen. nov., a new genus of phototrophic bacteria including *Rhodopseudomonas rosea* as *Rhodoplanes roseus* comb. nov. and *Rhodoplanes elegans* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44 (4): 665-673.

Huang, Y., Xiao, L., Li, F., Xiao, M., Lin, D., Long, X., Wu, Z. 2018. Microbial degradation of pesticide residues and an emphasis on the degradation of cypermethrin and 3-phenoxy benzoic acid: a review. *Molecules*, 23 (9): 2313.

Huson, D.H., Mitra, S., Ruscheweyh, H.J., Weber, N., Schuster, S.C. 2011. Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. *Genome Research*, 21: 1552–1560.

Jia, B., Raphenya, A.R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K.K., Lago, B.A., et al. 2017. Expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, 45: 566–573.

Jiang, C., Lu, Y.C., Xu, J.Y., Song, Y., Song, Y., Zhang, S.H., Ma, L.Y., et al. 2017. Activity, biomass and composition of microbial communities and their degradation pathways in exposed propazine soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145: 398–407.

Kämpfer, P., Glaeser, S.P., Busse, H.J., Abdelmohsen, U.R., Hentschel, U. 2014. *Rubrobacter aplysinae* sp. nov., isolated from the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64 (3): 705-709.

- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., Morishima, K. 2016. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Research*, 45 (1): 353-361.
- Kanehisa, M., Goto, S., Hattori, M., Aoki-Kinoshita, K.F., Itoh, M., Kawashima, S., Araki, M., et al. 2006. From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Research*, 34 (1): D354–357.
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M., Tanabe, M. 2011. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Research*, 40 (1): 109-114.
- Kanehisa, M., Sato, Y., Furumichi, M., Morishima, K., Tanabe, M. 2018. New approach for understanding genome variations in KEGG. *Nucleic Acids Research*, 47 (1): 590-595.
- Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., Tanabe, M. 2015. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Research*, 44 (1): 457-462.
- Kanamori, T., Kanou, N., Kusakabe, S., Atomi, H., Imanaka, T. 2005. Allophanate hydrolase of *Oleomonas sagaranensis* involved in an ATP-dependent degradation pathway specific to urea. *FEMS Microbiology Letters*, 245 (1): 61-65.
- Karp, P.D., Billington, R., Caspi, R., Fulcher, C.A., Latendresse, M., Kothari, A., Keseler, I.M., et al. 2017. The BioCyc collection of microbial genomes and metabolic pathways. *Briefings in Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx085>
- Karp, P.D., Billington, R., Holland, T.A., Kothari, A., Krummenacker, M., Weaver, D., Latendresse, M., et al. 2015. Computational metabolomics operations at BioCyc.org. *Metabolites*, 5 (2): 291-310.
- Kim, M.K., Na, J.R., Lee, T.H., Im, W.T., Soung, N.K., Yang, D.C. 2007. *Solirubrobacter soli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57 (7): 1453-1455.
- Klueglein, N., Lösekann-Behrens, T., Obst, M., Behrens, S., Appel, E., Kappler, A. 2013. Magnetite formation by the novel Fe (III)-reducing *Geothrix fermentans* strain HradG1 isolated from a hydrocarbon-contaminated sediment with increased magnetic susceptibility. *Geomicrobiology Journal*, 30 (10): 863-873.

Koch, H., Lücker, S., Albertsen, M., Kitzinger, K., Herbold, C., Spieck, E., Nielsen, P.H., et al. 2015. Expanded metabolic versatility of ubiquitous nitrite-oxidizing bacteria from the genus *Nitrospira*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112 (36): 11371-11376.

Kolekar, P.D., Patil, S.M., Suryavanshi, M.V., Suryawanshi, S.S., Khandare, R.V., Govindwar, S.P., Jadhav, J.P. 2019. Microcosm study of atrazine bioremediation by indigenous microorganisms and cytotoxicity of biodegraded metabolites. *Journal of Hazardous Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.01.023>

Lakshmi, K.V.N.S., Sasikala, C., Ramana, C.V. 2009. *Rhodoplanes pokkaliisoli* sp. nov., a phototrophic alphaproteobacterium isolated from a waterlogged brackish paddy soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59 (9): 2153-2157.

Li, J., Jia, H., Cai, X., Zhong, H., Feng, Q., Sunagawa, S., Arrumugam, M., et al. 2014. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nature Biotechnology*, 32 (8): 834-841.

