

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Efeito dos pesticidas na comunidade microbiana em solos com diferentes
diversidades e na rizosfera da soja

Kelly Jaqueline Alves

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2023

Kelly Jaqueline Alves
Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas

**Efeito dos pesticidas na comunidade microbiana em solos com diferentes diversidades e na
rizosfera da soja**

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:

Prof. Dr. **FERNANDO DINI ANDREOTE**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora
em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2023

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Kelly, Jaqueline Alves

Efeito dos pesticidas na comunidade microbiana em solos com diferentes diversidades e na rizosfera da soja / Kelly Jaqueline Alves. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

114 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Microbiologia do solo 2. Rizosfera 3. Biologia molecular 4. Defensivos agrícolas I. Título

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Janete e Evanir, minha irmã Natália por serem a minha base, os meus exemplos, pelo amor e apoio incondicionais durante toda a minha vida e trajetória acadêmica. À minha família em especial aos meus avós: José, Benedita e Laurita (*in memoriam*), pelo exemplo de simplicidade, inteligência e por todo o afeto. Ao Deived, meu amor e companheiro, pelo convívio, pelo amor, incentivo e apoio diário em todos os momentos. As minhas amigas Cris, Mayra (Vents), Dayane e Dani pela amizade, pelo apoio e pela força. Obrigada!

À Universidade de São Paulo-USP em especial a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ/USP, pela estrutura de excelência, apoio financeiro e moradia que foram essenciais para a realização do Curso de Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas e a permanência no primeiro ano do meu mestrado. Sem esse apoio eu não teria a possibilidade de trilhar minha trajetória acadêmica.

Agradeço ao Programa de Microbiologia Agrícola, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado concedida, ao Programa Institucional de Internacionalização da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PrInt) pela bolsa de doutorado sanduíche. As bolsas foram essenciais na minha continuidade e permanência na pós-graduação. Ao auxílio regular FAPESP (19/03712-8) pelo apoio financeiro ao projeto.

Agradeço ao meu orientador Professor Fernando Dini Andreote por me orientar na iniciação científica, mestrado e doutorado, pelos conhecimentos compartilhados e desafios lançados. Ao Professor Francisco Dini Andreote, pela orientação antes e durante o meu doutorado sanduíche e por me receber na sua equipe. Agradeço ao Gordon pela orientação nas análises em R, a Luana e Henry pela companhia e suporte.

Um agradecimento especial à Denise e a Sonia pelo apoio técnico, mas principalmente pela amizade, ao Fernandinho por todo auxílio. Agradeço aos colegas do Laboratório de Microbiologia do solo, em especial a Gabriely pelo apoio técnico e científico.

“Se eu pudesse fazer tudo de novo e aliviar minha visão no século XXI, eu me tornaria um ecologista microbiano. Dez bilhões de bactérias vivem em um grama de solo comum, uma mera pitada entre o polegar e o indicador. Eles representam milhares de espécies, quase nenhuma das quais é conhecida pela ciência. Para esse mundo eu iria com a ajuda da microscopia moderna e da análise molecular. Eu cortaria meu caminho através de florestas clonais espalhadas por grãos de areia, viajaria em um submarino imaginário através de gotas de água proporcionalmente do tamanho de lagos e rastreadoria predadores e presas para descobrir novos modos de vida e teias alimentares. Tudo isso, e não preciso me aventurar mais do que dez passos para fora do prédio do meu laboratório.”

Edward O. Wilson, O Naturalista

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1. Objetivo da tese.....	13
1.2. Organização da tese	14
Referências	14
2 AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS EFEITOS DA APLICAÇÃO REPETIDA DE PESTICIDAS NA MICROBIOTA DE SOLOS COM DIFERENTES HISTÓRICOS DE USO	19
Resumo.....	19
Abstract.....	19
2.1 Introdução	20
2.2 Metodologia	24
2.2.1 Amostragem do solo.....	24
2.2.2 Experimento em microcosmos	24
2.2.3 Determinação do potencial enzimático.....	26
2.2.4 PCR quantitativo (qPCR)	26
2.2.5 Análise de TRFL-P e processamento dos dados	27
2.2.6 Análises estatística dos dados.....	28
2.3 Resultados	30
2.3.1 Potencial enzimático do solo	30
2.3.2 PCR quantitativo (qPCR)	30
2.3.3 Métricas de α -diversidade das comunidades bacterianas e fúngicas	33
2.3.4 Estruturação das comunidades presentes no solo agrícola e florestal tratadas com fungicidas	36
2.3.5 Estruturação das comunidades presentes no solo agrícola e florestal tratadas com herbicidas	38
2.3.6 Estruturação das comunidades presentes no solo agrícola e florestal tratadas com inseticidas.....	40
2.3.7 Compilação dos resultados significativos dos dados de diversidade β	42
2.4 Discussão.....	44

Referências.....	47
Material suplementar capítulo 2	52
3 A INFLUÊNCIA DA MANIPULAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA NA RESPOSTA DA COMUNIDADE FÚNGICA APÓS A APLICAÇÃO DE FUNGICIDAS	55
Resumo	55
Abstract	55
3.1 Introdução.....	56
3.2 Metodologia.....	58
3.2.1 Coleta de solo e montagem do ensaio de microcosmos	58
3.2.2 Aplicação dos fungicidas e amostragem dos microcosmos	59
3.2.3 Determinação do potencial enzimático	60
3.2.4 Extração de DNA, qPCR e sequenciamento	61
3.2.5 Análise de dados	61
3.3 Resultados.....	63
3.3.1 Atividade enzimática	63
3.3.2 qPCR, resultados do sequenciamento de ITS, β -diversidade e α - diversidade.....	64
3.3.3 Abundância diferencial e composição da comunidade.....	67
3.4 Discussão	70
Referências.....	73
Material suplementar capítulo 3	77
4 ESTRUTURAÇÃO DIFERENCIAL DA RIZOSFERA DE SOJA PROMOVIDA PELO TRATAMENTO DE SEMENTES COM PESTICIDAS	79
Resumo	79
Abstract	79
4.1 Introdução.....	80
4.2 Metodologia.....	83
4.2.1 Montagem do experimento em mesocosmos.....	83
4.2.2 Amostragem da rizosfera, avaliação do peso seco da soja, determinação da nodulação e colonização micorrízica.....	85
4.2.3 Extração de DNA, sequenciamento e processamento dos dados	86
4.2.4 Análise estatística de dados de sequências bacterianas e fúngicas.....	87
4.3 Resultados.....	88

4.3.1	Efeitos de pesticidas de sementes sobre atributos microbiológicos e características fenotípicas das plantas de soja	88
4.3.2	Efeitos de pesticidas usados tratar as sementes na comunidade microbiana da rizosfera da soja	89
4.3.3	Mudanças na composição do microbioma bacteriano da rizosfera sob influência de pesticidas de sementes	94
4.3.4	Mudanças na composição do microbioma fúngico da rizosfera sob influência de pesticidas de sementes.....	96
4.4	Discussão.....	97
	Referências	101
	Material suplementar capítulo 4.....	106
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	113

RESUMO

Efeito dos pesticidas na comunidade microbiana em solos com diferentes diversidades e na rizosfera da soja

Com a demanda de associar a expansão da produtividade agrícola com a preservação ambiental, abordagens que beneficiem os microrganismos do solo e sua interação com as plantas vem recebendo atenção crescente. No entanto, para explorar as funções benéficas fornecidas pelo microbioma é necessário compreender como o manejo agrícola intensivo, que inclui o uso de pesticidas, pode alterar a comunidade microbiana do solo e consequentemente aquelas associadas às plantas. Nesse cenário, o objetivo geral dessa tese foi avaliar o potencial efeitos de sete pesticidas na comunidade microbiana de dois solos diferentes, e de dois fungicidas na comunidade fúngica de solos com diferentes níveis de diversidade microbiana, considerando que os efeitos variam ao longo do período de incubação. Também foi avaliado se os pesticidas de sementes têm o potencial de modular a montagem do microbioma da rizosfera de soja. Para isso, foram combinadas avaliações do potencial enzimático do solo com métodos independentes de cultivo, as quais permitiram acessar o perfil das comunidades microbianas, a abundância de genes específicos e a composição da comunidade microbiana do solo e da rizosfera. Como principais resultados da aplicação dos pesticidas em dois solos diferentes, foi observado que as comunidades bacterianas do solo agrícola foram mais responsivas a aplicação dos fungicidas e herbicidas que as comunidades fúngicas, em contrapartida, no solo florestal os perfis das comunidades fúngicas foram mais suscetíveis a aplicação desses compostos que as comunidades bacterianas. No experimento em que foi aplicado fungicidas em solos com diferentes níveis de diversidade, a enzima β -glicosidase foi alterada nos microcosmos menos diversos, ao passo que não ficou evidente o efeito da diversidade microbiana na resposta das comunidades fúngicas, no entanto, foi possível identificar táxons que tiveram a abundância alterada com a aplicação dos fungicidas. Em relação à influência dos pesticidas utilizados no tratamento de sementes, as modificações na diversidade β das comunidades microbianas da rizosfera de soja foram observadas nos estágios iniciais de desenvolvimento da planta e permaneceram até os 45 dias de desenvolvimento. Também foram identificados táxons bacterianos associados a degradação dos pesticidas testados e a redução na abundância de fungos relacionados com a simbiose desempenhada por fungos micorrízicos arbusculares. De forma geral, as comunidades bacterianas e fúngicas do solo foram responsivas aos pesticidas aplicados, sendo que essas respostas variaram com o tipo de solo, diversidade da comunidade microbiana e tempo de incubação. Os pesticidas utilizados no tratamento de sementes também mostraram potencial em modificar a montagem das comunidades rizosféricas da soja ao longo do desenvolvimento da planta.

Palavras-chave: Microbiologia do solo, Rizosfera, Biologia molecular, Defensivos agrícolas

ABSTRACT

Effect of pesticides on the microbial community in soils with different diversity and on the soybean rhizosphere

With the demand to associate agricultural productivity expansion and environmental preservation, approaches that benefit soil microorganisms and their interaction with plants are receiving increasing attention. However, to explore the beneficial functions provided by microorganisms, it is necessary to understand how intensive agricultural management, which includes pesticide use, can alter the soil microbial community and consequently those associated with plants. In this scenario, the aims of this thesis were to evaluate the potential effects of seven pesticides on the microbial community of two different soils, also of two fungicides on the fungal community of soils with different levels of microbial diversity, considering that the effects vary throughout the incubation period. Furthermore, we evaluated the potential of seeds to modulate soybean rhizosphere assembly. To access the soil microbial communities, we combine measurements of soil enzymatic potential with cultivation-independent methods, which allowed us to access the microbial communities' profile, the specific genes abundance, and the composition of the microbial community from soil and rhizosphere. As major results of pesticide application in two different soils, we observed that bacterial communities from agricultural soil were more responsive to fungicides and herbicides than fungal communities, in contrast, in the forest soil, fungal communities showed more response to those compounds than bacterial communities. In the experiment in which fungicides were applied to soils with different levels of diversity, the β -glucosidase enzyme revealed greater changes in the less diverse microcosms, while the effect of microbial diversity on the response of fungal communities was not evident, however, we identify some taxa which their abundance was altered after fungicides application. Regarding the influence of pesticides used in seed treatment, we observed changes in the β diversity of microbial communities in the soybean rhizosphere in the early stages of plant development, which remained until 45 days. We also identified bacterial taxa associated with the degradation of the tested pesticides and the reduction in the arbuscular mycorrhizal fungi. In general, soil bacterial and fungal communities were responsive to applied pesticides, as well as soybean rhizospheric communities were modified with seed treatment in which pesticides were used.