Lin, Q.S., Chen, S.H., Hu, M.Y., Haq, M.U., Yang, L., Li, H. 2011. Biodegradation of cypermethrin by a newly isolated actinomycetes HU-S-01 from wastewater sludge. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 8 (1): 45-56.

Li, W., Godzik, A. 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22 (13):1658-1659.

Lindgreen, S., Adair, K.L., Gardner, P.P. 2016. An evaluation of the accuracy and speed of metagenome analysis tools. *Scientific reports*, 6: 19233.

Lu, Y.C., Zhang, S., Miao, S.S., Jiang, C., Huang, M.T., Liu, Y., Yang, H. 2014. Enhanced degradation of herbicide isoproturon in wheat rhizosphere by salicylic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (1): 92–103.

Ma, L., Chen, S., Yuan, J., Yang, P., Liu, Y., Stewart, K. 2017. Rapid biodegradation of atrazine by *Ensifer* sp. strain and its degradation genes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 116: 133-140.

Madariaga-Navarrete, A., Rodríguez-Pastrana, B.R., Villagómez-Ibarra, J.R., Acevedo-Sandoval, O.A., Perry, G., Islas-Pelcastre, M. 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): 367-375.

Maitz, G.S., Haas, E.M., Castric, P.A. 1982. Purification and properties of the allophanate hydrolase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 714: 486-491.

Mandelbaum, R.T., Allan, D.L., Wackett, L.P. 1995. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (4): 1451-1457.

Männistö, M.K., Rawat, S., Starovoytov, V., Häggblom, M.M. 2012. *Granulicella arctica* sp. nov., *Granulicella mallensis* sp. nov., *Granulicella tundricola* sp. nov. and *Granulicella sapmiensis* sp. nov., novel acidobacteria from tundra soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(9): 2097-2106.

Mao, X., Cai, T., Olyarchuk, J. G., Wei, L. 2005. Automated genome annotation and pathway identification using the KEGG Orthology (KO) as a controlled vocabulary. *Bioinformatics*, 21 (19): 3787-3793.

Martínez-Hidalgo, P., García, J.M., Pozo, M.J. 2015. Induced systemic resistance against *Botrytis cinerea* by *Micromonospora* strains isolated from root nodules. *Frontiers in Microbiology*, 6: 922.

Martins, E.C., Bohone, J.B., Abate, G. 2018. Sorption and desorption of atrazine on soils: the effect of different soil fractions. *Geoderma*, 322: 131-139.

McIlroy, S.J., Starnawska, A., Starnawski, P., Saunders, A.M., Nierychlo, M., Nielsen, P.H., Nielsen, J.L. 2016. Identification of active denitrifiers in full-scale nutrient removal wastewater treatment systems. *Environmental Microbiology*, 18 (1): 50-64.

Mende, D.R., Waller, A.S., Sunagawa, S., Jarvelin, A.I., Chan, M.M., Arumugam, M., Raes, J., et al. 2012. Assessment of metagenomic assembly using simulated next generation sequencing data. *PLoS ONE*, 7 (2): e31386.



- Mirete, S., De Figueras, C.G., González-Pastor, J.E. 2007. Novel nickel resistance genes from the rhizosphere metagenome of plants adapted to acid mine drainage. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (19): 6001-6011.
- Monard, C., Martin-Laurent, F., Lima, O., Devers-Lamrani, M., Binet, F. 2013. Estimating the biodegradation of pesticide in soils by monitoring pesticide-degrading gene expression. *Biodegradation*, 24 (2): 203-213.
- Monciardini, P., Cavaletti, L., Schumann, P., Rohde, M., Donadio, S. 2003. *Conexibacter woesei* gen. nov., sp. nov., a novel representative of a deep evolutionary line of descent within the class Actinobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53 (2): 569-576.
- Moubasher, H.A., Hegazy, A.K., Mohamed, N.H., Moustafa, Y.M., Kabiell, H.F., Hamad, A.A. 2015. Phytoremediation of soils polluted with crude petroleum oil using *Bassia scoparia* and its associated rhizosphere microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 98: 113–120.
- Nasseri, S., Baghapour, M. A., Derakhshan, Z., Faramarzian, M. 2014. Degradation of atrazine by microbial consortium in an anaerobic submerged biological filter. *Journal of Water and Health*, 12 (3): 492-503.
- Nevin, K.P., Lovley, D.R. 2002. Mechanisms for accessing insoluble Fe (III) oxide during dissimilatory Fe (III) reduction by *Geothrix fermentans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (5): 2294-2299.
- Nielsen, H.B., Almeida, M., Juncker, A.S., Rasmussem, S., Li, J., Sunagawa, S., Plichta, D.R., Gautier, L., et al. 2014. Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. *Nature Biotechnology*, 32 (8): 822-828.
- Oh, J., Byrd, A.L., Deming, C., Conlan, S., Hong, H.H., Segre, J.A. 2014. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. *Nature*, 514 (7520): 59-64.
- Ondov, B.D., Bergman, N.H., Phillippy, A.M. 2011. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics*, 12 (1): 385.

- Parker, M.A. 2001. Case of localized recombination in 23S rRNA genes from divergent *Bradyrhizobium* lineages associated with neotropical legumes. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (5): 2076-2082.
- Parr, A.J. 2016. Secondary products from plant cell cultures—early experiences with *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. *Transgenesis and Secondary Metabolism*, 1-13.
- Pfyffer, G.E. 2015. Mycobacterium: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. In *Manual of Clinical Microbiology*, Eleventh Edition (pp. 536-569). American Society of Microbiology. doi: 10.1128/9781555817381.ch30
- Pukall, R., Lapidus, A., Del Rio, T.G., Copeland, A., Tice, H., Cheng, J.F., Lucas, S., et al. 2010. Complete genome sequence of *Conexibacter woesei* type strain (ID131577 T). *Standards in Genomic Sciences*, 2 (2): 212.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., et al. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464 (785): 59-65.
- Quince, C., Walker, A.W., Simpson, J. T., Loman, N.J., Segata, N. 2017. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature Biotechnology*, 35(9), 833–844.
- Reardon, C.L., Cummings, D.E., Petzke, L.M., Kinsall, B.L., Watson, D.B., Peyton, B.M., Geesey, G.G. 2004. Composition and diversity of microbial communities recovered from surrogate minerals incubated in an acidic uranium-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (10): 6037-6046.
- Reeve, W., Ardley, J., Tian, R., Eshragi, L., Yoon, J.W., Ngamwisetkun, P., Seshadri, R., et al. 2015. A genomic encyclopedia of the root nodule bacteria: Assessing genetic diversity through a systematic biogeographic survey. *Standards in Genomic Sciences*, 10(1): 14.
- Rehan, M. 2016. microbial biodegradation of s-triazine herbicides in soil. *Journal of Crop Research and Fertilizers*, 1 (1): 1.

- Rehan, M., El Fadly, G., Farid, M., El sharkawy, A., Fränzle, S., Ullrich, R., Kellner, H., et al. 2017. Opening the s-triazine ring and biuret hydrolysis during conversion of atrazine by *Frankia* sp. strain EuI1c. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 117: 14–21.
- Rivas, R., Martens, M., De Lajudie, P., Willems, A. 2009. Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 32 (2): 101-110.
- Sagarkar, S., Nousiainen, A., Shaligram, S., Björklöf, K., Lindström, K., Jørgensen, K. S., Kapley, A. 2014. Soil mesocosm studies on atrazine bioremediation. *Journal of Environmental Management*, 139, 208–216.
- Sampaio, L.H., Stefani, M M., Oliveira, R.M., Sousa, A.L., Ireton, G.C., Reed, S.G., Duthie, M.S. 2011. Immunologically reactive *M. leprae* antigens with relevance to diagnosis and vaccine development. *BMC Infectious Diseases*, 11(1): 26.
- Seffernick, J.L., Aleem, A., Osborne, J.P., Johnson, G., Sadowsky, M.J., Wackett, L.P. 2007. Hydroxyatrazine N-ethylaminohydrolase (AtzB): an amidohydrolase superfamily enzyme catalyzing deamination and dechlorination. *Journal of Bacteriology*, 189: 6989-97.
- Seffernick, J.L., Shapir, N., Schoeb M., Johnson, G., Sadowsky, M.J., Wackett, L.P. 2002. Enzymatic degradation of chlorodiamino-s-triazine. *Applied Environmental of Microbiology*, 68: 4672-5.
- Seki, T., Matsumoto, A., Shimada, R., Inahashi, Y., Ōmura, S., Takahashi, Y. 2012. *Conexibacterarvalis* sp. nov., isolated from a cultivated field soil sample. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62 (10): 2400-2404.
- Shapir, N., Cheng, G., Sadowsky, M.J., Wackett, L.P. 2006. Purification and characterization of TrzF: biuret hydrolysis by allophanate hydrolase supports growth. *Applied Environmental of Microbiology*, 72: 2491-5.
- Shapir, N., Osborne, J.P., Johnson, G., Sadowsky, M.J., Wackett, LP. 2002. Purification, substrate range, and metal center of AtzC: the N-isopropylammelide aminohydrolase involved in bacterial atrazine metabolism. *Journal of Bacteriology*, 184: 5376-84.