Keywords: Soil microbiology, Rhizosphere, Molecular biology, Pesticides

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os ganhos de produtividade agrícola necessários para atender a demanda crescente por alimentos vem sendo alcançados pela intensificação da agricultura, incluindo o uso dos agroquímicos, fertilizantes sintéticos e pesticidas (Kopittke et al., 2019; Oerke, 2006). No entanto, esses compostos são poluentes em potencial (Tang et al., 2021), tornando desafiador combinar uma agricultura altamente produtiva com a preservação do ambiente (Tscharntke et al., 2012). Portanto, abordagens mais sustentáveis ambientalmente para correção da fertilidade do solo e controle de pragas são necessárias para que o crescimento da produção agrícola ocorra paralelamente à preservação ambiental (Timmusk et al., 2017).

Nos últimos dez anos, especialmente com o avanço das tecnologias de sequenciamento de DNA (Prosser, 2015; Sergaki et al., 2018), houve uma expansão do conhecimento das funções essenciais desempenhadas pelos microrganismos às plantas hospedeiras (Cordovez et al., 2019). Essa comunidade microbiana, também denominada microbioma, é composto pelas bactérias, fungos, arqueias, oomicetos, vírus e protistas que proveem às plantas funções essenciais como aquisição de nutrientes, proteção contra patógenos e tolerância a estresses bióticos e abióticos (Duran, P. et al. 2018). Portanto, considerando os benefícios que os microrganismos conferem às plantas, as soluções com base no microbioma vem sendo propostas como uma nova plataforma para a próxima revolução verde (Jez et al., 2016), com o potencial de promover ferramentas ambiental e economicamente sustentáveis que auxiliem na produtividade agrícola (Sergaki et al., 2018), reduzindo o incremento de agroquímicos.

Para explorar as funções benéficas fornecidas pelo microbioma às plantas é necessário compreender os mecanismos que direcionam os processos de montagem dessas comunidades. Esses mecanismos envolvem as interações com o hospedeiro, com os microrganismos, com o ambiente e a presença de fatores abióticos (Trivedi et al., 2020). Nesse processo as mudanças no solo como o manejo intensivo a longo prazo (Chen et al., 2019) ou agricultura orgânica (Hartmann et al., 2015) afetam a composição do microbioma associado às raízes das plantas, já que o solo é uma fonte de microrganismos para a rizosfera. Portanto, com o interesse crescente em utilizar soluções baseadas no microbioma para promover a produtividade agrícola (Chen et al.,

2021), torna-se necessário mapear os efeitos das principais práticas de manejo na estruturação e funcionalidade das comunidades microbianas presentes no solo.

Estudos vem demonstrando modificações na estrutura das comunidades microbianas ocasionados pelos fertilizantes químicos (Huaihai Chen, 2019) e pesticidas (Sim et al., 2022). Os pesticidas são aplicados em grandes áreas para reduzir a infestação de pragas, vetores de doenças e patógenos, reduzindo dessa forma perdas de produtividade e garantindo a qualidade da produção (Rani et al., 2021). A aplicação ocorre diretamente nas folhas, no tratamento de sementes ou diretamente no solo e estima-se que da quantidade total dos pesticidas aplicados, cerca de 5% atingem os organismos alvo, enquanto a quantidade restante atinge o solo e outros compartimentos ambientais (Karpouzas et al., 2016; Meena et al., 2020).

Nesse cenário, estudos vem avaliando os possíveis efeitos dos pesticidas na comunidade microbiana endofítica (Görür e Akgül, 2019; Katsoula et al., 2020), da rizosfera (Li et al., 2018) e do solo (Sim et al., 2022; Storck et al., 2018). No solo, tem sido testados pesticidas de diferentes classes com base nos organismos alvo, como herbicidas (Dennis et al., 2018), inseticidas (Garg et al., 2021) e fungicidas (Han et al., 2021). Os efeitos adversos dos pesticidas incluem modificações no potencial enzimático do solo (Riah-Anglet et al., 2015; Wołejko et al., 2020), na comunidade envolvida no ciclo do nitrogênio (Feld et al., 2015; Sim et al., 2022), modificações que podem ser ou não transitórias. A toxicidade dos pesticidas aos microrganismos do solo é influenciada também pelas propriedades físico-químicas do solo, pela dose aplicada, pela frequência de aplicação e pelo tempo de incubação (Sim et al., 2022). Portanto, é importante considerar esses parâmetros na avaliação dos potenciais efeitos adversos que os pesticidas podem causar nos microrganismos do solo.

Além do interesse de compreender os efeitos dos pesticidas na comunidade microbiana do solo, trabalhos de revisão recentes têm levantado questões dos possíveis efeitos adversos que os pesticidas usados no tratamento de sementes podem ocasionar no microbioma presente nessas sementes (Ayesha et al., 2021; Lamichhane et al., 2020). O tratamento de sementes, composto principalmente por fungicidas e inseticidas, é necessário para o manejo de doenças que podem se instalar durante a germinação e primeiros dias das plântulas (White e Hoppin, 2004). Como esses compostos não são espécie-específicos, há preocupação em que atinjam principalmente os fungos, pois comprovadamente existe uma grande diversidade de fungos endofíticos nas sementes

(Kinge et al., 2019). Esses microrganismos endofíticos possivelmente apresentam um papel no crescimento e germinação das plântulas, além de servir como uma importante fonte de microrganismos, transmitida verticalmente para as próximas gerações (Ayesha et al., 2021). Estudos que avaliaram os possíveis efeitos do tratamento de sementes com fungicidas nessa comunidade microbiana reportaram redução da carga de endofíticos em 60% (Lugtenberg et al., 2016) e redução na transmissão vertical de bactérias endofíticas em plântulas germinadas (Chynoweth et al., 2012). No entanto, os estudos dos possíveis efeitos dos pesticidas de sementes na montagem do microbioma da rizosfera são escassos, por exemplo, Li et al., (2018) não observaram efeitos prejudiciais na comunidade da rizosfera de trigo após o tratamento das sementes com inseticidas neocotinóides, enquanto um estudo que investigou os efeitos do tratamento de sementes com uma mistura de inseticida e fungicidas encontrou alterações na estrutura da comunidade da rizosfera de milho e soja (Nettles et al., 2016).

Considerando esse cenário em que há uma busca crescente em promover a associação dos microrganismos com as plantas, torna-se necessário mensurar os possíveis efeitos dos pesticidas na microbiota do solo e das plantas para que uso desses compostos seja compatível com manutenção das comunidades microbianas nativas e com o uso das soluções baseadas em microrganismos. A presente tese está inserida nesse contexto, primeiro avaliando os efeitos de sete pesticidas nas comunidades microbianas de dois tipos de solo ao longo do tempo, segundo avaliando o efeito de dois fungicidas em comunidades fúngicas de solos com diferentes níveis de diversidade e terceiro avaliando o efeito dos pesticidas de sementes na montagem da comunidade microbiana da rizosfera da soja.

1.1. Objetivo da tese

O objetivo da tese foi avaliar o potencial efeito de pesticidas na comunidade microbiana do solo, considerando que os efeitos variam ao longo do período de incubação, do histórico de uso do solo, estrutura da comunidade microbiana do solo e que os pesticidas de sementes têm o potencial de modular a montagem do microbioma da rizosfera. Para isso, foram combinadas metodologias que avaliaram os bioindicadores presentes no solo com técnicas independentes de cultivo que permitiram acessar a

dinâmica das comunidades microbianas, a abundância de genes específicos e o perfil taxonômico da comunidade microbiana do solo e da rizosfera.

1.2. Organização da tese

A tese é composta pela introdução geral e três capítulos com os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento da tese. O objetivo da **introdução geral** foi contextualizar o tema da tese e apresentar os objetivos principais de cada um dos três capítulos que contém os resultados dos experimentos desenvolvidos. No **capítulo 2** foram avaliados os possíveis efeitos de sete pesticidas em comunidades bacterianas e fúngicas presentes em microcosmos de solo agrícola e de solo florestal, em aplicação única e repetida. Os objetivos desse capítulo foram avaliar se comunidades microbianas de solos com diferentes históricos de uso também apresentam respostas distintas após a aplicação de pesticidas e se essas respostas são alteradas após a aplicação repetida. No **capítulo 3**, o objetivo continuou sendo comparar a resposta de solos distintos a aplicação de pesticidas, porém nesse experimento a composição da comunidade microbiana foi alterada pelo método de “diluição para extinção”. Nesse capítulo o foco foi dado na resposta da comunidade fúngica a aplicação de fungicidas para testar a hipótese que comunidades fúngicas de solos menos diversos são mais suscetíveis a modificações ocasionadas pelos fungicidas aplicados. O **capítulo 4** teve por objetivo avaliar os potenciais efeitos de três tratamentos de sementes compostos por fungicidas e inseticidas sobre as comunidades fúngicas e bacterianas associadas à rizosfera da soja, avaliada em quatro estágios de desenvolvimento da planta. Esse capítulo teve como um objetivo principal na tese de avaliar se os tratamentos aplicados no momento do plantio podem modular a montagem do microbioma das plantas.

Referências

Ayesha, M.S., Suryanarayanan, T.S., Nataraja, K.N., Prasad, S.R., Shaanker, R.U., 2021. Seed Treatment With Systemic Fungicides: Time for Review. *Front. Plant Sci.* 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.654512>

- Chen, H., Yang, Z.K., Yip, D., Morris, R.H., Lebreux, S.J., Cregger, M.A., Klingeman, D.M., Hui, D., Hettich, R.L., Wilhelm, S.W., Wang, G., Löffler, F.E., Schadt, C.W., 2019. One-time nitrogen fertilization shifts switchgrass soil microbiomes within a context of larger spatial and temporal variation. *PLoS One* 14, 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211310>
- Chen, Q.L., Hu, H.W., He, Z.Y., Cui, L., Zhu, Y.G., He, J.Z., 2021. Potential of indigenous crop microbiomes for sustainable agriculture. *Nat. Food* 2, 233–240. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00253-5>
- Cordovez, V., Dini-Andreote, F., Carrión, V.J., Raaijmakers, J.M., 2019. Ecology and evolution of plant microbiomes. *Annu. Rev. Microbiol.* 73, 69–88. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062524>
- Dennis, P.G., Kukulies, T., Forstner, C., Orton, T.G., Pattison, A.B., 2018. The effects of glyphosate, glufosinate, paraquat and paraquat-diquat on soil microbial activity and bacterial, archaeal and nematode diversity. *Sci. Rep.* 8, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20589-6>
- Feld, L., Hjelmsø, M.H., Nielsen, M.S., Jacobsen, A.D., Rønn, R., Ekelund, F., Krogh, P.H., Strobel, B.W., Jacobsen, C.S., 2015. Pesticide side effects in an agricultural soil ecosystem as measured by amoA expression quantification and bacterial diversity changes. *PLoS One* 10, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126080>
- Garg, N., Bhattacharjee, A.K., Shukla, P.K., Singh, B., 2021. Influence of imidacloprid on bacterial community diversity of mango orchard soil assessed through 16S rRNA sequencing-based metagenomic analysis. *Environ. Monit. Assess.* 193, 102. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-08885-7>
- Görür, V., Akgül, D.S., 2019. Fungicide suspensions combined with hot-water treatments affect endogenous *neofusicoccum parvum* infections and endophytic fungi in dormant grapevine canes. *Phytopathol. Mediterr.* 58, 559–571. <https://doi.org/10.14601/Phyto-10822>
- Han, L., Kong, X., Xu, M., Nie, J., 2021. Repeated exposure to fungicide tebuconazole alters the degradation characteristics, soil microbial community and functional profiles. *Environ. Pollut.* 287, 117660. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117660>
- Hartmann, M., Frey, B., Mayer, J., Mäder, P., Widmer, F., 2015. Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. *ISME J.* 9, 1177–1194. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.210>
- Jez, J.M., Lee, S.G., Sherp, A.M., 2016. The next green movement: Plant biology for the environment and sustainability. *Science* (80-.). 353, 1241–1244. <https://doi.org/10.1126/science.aag1698>
- Karpouzas, D.G., Tsiamis, G., Trevisan, M., Ferrari, F., Malandain, C., Sibourg, O., Martin-Laurent, F., 2016. "LOVE TO HATE" pesticides: felicity or curse for the soil microbial community? *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 18947–18951. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7319-4>
- Katsoula, A., Vasileiadis, S., Sapountzi, M., Karpouzas, D.G., 2020. The response of soil and phyllosphere microbial communities to repeated application of the fungicide iprodione: Accelerated biodegradation or toxicity? *FEMS Microbiol. Ecol.* <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa056>

- Kinge, T.R., Cason, E.D., Valverde, A., Nyaga, M., Gryzenhout, M., 2019. Endophytic seed mycobiome of six sorghum (*Sorghum bicolor*) cultivars from commercial seedlots using an Illumina sequencing approach. *Mycosphere* 10, 739–756. <https://doi.org/10.5943/MYCOSPHERE/10/1/16>
- Kopittke, P.M., Menzies, N.W., Wang, P., McKenna, B.A., Lombi, E., 2019. Soil and the intensification of agriculture for global food security. *Environ. Int.* 132, 105078. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105078>
- Lamichhane, J.R., You, M.P., Laudinot, V., Barbetti, M.J., Aubertot, J.N., 2020. Revisiting sustainability of fungicide seed treatments for field crops. *Plant Dis.* 104, 610–623. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1157-FE>
- Li, Y., An, J., Dang, Z., Lv, H., Pan, W., Gao, Z., 2018. Treating wheat seeds with neonicotinoid insecticides does not harm the rhizosphere microbial community. *PLoS One* 13, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205200>
- Meena, R., Kumar, S., Datta, R., Lal, R., Vijayakumar, V., Brtnicky, M., Sharma, M., Yadav, G., Jhariya, M., Jangir, C., Pathan, S., Dokulilova, T., Pecina, V., Marfo, T., 2020. Impact of Agrochemicals on Soil Microbiota and Management: A Review. *Land* 9, 34. <https://doi.org/10.3390/land9020034>
- Nettles, R., Watkins, J., Ricks, K., Boyer, M., Licht, M., Atwood, L.W., Peoples, M., Smith, R.G., Mortensen, D.A., Koide, R.T., 2016. Influence of pesticide seed treatments on rhizosphere fungal and bacterial communities and leaf fungal endophyte communities in maize and soybean. *Appl. Soil Ecol.* 102, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.02.008>
- Oerke, E.C., 2006. Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* 144, 31–43. <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>
- Prosser, J.I., 2015. Dispersing misconceptions and identifying opportunities for the use of “omics” in soil microbial ecology. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 439–446. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3468>
- Rani, L., Thapa, K., Kanojia, N., Sharma, N., Singh, S., Grewal, A.S., Srivastav, A.L., Kaushal, J., 2021. An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *J. Clean. Prod.* 283, 124657. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124657>
- Riah-Anglet, W., Trinsoutrot-Gattin, I., Martin-Laurent, F., Laroche-Ajzenberg, E., Norini, M.-P., Latour, X., Laval, K., 2015. Soil microbial community structure and function relationships: A heat stress experiment. *Appl. Soil Ecol.* 86, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.10.001>
- Sergaki, C., Lagunas, B., Lidbury, I., Gifford, M.L., Schäfer, P., 2018. Challenges and approaches in microbiome research: from fundamental to applied. *Front. Plant Sci.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01205>
- Sim, J.X.F., Doolette, C.L., Vasileiadis, S., Drigo, B., Wyrsh, E.R., Djordjevic, S.P., Donner, E., Karpouzas, D.G., Lombi, E., 2022. Pesticide effects on nitrogen cycle related microbial functions and community composition. *Sci. Total Environ.* 807, 150734. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150734>

- Storck, V., Nikolaki, S., Perruchon, C., Chabanis, C., Sacchi, A., Pertile, G., Baguelin, C., Karas, P.A., Spor, A., Devers-Lamrani, M., Papadopoulou, E.S., Sibourg, O., Malandain, C., Trevisan, M., Ferrari, F., Karpouzas, D.G., Tsiamis, G., Martin-Laurent, F., 2018. Lab to field assessment of the ecotoxicological impact of chlorpyrifos, isoproturon, or tebuconazole on the diversity and composition of the soil bacterial community. *Front. Microbiol.* 9, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01412>
- Tang, F.H.M., Lenzen, M., McBratney, A., Maggi, F., 2021. Risk of pesticide pollution at the global scale. *Nat. Geosci.* 14, 206–210. <https://doi.org/10.1038/s41561-021-00712-5>
- Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A., Aronsson, A.C., 2017. Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Front. Plant Sci.* 8, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00049>
- Trivedi, P., Leach, J.E., Tringe, S.G., Sa, T., Singh, B.K., 2020. Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 607–621. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>
- Tscharntke, T., Clough, Y., Wanger, T.C., Jackson, L., Motzke, I., Perfecto, I., Vandermeer, J., Whitbread, A., 2012. Global food security, biodiversity conservation and the future of agricultural intensification. *Biol. Conserv.* 151, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.01.068>
- White, K.E., Hoppin, J.A., 2004. Seed treatment and its implication for fungicide exposure assessment. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 14, 195–203. <https://doi.org/10.1038/sj.jea.7500312>
- Wołejko, E., Jabłońska-Trypuć, A., Wydro, U., Butarewicz, A., Łozowicka, B., 2020. Soil biological activity as an indicator of soil pollution with pesticides – A review. *Appl. Soil Ecol.* 147. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.09.006>

2 AVALIAÇÃO DOS POTENCIAIS EFEITOS DA APLICAÇÃO REPETIDA DE PESTICIDAS NA MICROBIOTA DE SOLOS COM DIFERENTES HISTÓRICOS DE USO

Resumo

A microbiota de solos com diferentes históricos de uso é distinta, e podem apresentar diferenças na susceptibilidade a estresses, como o causado pelo contato com moléculas xenobióticas. Na agricultura, entre os compostos aplicados durante o cultivo estão os pesticidas, os quais auxiliam no controle pragas, patógenos e plantas invasoras, mas que podem também, ao entrar em contato com o solo, causar efeitos adversos na microbiota. Nesse trabalho foram investigados os efeitos dos sete pesticidas das três classes principais (herbicidas, inseticidas e fungicidas) em solos com e sem o histórico de manejo agrícola, avaliando os efeitos com aplicação única e repetida, em experimentos de microcosmos. Para acessar modificações na comunidade microbiana foram empregadas a mensuração do potencial enzimático do solo, a quantificação dos genes associados a fosfatase alcalina (*phoD*), fixação de nitrogênio (*nifH*), o gene marcador filogenético para bactérias (16S rRNA) e para fungos (espaçador intergênico-ITS). Também foi empregada a técnica de polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição terminal (T-RFLP) das comunidades bacterianas e fúngicas para mensurar os efeitos sobre o perfil dessas comunidades. Os pesticidas ocasionaram modificações na estrutura das comunidades do solo e geraram alterações nos demais parâmetros avaliados para os dois solos testados. Foi encontrado que as três classes de pesticidas causaram alterações nos perfis das comunidades bacterianas e fúngicas, sendo que as comunidades bacterianas do solo agrícola foram mais responsivas a aplicação dos fungicidas e herbicidas e as comunidades fúngicas do solo florestal foram mais suscetíveis a aplicação dessas classes de pesticidas. O potencial enzimático do solo florestal, assim como a quantificação do gene *phoD*, foram mais alterados nesse tipo de solo que no solo agrícola. Esses resultados mostram a importância de considerar as diferentes classes de pesticidas, independente do seu mecanismo de ação alvo, assim como a importância de investigar os seus possíveis efeitos tanto nas comunidades bacterianas quanto fúngicas de diferentes solos para compreender seu real efeito sobre a comunidade microbiana do solo.

Palavras-chave: qPCR, TRFL-P, Comunidade bacteriana, Comunidade fúngica, Solo agrícola e Solo florestal

Abstract

Microbiota from soils with different history of use are distinct, and may present differences in susceptibility to stresses, such as those caused by contact with xenobiotic molecules. In agriculture, among the compounds applied during cultivation are pesticides, which help to control pests, pathogens, and invasive plants, but which can also, when in contact with soil, cause adverse effects on the microbiota. In this work, the

effects of seven pesticides of the three main classes (herbicides, insecticides, and fungicides) on soils with and without a history of agricultural management were investigated, the effects with single and repeated application in microcosm experiments were evaluated. To access changes in the microbial community, soil enzymatic potential was measured, genes associated with alkaline phosphatase (*phoD*), nitrogen fixation (*nifH*), the phylogenetic marker gene for bacteria (16S rRNA), and fungi (intergenic spacer-ITS) were quantified. The technique of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) of bacterial and fungal communities was also used to measure the effects of pesticides on the profile of these communities. The pesticides caused changes in the structure of the soil communities profile and generated changes in the other parameters evaluated for the two tested soils. It was found that the three classes of pesticides caused changes in the profiles of bacterial and fungal communities, with bacterial communities in agricultural soil being more responsive to the application of fungicides and herbicides and fungal communities in forest soil being more susceptible to the application of these classes of pesticides. The enzymatic potential of forest soil, as well as the quantification of the *phoD* gene, were more modified in forest soil than in agricultural soil. These results show the importance of considering the different classes of pesticides regardless of their target mechanism, as well as the importance of investigating their effects on both bacterial and fungal communities in different soils to understand their substantial effect on the soil microbial community.