- Shapir, N., Sadowsky, M.J., Wackett, L.P. 2005. Purification and characterization of allophanate hydrolase (AtzF) from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Journal of Bacteriology*, 187: 3731-8.
- Sumrada, R.A., Cooper, T.G. 1982. Urea carboxylase and allophanate hydrolase are components of a multifunctional protein in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 257: 9119-27.
- Sindhu, S.S., Parmar, P., Phour, M., Kumari, K. 2014. Rhizosphere microorganisms for improvement in soil fertility and plant growth. *Microbes in the service of mankind: tiny bugs with huge impact*. JBC Press, New Delhi, 32-94.
- Singh, B., Farenhorst, A., Gaultier, J., Pennock, D., Degenhardt, D., McQueen, R. 2014. Soil characteristics and herbicide sorption coefficients in 140 soil profiles of two irregular undulating to hummocky terrains of western Canada. *Geoderma*, 232: 107-116.
- Singleton, D.R., Furlong, M.A., Peacock, A.D., White, D.C., Coleman, D.C., & Whitman, W.B. 2003. *Solirubrobacter pauli* gen. nov., sp. nov., a mesophilic bacterium within the Rubrobacteridae related to common soil clones. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(2): 485-490.
- Silva, R.R. Souza-Lima, E.S.S. 2013. Fabaceae of the Rio São Francisco River sub-basin, Nova Marilândia, Mato Grosso, Brazil. *Biota Neotropica*, 13 (2): 297-302.
- Sorokin, D.Y., Muntyan, M.S., Panteleeva, A.N., Muyzer, G. 2012. *Thioalkalivibrio sulfidiphilus* sp. nov., a haloalkaliphilic, sulfur-oxidizing gammaproteobacterium from alkaline habitats. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62 (8): 1884-1889.
- Srinivas, A., Sasikala, C., Ramana, C.V. 2014. *Rhodoplanes oryzae* sp. nov., a phototrophic alphaproteobacterium isolated from the rhizosphere soil of paddy. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64 (7): 2198-2203.
- Sujarit, K., Kudo, T., Ohkuma, M., Pathom-Aree, W., Lumyong, S. 2016. *Streptomyces Palmae* sp. nov., isolated from oil palm (*Elaeis guineensis*) rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66 (10): 3983-3988.

- Sunagawa, S., Coelho, L.P., Chaffron, S., Kultima, J.R., Labadie, K., Salazar, G., Djahanschiri, B., et al. 2015. Structure and function of the global ocean microbiome. *Science*, 348 (6237): 1261359.
- VanInsberghe, D., Maas, K.R., Cardenas, E., Strachan, C.R., Hallam, S. Mohn, W.W. 2015. Non-symbiotic *Bradyrhizobium* ecotypes dominate North American forest soils. *The ISME Journal*, 9 (11): 2435.
- Venturi, V., Keel, C. 2016. Signaling in the rhizosphere. *Trends in Plant Science*, 21 (3): 187–198.
- Viaene, T., Langendries, S., Beirinckx, S., Maes, M., Goormachtig, S. 2016. *Streptomyces* as a plant's best friend?. *FEMS Microbiology Ecology*, 92 (8).
- Xu, X., Zarecki, R., Medina, S., Ofaim, S., Liu, X., Chen, C., Hu, S., Brom, D., Gat, D., Porob, S., Eizenberg, H. 2018. Modeling microbial communities from atrazine contaminated soils promotes the development of biostimulation solutions. *The ISME Journal*, 1.
- Zeller, G., Tap, J., Voigt, A.Y., Sunagawa, S., Kultima, J.R., Costea, P.I., Amiot, A., et al. 2014. Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer. *Molecular Systems Biology*, 10 (11): 766.
- Zhang, H., Chen, F., Zhao, H., Lu, J., Zhao, M., Qing Hong, Q., Huang, X. 2018. Colonization on cucumber root and enhancement of chlorimuron-ethyl degradation in the rhizosphere by *Hansschlegelia zihuaiae* S113 and root exudates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66 (18): 4584–4591.
- Zhang, L., Zhu, L., Si, M., Li, C., Zhao, L., Wei, Y., Shen, X. 2014. *Solirubrobacter taibaiensis* sp. nov., isolated from a stem of *Phytolacca acinosa* Roxb. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106 (2), 279-285.
- Zhang, L.J., Wang, G.Q., Yu, H.L., Wang, J., Wang, S.W., Jia, Y., Yu, Y.Y., et al. 2011. First report of human infection by *Rhodoplanes* sp., Alphaproteobacteria in China. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4 (3): 248-250.