Keywords: qPCR, TRFL-P, Bacterial community, Fungal community, Agricultural soil, and Forest soil.

2.1 Introdução

As comunidades microbianas edáficas são sensíveis às mudanças de uso do solo, alterações em temperatura, incremento de fertilizantes inorgânicos, dentre outros fatores derivados do manejo agrícola (Allison e Martiny, 2008). Os estudos indicam que o retorno dessas comunidades a estágios iniciais de composição e funcionalidade após alterações causadas pode ser bastante demorado e ocorrer de forma restrita (Shade et al., 2012). Estes efeitos podem intensificar as alterações quando os distúrbios aplicados são repetidos ao longo do tempo, como, por exemplo, nas práticas utilizadas no manejo agrícola (Lammel et al., 2021). Dessa forma, as comunidades assumem diferentes trajetórias e atingem estados alternativos de estabilidade, diferenciando da comunidade inicial pré-distúrbio. Portanto, solos com diferentes históricos de uso, possuem comunidades microbianas distintas, as quais podem apresentar diferentes níveis de suscetibilidade quando submetidas a estresses, como, por exemplo, no contato com compostos xenobióticos.

Os pesticidas aplicados para o controle de pragas e patógenos em cultivos agrícolas possuem o potencial de ocasionar efeitos adversos em comunidades

microbianas não alvo presentes no solo (Streletsii et al., 2022). No entanto, os efeitos podem variar conforme a concentração aplicada, frequência da aplicação e com as condições inerentes do solo como a quantidade de carbono e as características físicas (Murugan, 2013).

Além das variações que podem ocorrer devido às características inerentes do solo, a dinâmica da microbiota do solo também sofre mudanças após a exposição repetida a esses compostos. Dessa forma, aplicações repetidas têm sido testadas para investigar como a comunidade microbiana se altera frente a esses distúrbios (Allegrini et al., 2017; Fang et al., 2015; Wang et al., 2020; Zhang et al., 2016). Para alguns pesticidas, as exposições repetidas da microbiota do solo aceleram o processo de degradação das moléculas, porque que as comunidades aptas a degradarem essas moléculas são enriquecidas ao longo dos ciclos de exposição (Han et al., 2021). Porém, para outros pesticidas a degradação é reduzida, provavelmente ocasionado pela situação oposta, onde há inibição de grupos microbianos, dentre os quais pode haver possíveis degradadores (Fang et al., 2016).

Os pesticidas são divididos em classes e entre elas estão os herbicidas, fungicidas e inseticidas. No Brasil, os pesticidas classificados como os mais comercializados entre 2009 e 2020 estão o herbicida glifosato (1^a colocação), o herbicida 2,4-D (2^a colocação), o fungicida macozebe (4^a colocação), o inseticida acefato (6^a colocação), o inseticida imidacloprida (10^a colocação) e o fungicida carbendazim (14^a colocação) (IBAMA, 2022), sendo que esses pesticidas e o cadusafos, inseticida e nematicida, foram escolhidos para serem avaliados no presente trabalho.

Os herbicidas são utilizados no controle de plantas não desejadas que se desenvolvem em conjunto com as espécies cultivadas, prejudicando a produtividade e interferindo na colheita (Kortekamp, 2011). O glifosato ([N-fosfometil] glicina) é um herbicida organofosforado de amplo espectro, que atua inibindo a enzima ESPS (5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase), a qual participa da via biossintética de aminoácidos aromáticos necessários para a sobrevivência das plantas (Liu et al., 2018). O efeito do glifosato sobre a diversidade da comunidade microbiana do solo foi estudado em experimentos de microcosmos e os resultados apontaram para uma ausência de efeitos na comunidade microbiana em solo com histórico de aplicação desse herbicida (Dennis et al., 2018), esse mesmo estudo indicou a importância de testar o glifosato em

solos sem o histórico de aplicação da molécula. Em relação ao 2,4-D, esse herbicida é uma auxina sintética com ação sistêmica e seletiva que atua no controle de plantas daninhas de folhas largas (Kumar et al., 2014). Esse herbicida aumenta a síntese de etileno causando uma divisão celular descontrolada que danifica as células vegetais. Um estudo que avaliou possíveis modificações ocasionados por esse herbicida na comunidade bacteriana do solo verificou uma modificação na composição dessa comunidade após a aplicação do 2,4-D, a qual se reestabeleceu após três semanas da aplicação (Moretto et al., 2018).

Os inseticidas são utilizados na agricultura para controlar os insetos-praga (Stephenson et al., 2006) que representam uma das principais causas de perda de produtividade agrícola. O inseticida e acaricida organofosforado acefato (O,S-dimetil acetilforamidotioato) tem uso via aplicação foliar (Chai et al., 2010), com ação de amplo espectro, inibindo a acetilcolinesterase (AChE) em insetos (Lin et al., 2022). Trabalhos que avaliam a influência dessa molécula sobre a comunidade microbiana edáfica se concentram prioritariamente em identificar ou testar microrganismos capazes de degradar essa molécula (Lin et al., 2022; Singh et al., 2020), portanto, estudos que avaliam seu potencial efeito na comunidade microbiana total do solo são escassos. O imidacloprida (1-(6-cloro-3-piridilmetil) -N-nitroimidazolidin-2-ilidenoamina) é um inseticida neonicotinóide aplicado diretamente nas folhas possuindo ação sistêmica, atuando na competição com o receptor nicotínico de acetilcolina neural (nAChR), alterando dessa forma o sistema nervoso central de insetos (Garg et al., 2021). Estudos reportaram respostas de inibição da atividade microbiana após aplicação do imidaclorida, evidenciadas pela diminuição da atividade de enzimas presentes no solo, bem como a redução de microrganismos suscetíveis, redução da abundância e aumento da diversidade (Cycoń et al., 2013; Garg et al., 2021; Mahapatra et al., 2017). O inseticida e nematicida cadusafos (O-etil, S,S bis (1-metilpropil) é um organofosforado comumente aplicado diretamente no solo, tem ação de amplo espectro inibindo a colinesterase interferindo no sistema nervoso central dos organismos alvos (Kookana et al., 2014). Trabalhos que avaliaram o efeito do cadusafos em comunidades microbianas do solo encontraram modificações no perfil de consumo de fontes de carbono após a exposição a esse pesticida (Fouché et al., 2017).

Os fungicidas têm a função de prevenir e suprimir a presença de fungos patogênicos, bem como estruturas fúngicas em cultivos agrícolas. O mancozebe

(polímero de etileno [bis] ditiocarbamato de manganês complexado com sal de zinco) é um fungicida carbamato de contato, não sistêmico e de amplo espectro, que atua na interrupção do metabolismo lipídico de fungos. Esse fungicida foi reportado alterando indicadores do ciclo de nitrogênio no solo (Černohlávková et al., 2009; Feld et al., 2015; Walia et al., 2014). Enquanto o carbendazim (metil benzimidazol-2-yl carbamato), fungicida benzimidazol (Han et al., 2019), que pode ser aplicado diretamente nas sementes e folhas, tem sido relacionado com a redução da atividade de enzimas do solo (Shao e Zhang, 2017; Yan et al., 2011), modificações na estruturação da comunidade bacteriana (Wang et al., 2020) e ao acréscimo na abundância de genes de resistência a antibióticos em comunidades microbianas que tiveram contato com esse fungicida (Song et al., 2022; Zhang et al., 2020). O carbendazim é um fungicida sistêmico com atividade protetora e curativa que atua inibindo a divisão celular em fungos.

Considerando os efeitos adversos relatados dos pesticidas que estão entre os mais comercializados no Brasil, é importante investigar os efeitos dos pesticidas em solos brasileiros com diferentes históricos de uso, ponderando que solos com diferentes históricos podem influenciar na dinâmica da comunidade microbiana quando em contato com essas moléculas. Além dessa abordagem, aplicações repetidas podem trazer informações de como as comunidades microbianas desses solos se estruturam após a aplicação repetida, sendo que a avaliação de como a comunidade microbiana responde a estresses múltiplos é importante para fornecer informações sobre o desempenho da comunidade de cada um dos sistemas e como essas funções podem ser recuperadas após possíveis distúrbios (Neal et al., 2021).

Nesse contexto, o presente estudo desenvolveu um experimento em microcosmos para avaliar os possíveis efeitos da aplicação de 7 pesticidas agrícolas amplamente utilizados no Brasil em comunidades bacterianas e fúngicas presentes em solo florestal e solo agrícola, em aplicação única e repetida. Os objetivos foram: 1) avaliar se há diferenças na resposta devido à aplicação de pesticidas entre solos diferentes históricos de uso; e 2) avaliar se os pesticidas escolhidos ocasionam as modificações significativas nos parâmetros avaliados para as comunidades fúngicas e bacterianas de microcosmos de solos agrícola e florestal. A hipótese é que solos sem histórico de manejo (solo florestal) seriam mais suscetíveis, apresentando modificações significativas na dinâmica da comunidade bacteriana e fúngica com a aplicação dos pesticidas comparados com o

solo agrícola, onde a comunidade foi submetida previamente a diferentes práticas de manejo, que incluiu o uso de pesticidas.

2.2 Metodologia

2.2.1 Amostragem do solo

As amostras de solo foram coletadas a uma profundidade de 0 a 10 cm em uma área agrícola (22° 43' 05.0"S 47° 36' 55.5"W) e uma área de remanescente florestal (22° 42' 56.7"S 47° 36' 49.7"W), ambas localizadas na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP) Piracicaba, Brasil. As amostras foram transportadas para o Departamento de Ciência do Solo (ESALQ-USP), onde foram submetidas à caracterização química e física e encaminhadas para análise de resíduos de pesticidas. Ambos os solos foram classificados como Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico típico e os parâmetros químicos e físicos estão apresentados na tabela 1. Em relação à análise de resíduos de pesticidas, apenas o fungicida carbendazim foi detectado em solo agrícola.

Tabela 1. Parâmetros químicos e físicos dos solos utilizados para a montagem dos experimentos em microcosmos.

Parâmetros Químicos	Solo florestal	Solo agrícola
pH CaCl ₂	4,6	5,4
M.O. Colorimétrica g.dm. ⁻³	45	18
K Resina mmolc.dm. ⁻³	1,3	1,5
Ca Resina mmolc.dm. ⁻³	20	21
Mg Resina mmolc.dm. ⁻³	7	11
H+Al SMP mmolc.dm. ⁻³	52	20
SB mmolc.dm. ⁻³	28,3	33,5
CTC mmolc.dm. ⁻³	80,3	53,5
V (%)	35	63,5
P Resina mg.dm. ⁻³	9	21
Parâmetros Físicos	Solo florestal	Solo agrícola
AT g kg. ⁻¹	723	790
Silte g kg. ⁻¹	126	35
Argila (c/ disp) g kg. ⁻¹	151	176
Classe de Textura	md-ar	md-ar

2.2.2 Experimento em microcosmos

As amostras coletadas foram tamisadas em peneira de 2 mm para homogeneização do solo, sendo que 80 g do solo peneirado foram acondicionados em

recipientes acrílicos com capacidade total de 150 mL. A capacidade de retenção de água foi ajustada para 60% para cada microcosmo e em seguida foram parcialmente fechados para permitir a troca gasosa. Os microcosmos foram incubados a 28 °C por 15 dias antes da aplicação dos tratamentos para permitir a recuperação das comunidades microbianas de distúrbios físicos (Figura 1). Os microcosmos compostos pelo solo florestal e agrícola receberam, separadamente, 7 tratamentos na formulação comercial, como apresentado na tabela 2, sendo que a água esterilizada foi adicionada ao tratamento controle. Cada tratamento apresentou 3 repetições, sendo arranjado em um delineamento de blocos casualizados. Os pesticidas foram aplicados na dose correspondente à dose máxima recomendada para os usos comerciais. Para este cálculo, foi calculada a área de superfície exposta do recipiente $25,10^{-2} \text{ m}^2$ e com este valor foi feita uma conversão direta com dose por hectare recomendada pela formulação comercial. Todos os microcosmos foram incubados no escuro a 28 °C e amostrados destrutivamente aos 3 e 7 dias após a primeira aplicação. Uma segunda aplicação dos tratamentos foi feita aos 7 dias de incubação e uma amostragem foi realizada após 3 dias. Para cada coleta, uma subamostra de 1 g de solo foi armazenada a -20 °C para posterior extração de DNA, e o solo restante de cada microcosmo foi mantido a 4 °C por 2 dias até a determinação das enzimas.

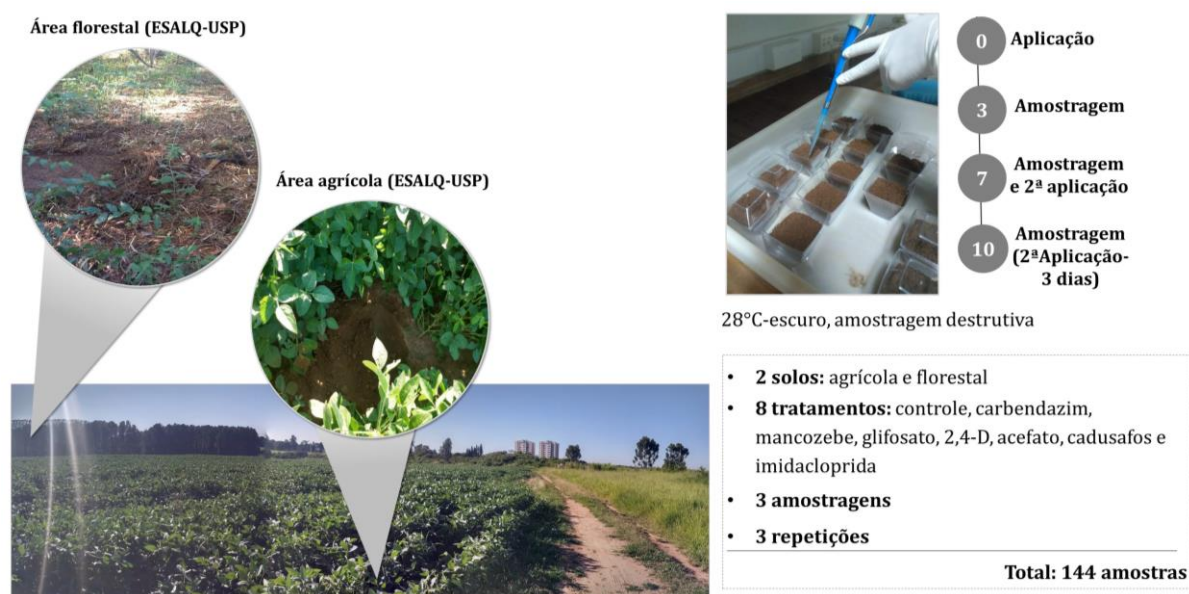


Figura 1. Imagens da área de coleta de solo, experimento e delineamento experimental empregados nesse capítulo

Tabela 2. Concentração e dose recomendada para cada composto ativo e o seu correspondente comercial.

Composto ativo	Correspondente comercial	Concentração do composto ativo	Dose recomendada
Carbendazim ¹	Carbendazim Nortox®	50% (m/v)	500 mL/ha
Mancozebe ¹	Dithane NT®, Dow AgroSciences	80% (m/m)	5000 g/ha
2,4-D ²	DMA 806 BR®, Dow AgroSciences	80,6% (m/v)	3,5 l/ha
Glifosato ²	Preciso®, Consagro	74,7% (m/m)	3500 g/ha
Acefato ³	Perito 970 SG®, UPL	97% (m/m)	600 g/ha
Cadusafos ^{3,4}	Rugby® 200 CS, FMC	20% (m/v)	15 l/ha
Imidacloprida ³	Evidence 700 WG®, Bayer	70% (m/m)	400 g/ha

Legenda: Classe de pesticida: ¹Fungicida, ²Herbicida, ³Inseticida e ⁴Nematicida.

2.2.3 Determinação do potencial enzimático

As enzimas que tiveram a sua atividade potencial determinada foram a arilsulfatase, que indica o potencial de disponibilidade de sulfato da matéria orgânica (Tabatabai e Bremner, 1970), a fosfatase ácida, que participa na disponibilidade de fósforo (Tabatabai e Bremner, 1969), e β -glicosidase, envolvida na degradação da matéria orgânica (Eivazi e Tabatabai, 1988). Em suma, 1 g de amostra de solo foi incubada com o substrato específico por 1 hora a 37 °C, após este período de incubação, a cor produzida pelas amostras foi medida através de um espectrofotômetro a 410 nm de absorbância, e a determinação do p- nitrofenol consumido ocorreu através de uma comparação com uma curva padrão com as seguintes concentrações desse composto: 0, 10, 20, 30, 40 e 50 μg de p-nitrofenol mL^{-1} . A atividade potencial dessas enzimas foi expressa em μg p-nitrofenol $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ solo seco. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote ExpDes.pt (Ferreira et al., 2014) no ambiente R 3.6.1 onde a variabilidade dos dados foi medida por ANOVA e para a comparação entre as médias foi feita com o Teste de Tukey a 5%.

2.2.4 PCR quantitativo (qPCR)

O DNA total das amostras foi isolado utilizando o kit comercial DNeasy PowerSoil® kit (Qiagen, Hilden, Germany) seguindo as recomendações do fabricante e em seguida foram armazenadas a -20 °C até serem submetidas à quantificação dos genes de interesse foram realizados por meio da técnica de PCR em tempo real. Os genes associados a fosfatase alcalina (*phoD*) foram amplificados utilizando os

oligonucleotídeos ALPS-F730: (5'-CAGTGGGACGACCACGAGGT-3'); ALPS-R1101: (5'-GAGGCCGATCGGCATGTTCG-3') (Sakurai et al., 2008), o gene relacionado a fixação de nitrogênio (*nifH*) foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos FGHP19F (5'-ACGGCAARGGTGGNATHG-3') e POLR (5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3'), bem como o gene marcador de filogenético para bactérias (16S rRNA) utilizando os oligonucleotídeos P1F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') e P2r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') para amplificar a região (Mckinney et al., 2018) e o para quantificação da comunidade fúngica foi amplificado a região espaçadora intergênica (ITS) utilizando os oligonucleotídeos ITS1F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e 5.8SR (5'-CGCTGCGTTCTTCAT CG-3') (Heuer H. et al., 1997). Cada reação teve um volume final de 20 µl contendo 10 µl de SYBR® green PCR Master Mix (2x Applied Biosystems®), 0,5 µl de BSA (albumina sérica bovina - 10 mg mL⁻¹), 1 µl de cada oligonucleotídeo (100 pmol) e 1 µl da amostra de DNA (20 ng). As reações foram realizadas no Sistema StepOne Real-Time PCR (Applied Biosystems®). Reações duplicadas foram realizadas para cada amostra de DNA e os controles negativos (livres de DNA) foram incluídos em cada corrida. A análise da curva de fusão após cada reação confirmou a especificidade dos produtos. As curvas padrão foram geradas usando diluições em série de dez vezes do vetor pGEM-T Easy (Promega®) contendo um fragmento amplificado por PCR do gene alvo. A eficiência da reação (E) foi determinada com a equação: $E = [10^{(-1/\text{slope})} - 1]$, e as cópias dos genes (g solo⁻¹) foram expressas em Log₁₀. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote ExpDes.pt (Ferreira et al., 2014) no ambiente R 3.6.1 onde a variabilidade dos dados foi medida por ANOVA e a comparação entre as médias foi feita com o Teste de Tukey a 5%.

2.2.5 Análise de TRFL-P e processamento dos dados

Para analisar acessar a dinâmica da comunidade bacteriana e fúngica presentes nas amostras, foi utilizada a técnica de polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição terminal (T-RFLP). Primeiramente, o gene 16S rRNA e a região ITS de fungos foram amplificados separadamente por PCR (reação em cadeia da polimerase). Para amplificação do 16S rRNA foram utilizados os primers 8F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') marcados com 6-carboxifluoresceína (6-FAM) na

extremidade 5', e 926R (5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3'). Para a região ITS foram aplicados os primers ITS1F-(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') com 6-carboxifluoresceína (6-FAM) na extremidade 5', e ITS4R-(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Avis et al., 2006) e os produtos de PCR gerados foram verificados em gel de agarose a 1,5% (p/v). Aliquotas de 10 µl dos produtos de PCR foram digeridos usando as enzimas de restrição *HhaI* (10 U/µl) e *HhaIII* (10 U/µl) para os produtos amplificados de 16S rRNA da região ITS, respectivamente. Após a reação de restrição, os produtos amplificados foram submetidos a reação de precipitação com a adição de 2 µl de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) com concentração de 125 mM, 2 µl de acetato de sódio (3 M) e 50 µl de etanol etílico 90% seguido por centrifugação a 4000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O produto precipitado foi lavado com álcool etílico a 70% a 4 °C e o excesso de álcool das placas foi seco em temperatura ambiente. Posteriormente as amostras foram ressuspensas em 9,5 µl de Formamida Hi-Di™, 0,5 µl de GeneScan™ 1200 Liz™ dye e foram submetidos a leitura no sequenciador automático Abi Prism® 3500 Genetic Analyser, Applied Biosystems®. As informações de intensidade e o comprimento dos fragmentos de restrições terminais (T-RFs) foram determinados pelo software GeneMapper® v.4.1 (Applied Biosystems).

2.2.6 Análises estatística dos dados

O processamento dos dados brutos obtidos pelo software GeneMapper® v.4.1 (Applied Biosystems) foi realizado utilizando o programa T-REX (<http://trex.biohpc.org/>) (Culman et al., 2009). Na primeira etapa do processamento dos dados, os ruídos dos picos foram filtrados utilizando como base o desvio padrão da altura dos picos. Em seguida, foi realizado o alinhamento e agrupamento dos picos dos T-RFs arredondando os valores dos T-RFs para o número inteiro mais próximo. Por último, as matrizes finais com as alturas dos T-RFs foram normalizadas dividindo o valor de altura total dentro de cada amostra e os picos que apresentaram uma abundância maior que 1% foram retidos. As análises de α -diversidade e β -diversidade das comunidades bacterianas e fúngicas foram realizadas a partir das matrizes com alturas dos T-RFs.