- Zhao, F., Li, Y., Huang, L., Gu, Y., Zhang, H., Zeng, D., Tan, H. 2018. Individual and combined toxicity of atrazine, butachlor, halosulfuron-methyl and mesotrione on the microalga *Selenastrum capricornutum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148: 969-975.
- Zhao, X., Wang, L., Ma, F., Bai, S., Yang, J., Qi, S. 2017. *Pseudomonas* sp. ZXY-1, a newly isolated and highly efficient atrazine-degrading bacterium, and optimization of biodegradation using response surface methodology. *Journal of Environmental Sciences*, 54: 152-159.
- Zhu, W., Lomsadze, A., Borodovsky, M. 2010. "Ab initio gene identification in metagenomic sequences." *Nucleic Acids Research* 38 (12): e132-e132
- Wackett, L.P., Sadowsky, M.J., Martinez, B., Shapir, N. 2002 Biodegradation of atrazine and related s-triazine compounds: from enzymes to field studies. *Applied Microbiology of Biotechnology*, 58:39–45.
- Wang, J., Zhu, L., Wang, Q., Wang, J., Xie, H. 2014. Isolation and characterization of atrazine mineralizing *Bacillus subtilis* strain HB-6. *PLoS One*, 9 (9): e107270.
- Wang, R., Chang, Y.L., Zheng, W.T., Zhang, D., Zhang, X.X., Sui, X.H., Wang, E.T., et al. 2013. *Bradyrhizobium arachidis* sp. nov., isolated from effective nodules of *Arachis hypogaea* grown in China. *Systematic and Applied Microbiology*, 36 (2): 101-105.
- Wei, L., Ouyang, S., Wang, Y., Shen, X., Zhang, L. 2014. *Solirubrobacter phytolaccae* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from roots of *Phytolacca acinosa* Roxb. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64 (3): 858-862.
- Woloszynek, S., Zhao, Z., Ditzler, G., Price, J.R., Reichenberger, E.R., Lan, Y., Chen, J. et al. 2018. Analysis methods for shotgun metagenomics. *Computational Biology*, 71–112.
- Wu, Y.T., Gutknecht, J., Nadrowski, K., Geibler, C., Kühn, P., Scholten, T., Both, S., et al. 2012. Relationships between soil microorganisms, plant communities, and soil characteristics in chinese subtropical forests. *Ecosystems* 15 (4): 624–636.
- Wagman, G.H. 1980. Antibiotics from *Micromonospora*. *Annual Reviews in Microbiology*, 34 (1): 537-558.

Yale, R.L., Sapp, M., Sinclair, C.J., Moir, J.W.B. 2017. Microbial changes linked to the accelerated degradation of the herbicide atrazine in a range of temperate soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 24 (8): 7359-7374.

Yang, C., Li, Y., Zhang, K., Wang, X., Ma, C., Tang, H., & Xu, P. 2009. Atrazine degradation by a simple consortium of *Klebsiella* sp. A1 and *Comamonas* sp. A2 in nitrogen enriched medium. *Biodegradation*, 21(1): 97–105.

Yang, X., Wei, H., Zhu, C., Geng, B. 2018. Biodegradation of atrazine by the novel *Citricoccus* sp. strain TT3. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147: 144-150.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há viabilidade na utilização de espécies arbóreas para retenção, com posterior deagração, de compostos transportados das áreas agrícolas aos cursos de água. Atrazine e clomazone tiveram seus resíduos diminuídos em solos cultivados com as espécies *E. crotonoides* e *I. striata*. A alteração da diversidade microbiana na rizosfera de espécies vegetais pode ser um indicativo de que a rizodegradação é umas das vias de diminuição desses resíduos. Essa hipótese foi confirmada pela análise de metagenômica, realizada, nesta pesquisa, para as espécies *C. ferrea* e *I. striata*, em que genes de degradação do atrazine foram detectados, sendo, alguns deles, ainda não relatados. A pesquisa sinaliza o potencial uso da técnica de fitorremediação, notadamente nos solos brasileiros, onde a atividade e diversidade microbiana é favorecida pelas condições tropicais.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

- Isolar microrganismos do solo que degradem atrazine;
- Caracterizar genes degradadores de atrazine;
- Plaquear solo rizosférico em meio de cultura com altas taxas de atrazine.