As métricas de α -diversidade determinadas foram a diversidade com base no índice de Shannon (H'), a riqueza de espécies e a equitabilidade de espécies. O índice H' é

a riqueza, foram calculadas por meio da função *diversity* do pacote *vegan* (Oksanen et al., 2020), enquanto a métrica equitabilidade foi obtida dividindo-se o índice H' pelo logaritmo natural da riqueza de espécies. Para determinar as possíveis diferenças estatísticas nestas métricas entre os tratamentos foi utilizado primeiramente a ANOVA (one-way) ($\alpha=0,05$) e após a verificação das suposições de normalidade e homoscedasticidade foi realizado as comparações pareadas utilizando o HSD de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Nas análises de β -diversidade, para determinar as diferenças entre comunidades microbianas sob influência dos pesticidas, foram utilizadas funções do pacote *vegan* (Oksanen et al., 2020). Primeiramente, as dissimilaridades de Bray-Curtis aos pares foram calculadas por meio da função *metaMDS*. Os gráficos de NMDS (escalonamento multidimensional não métrico) foram gerados primeiramente utilizando a função *ordiplot*, que prepara o gráfico de ordenamento, em seguida a função auxiliar *sites.long* do pacote *BiodiversityR* (Kindt, 2022) foi aplicada para extrair as informações obtidas com a função *ordiplot*. As representações em NMDS foram então finalizadas utilizando o pacote *ggplot2* (Wickham H, 2016).

As funções do pacote *vegan* (Oksanen et al., 2020) também foram utilizadas para determinar as diferenças potenciais na estrutura das comunidades microbianas após a aplicação dos pesticidas. Primeiramente, a função *betadisper* foi utilizada para verificar a homogeneidade das variâncias por meio da análise de PERMIDISP (Análises Multivariadas Permutacionais de dispersão) de todos os resultados da PERMANOVA (Análise de Variância Permutacional Multivariada). O PERMIDISP teve por objetivo testar a homogeneidade das dispersões dos grupos. Após a verificação, a análises de PERMANOVA foram realizadas com base nas dissimilaridades de Bray-Curtis usando a função *adonis*. Para determinar quais pesticidas ocasionaram um impacto maior na estruturação das comunidades microbianas dentro de cada classe de pesticida, os dados de dissimilaridade de Bray-Curtis foram utilizados para calcular a distância entre os centróides das comunidades tratadas e das comunidades controle. A visualização desses dados foi feita por gráfico de linhas utilizando o pacote *ggplot2*.

2.3 Resultados

2.3.1 Potencial enzimático do solo

Foram observadas variações nas atividades potenciais das três enzimas do solo avaliadas: β -glicosidade, arilsulfatase e fosfatase ácida, após a aplicação dos diferentes pesticidas ao longo do experimento. Em relação aos resultados do potencial enzimático da enzima β -glicosidase, na amostragem 1 os microcosmos de solo florestal que receberam a aplicação do fungicida mancozebe apresentaram uma atividade enzimática elevada em comparação aos microcosmos controle. Na amostragem 3, os microcosmos de solo agrícola que receberam a aplicação do fungicida carbendazim apresentaram os valores mais altos de atividade ($38,12 \mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1}$) em comparação ao controle ($30,36 \mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1}$) (Figura S1 A). Nessa mesma amostragem, microcosmos de solo florestal tratados com o inseticida imidacloprida apresentaram um aumento significativo ($34,14 \mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1}$) na atividade potencial da β -glicosidase em comparação ao controle ($28,41 \mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1}$) (Figura S1 A).

Avaliando o potencial de atividade da enzima arilsulfatase, na amostragem 1, o microcosmo de solo de florestal que recebeu o inseticida acefato teve um acréscimo nos valores dessa enzima ($105,37 \mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1}$) em relação ao controle ($78,42 \mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1}$) (Figura S1 B). Na amostragem 2, os valores para a atividade da arilsulfatase foram inferiores para os microcosmos de solo florestal que receberam a aplicação dos inseticidas acefato ($65,75 \mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1}$) e cadusafos ($82,54 \mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1}$) em comparação ao tratamento controle ($107,48 \mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1}$) (Figura S1 B).

O potencial de atividade da fosfatase ácida apresentou diferenças significativas na segunda amostragem, quando os microcosmos de solo florestal tratados com o inseticida acefato apresentaram uma redução da atividade dessa enzima ($369,99 \mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1}$) em comparação com o tratamento controle (Figura S1 C).

2.3.2 PCR quantitativo (qPCR)

Foram quantificados os genes marcadores 16S rRNA, ITS, *nifH* e *phoD*, sendo que os resultados dos genes *nifH* e *phoD* foram analisados e apresentados em valores de

razão com o gene 16S rRNA visando analisar a proporção desses genes em relação à comunidade bacteriana total quantificada pelo gene 16S rRNA.

Nas comunidades bacterianas mensuradas pelo 16S rRNA foi observado um número maior de cópias desse gene em microcosmos de solo florestal que receberam o inseticida imidacloprida em comparação ao tratamento controle na amostragem 3. Para os microcosmos de solo agrícola não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos nas diferentes amostragens (Figura 2 A). As comunidades fúngicas de solo agrícola sob influência do fungicida mancozebe e glifosato apresentaram número de cópias reduzidas do gene ITS em relação ao controle na amostragem 2 (Figura 2 B).

A proporção do gene *phoD* foi reduzida significativamente em microcosmos de solo florestal na amostragem 3 em comparação ao tratamento controle após a aplicação dos inseticidas imidacloprida e acefato e dos herbicidas 2,4-D e glifosato (Figura 2 C). As comunidades de bactérias fixadoras de nitrogênio tiveram uma redução indicada pela quantificação do gene *nifH* em solos agrícolas com a aplicação do herbicida 2,4-D e do inseticida cadusafos na amostragem 1, enquanto na amostragem 2, as comunidades bacterianas presentes em microcosmos de solo florestal sob influência do herbicida glifosato e imidacloprida apresentaram maiores valores para o gene *nifH* quando comparados a comunidade controle (Figura 2 D).

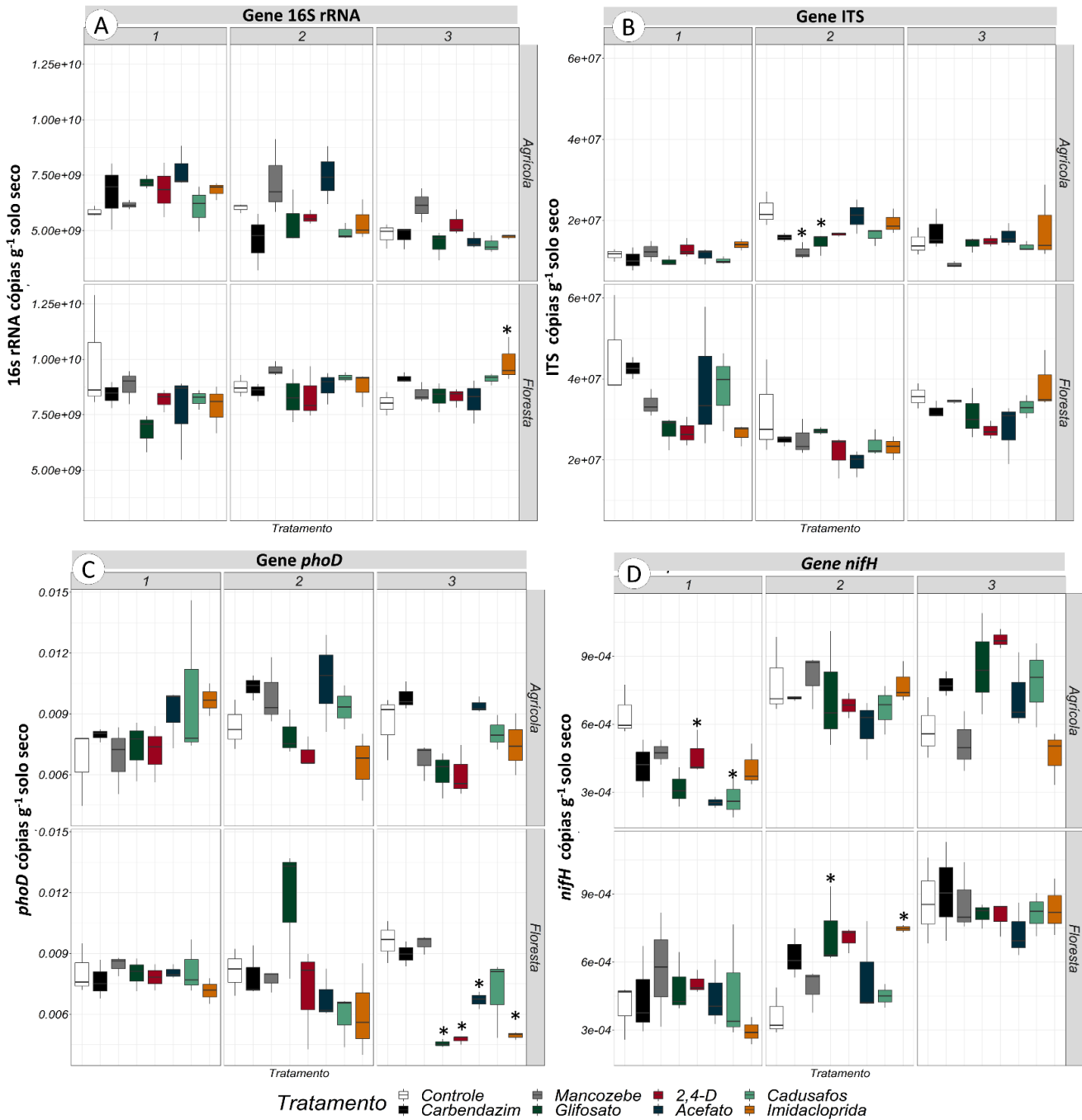


Figura 2. Resultados das quantificações, por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) das regiões 16S rRNA (A), ITS (B), *phoD* (C) e *nifH* (D) nos diferentes tratamentos de microcosmos submetidos a aplicação dos diferentes defensivos. Os valores indicam distribuição dos dados de 3 repetições, e os tratamentos indicados com * que a diferença foi significativa seguindo o teste de Tukey com um $p < 0,05$ comparado ao tratamento controle.

Para facilitar a visualização dos resultados estatisticamente significativos dos genes quantificados e do potencial enzimático foi organizada a tabela 3, com indicação do incremento ou redução ocasionados pelos pesticidas em cada indicador avaliado.

Tabela 3. Compilação dos resultados significativos em comparação ao tratamento controle dos genes quantificados e do potencial enzimático das enzimas avaliadas para microcosmos de solo florestal e solo agrícola nas três amostragens.

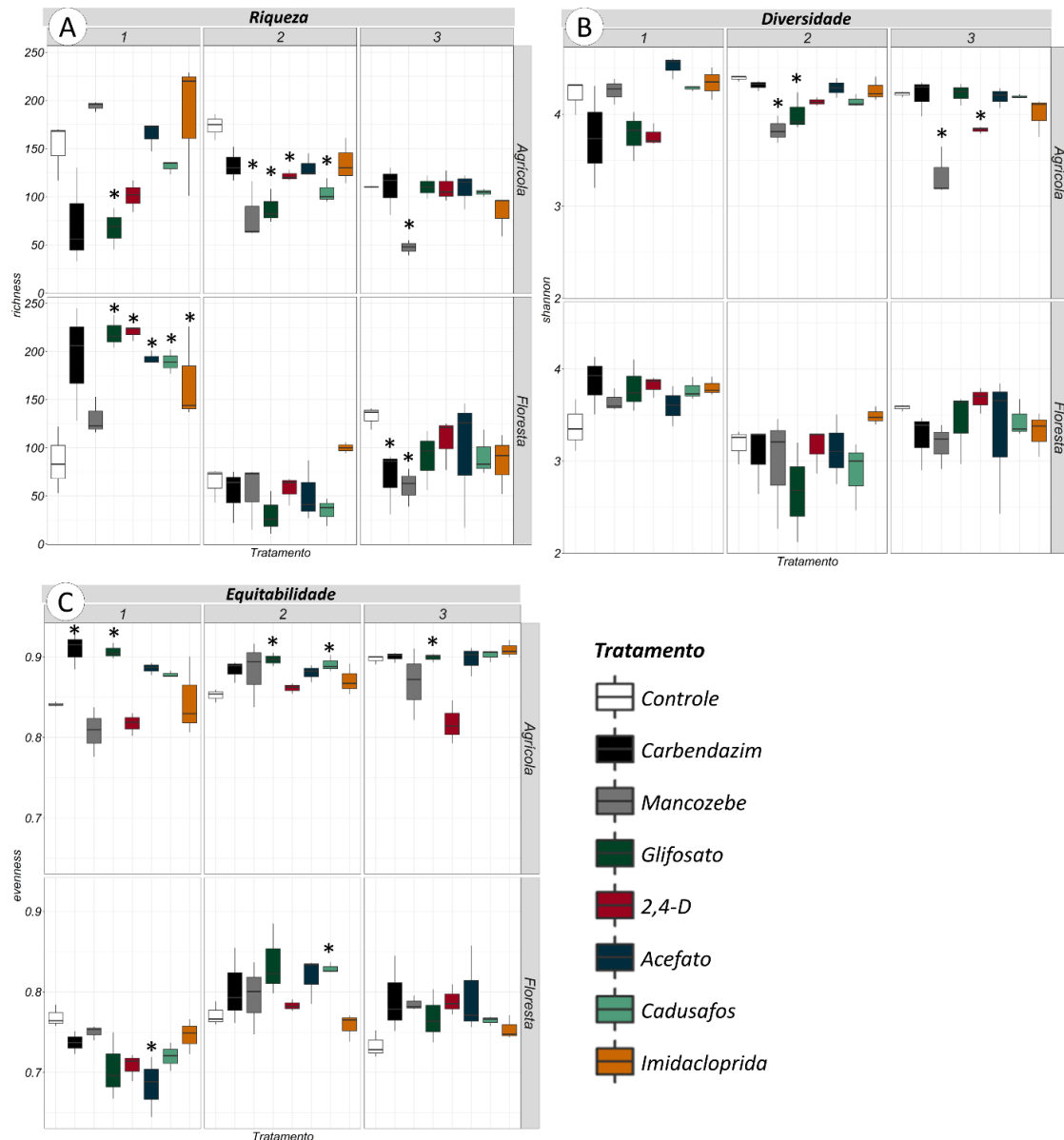
	Indicador	Ams	Solo florestal	Ams	Solo agrícola
Quantificação de genes (qPCR)	16S rRNA	3	Imidacloprida ↓	<i>ns</i>	<i>ns</i>
	ITS		<i>ns</i>	2	Mancozebe ↑ Glifosato ↑
	<i>nifH</i>	2	Glifosato ↓ Imidacloprida ↓	1	2,4-D ↑ Cadusafos ↑
	<i>phoD</i>	3	Imidacloprida ↑ Acefato ↑ 2,4-D ↑ Glifosato ↑		
Potencial enzimático	β-glicosidase	1 3	Mancozebe ↑ Imidacloprida ↑	3	Carbendazim ↑
	Arilsulfatase	1 e 2 1	Acefato ↑ Cadusafos ↓	<i>ns</i>	<i>ns</i>
	Fosfatase ácida	2	Acefato ↑	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Legenda: Ams: amostragem; ↓ redução no valor do indicador e ↑ aumento no valor do indicador; *ns*: resultado não significativo

2.3.3 Métricas de α -diversidade das comunidades bacterianas e fúngicas

Diferenças significativas das métricas de α -diversidade para as comunidades bacterianas foram observadas em todas as amostragens realizadas. Na amostragem 1, houve um aumento do índice de riqueza dos microcosmos de solo florestal que receberam os pesticidas cadusafos, acefato, imidacloprida, 2,4-D, glifosato e carbendazim (Figura 3 A). Nos microcosmos de solo agrícola, o glifosato reduziu a riqueza e aumentou o índice de equitabilidade nessa amostragem (Figura 3 A). Na amostragem 2, a riqueza dos microcosmos de solo agrícola foi reduzida com a aplicação dos pesticidas cadusafos, mancozebe, 2,4-D e glifosato (Figura 3 A). Um aumento no índice de equitabilidade foi ocasionada pelo glifosato, enquanto esse mesmo herbicida e o fungicida mancozebe reduziram a diversidade (H') em solo agrícola também na amostragem 2 (Figura 3 C). Nos microcosmos de solo florestal, o cadusafos elevou o índice de equitabilidade comparado ao tratamento controle na amostragem 2 (Figura 3 C). Na amostragem 3, os fungicidas mancozebe e carbendazim reduziram a riqueza de microcosmos de solo florestal (Figura 3 B). Nessa mesma amostragem para microcosmos de solo agrícola, o mancozebe reduziu os índices de riqueza (Figura 3 A) e

diversidade (Figura 3 B), enquanto o 2,4-D reduziu os índices de equitabilidade (Figura 3 C) e diversidade (Figura 3 B).



As comunidades fúngicas dos microcosmos de solo florestal tiveram um acréscimo no número de espécies após terem recebido o acefato e o cadusafos (Figura 4 A), e um aumento na diversidade com a aplicação do cadusafos na amostragem 1 (Figura 4 B). Na amostragem 3, o herbicida 2,4-D aumentou os índices de diversidade (Figura 4 B) e equitabilidade (Figura 4 C) dos microcosmos de solo florestal. Nos microcosmos de solo

agrícola, o herbicida 2,4-D reduziu a riqueza e a diversidade na amostragem 1 (Figura 4 B) e o inseticida acefato também aumentou a riqueza nessa amostragem para os microcosmos de solo agrícola (Figura 4 A). Na amostragem 2 o glifosato aumentou os índices de riqueza (Figura 4 A) e de diversidade (Figura 4 B) comparados com o controle e microcosmos de solo agrícola.

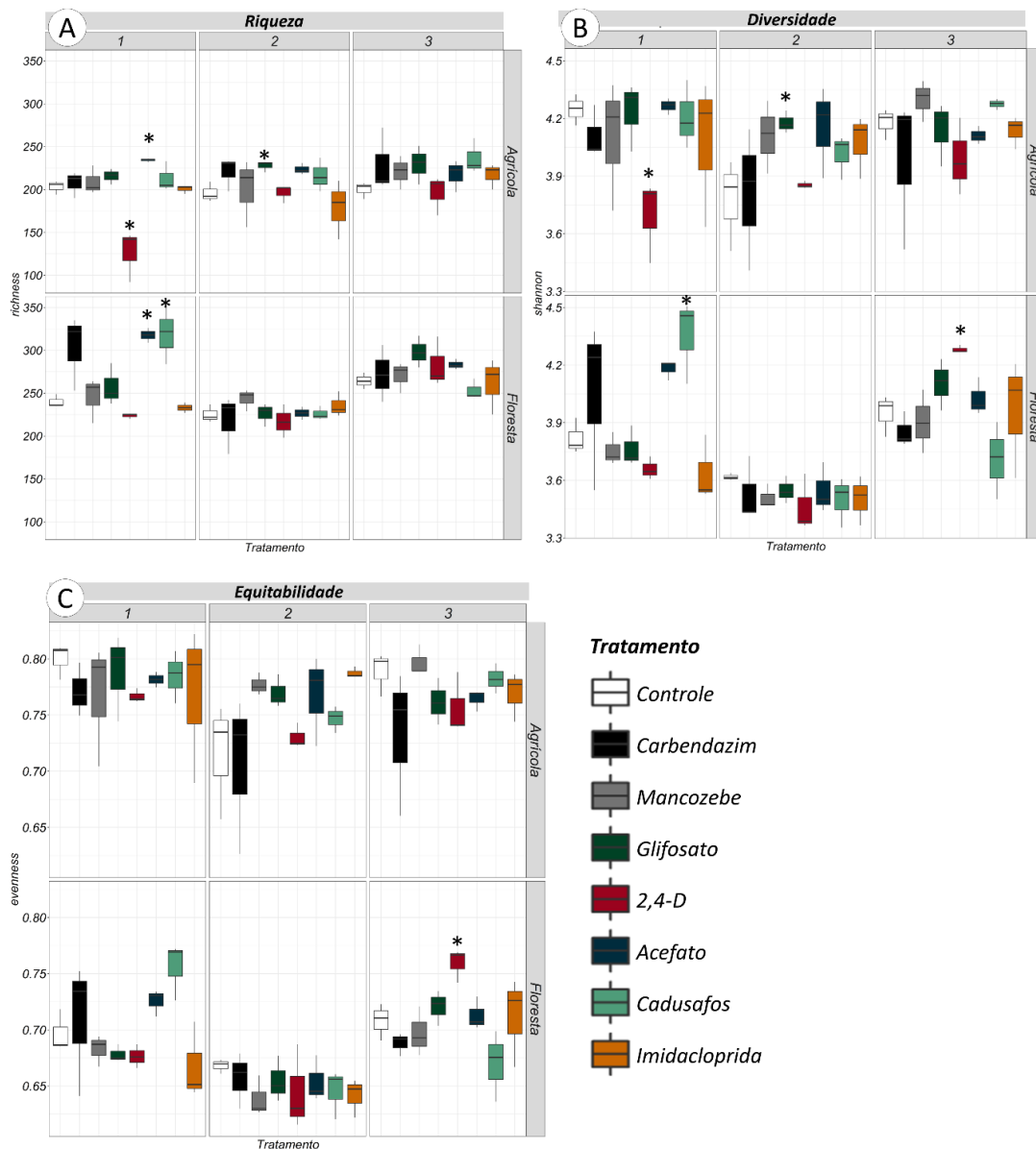


Figura 4. Métricas de α -diversidade para as comunidades fúngicas presentes nos microcosmos de solos agrícola e florestal. A) Riqueza, B) Diversidade (H') e C) Equitabilidade. Os valores indicam distribuição dos dados de 3 repetições, e os tratamentos indicados com * que a diferença foi significativa seguindo o teste de Tukey com um $p < 0,05$ comparado ao tratamento controle.

Para simplificar a visualização os resultados significativos das métricas de α -diversidade para as comunidades fúngicas e bacterianas dos solos agrícolas e florestal foi organizado a tabela 4, onde está apresentado a redução ou incremento nos valores desses parâmetros após a aplicação dos pesticidas (Tabela 4).

Tabela 4. Compilação dos resultados significativos em comparação ao tratamento controle das métricas de diversidade α para microcosmos de solo florestal e solo agrícola nas três amostragens.

	Métrica	Solo Florestal	Ams	Solo Agrícola	Ams	
Comunidade bacteriana	Riqueza	2,4-D ↑	1	Glifosato ↑	1	
		Glifosato ↑		Glifosato ↓	2	
		Acefato ↑		2,4-D ↓		
		Cadusafos ↑	Mancozebe ↓			
		Imidacloprida ↑	Cadusafos ↓			
		Mancozebe ↑	3	Mancozebe ↓	3	
	Carbendazim ↑					
	Diversidade	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	Glifosato ↓	2
					Mancozebe ↓	
					2,4-D ↓	3
Mancozebe ↓						
Equitabilidade	Acefato ↓	1	Glifosato ↑	1		
	Cadusafos ↑	2	Carbendazim ↑			
				Glifosato ↑	2	
				Cadusafos ↑		
Comunidade fúngica	Riqueza	Acefato ↑	1	2,4-D ↑	1	
		Cadusafos ↑		Acefato ↑		
	Diversidade				Glifosato ↑	2
			2,4-D ↓		3	
			2,4-D ↑		1	
Equitabilidade	2,4-D ↑		3	Glifosato ↑	2	
				<i>ns</i>	<i>ns</i>	

Legenda: Ams: amostragem; ↓ redução no valor da métrica; ↑ aumento no valor da métrica; *ns*: resultado não significativo.

2.3.4 Diferenciação das comunidades presentes no solo agrícola e florestal tratadas com fungicidas

Para avaliar e comparar as alterações das comunidades microbianas de microcosmos de solo agrícola e florestal após a aplicação de fungicidas, a β -diversidade dessas comunidades foi calculada usando as dissimilaridades de Bray-Curtis calculadas com base nos T-RFs e visualizada usando gráficos NMDS. Diferenças na β -diversidade

das comunidades bacterianas de microcosmos de solo florestal que receberam fungicidas não foram estatisticamente suportadas usando PERMANOVA ($F_{2,24}=0,624$), considerando as três amostragens, porém diferenças foram encontradas quando a PERMANOVA foi calculada dentro de cada amostragem (Figura 4 A). Para o solo florestal, a comunidade bacteriana foi alterada com aplicação de fungicidas na amostragem 3 ($F_{2,6}= 0,009$) (Figura 5 A), sendo que as comunidades tratadas com o fungicida carbendazim mostraram-se mais distantes da comunidade controle (Figura S2 A). Para as comunidades microbianas de microcosmos de solos agrícolas, diferenças significativas foram encontradas analisando as três amostragens em conjunto ($F_{2,24}=0,034$) e separadamente para as amostragens 1 ($F_{2,6}=0,027$), 2 ($F_{2,6}=0,004$) e 3 ($F_{2,6}=0,025$) (Figura 5 B), sendo que as comunidades sob influência do carbendazim estavam mais distantes das comunidades controle na primeira e última amostragem, enquanto na amostragem 2 comunidades que receberam o mancozebe se distanciaram mais da comunidade controle (Figura S2 B).

Avaliando a β -diversidade das comunidades fúngicas sob a influência dos fungicidas, os resultados de PERMANOVA para microcosmos florestais foi estatisticamente suportado avaliando as amostragens em conjunto ($F_{2,24}=0,016$) e as comunidades fúngicas das amostragens 1 ($F_{2,6}=0,011$) e 3 ($F_{2,6}=0,004$) tiveram alterações significativas na estruturação após a aplicação dos fungicida (Figura 5 C), sendo as comunidades que receberam o carbendazim as mais distantes do tratamento controle nesses dois pontos de coleta (Figura S3 A). Para os microcosmos de solos agrícolas as diferenças na estruturação das comunidades não foram significativas considerando todas as amostragens ($F_{2,24}=0,20$), no entanto, diferenças estatisticamente suportadas foram encontradas nas amostragens 2 ($F_{2,6}=0,009$) e 3 ($F_{2,6}=0,018$) (Figura 5 D), sendo que as comunidades que receberam o mancozebe apresentaram maiores distâncias das comunidades controle na amostragem 2. Na última amostragem, a distância entre a comunidade controle e a comunidade sob efeito dos dois fungicidas foram similares (Figura S3 B).

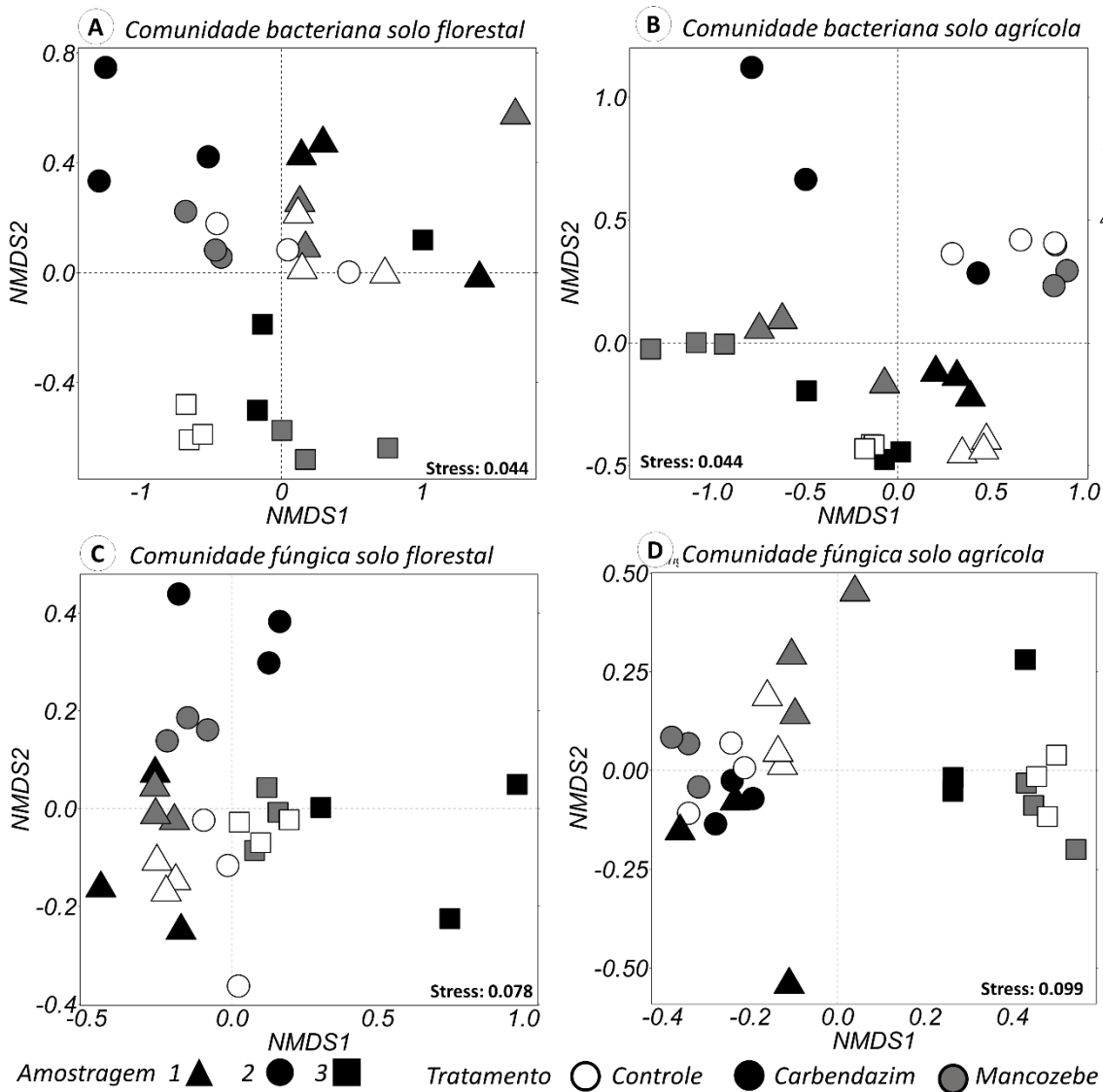


Figura 5. Estruturação das comunidades microbianas presentes nos microcosmos tratados com os fungicidas carbendazim e mancozebe separadamente. A) Comunidades bacterianas de microcosmos de solo florestal, B) Comunidades bacterianas de microcosmos de solo agrícola, C) Comunidades fúngicas de microcosmos de solo florestal e D) Comunidades fúngicas de microcosmos de solo agrícola.

2.3.5 Estruturação das comunidades presentes no solo agrícola e florestal tratadas com herbicidas

Para as comunidades microbianas que receberam a aplicação de herbicidas, as mesmas análises para estudo da β -diversidade foram realizadas seguindo os mesmos procedimentos para a visualização dos dados. As comunidades bacterianas de solos florestais não apresentaram estruturação diferencial significativa quando na avaliação das amostragens em conjunto ($F_{2,24}=0,077$), porém resultados significativos foram reportados na amostragem 1 ($F_{2,6}=0,011$) e 2 ($F_{2,6}=0,007$) (Figura 6 A), sendo que a

comunidade bacteriana que recebeu a aplicação do herbicida 2,4-D estavam mais distantes da comunidade controle (Figura S2 C). Nos microcosmos de solos agrícolas, as diferenças nas comunidades bacterianas que receberam os tratamentos foram significativas na análise total ($F_{2,6}=0,002$) e nas amostragens 1($F_{2,6}=0,006$) e 2($F_{2,6}=0,006$) analisadas separadamente (Figura 6 B), sendo que as comunidades bacterianas sob influência do 2,4-D mais distantes do controle na primeira amostragem e as comunidades que receberam a aplicação do glifosato se diferenciaram mais na segunda amostragem (Figura S2 D).

A análise de PERMANOVA para as comunidades fúngicas de microcosmos de solo florestal revelaram diferenças significativas ocasionada pelos tratamentos ao longo das três amostragens ($F_{2,24}=0,019$) analisadas conjuntamente e na amostragem 1($F_{2,6}=0,009$) (Figura 6 C), com as comunidades sob influência do glifosato mais distantes das comunidades controle e na amostragem 2 ($F_{2,6}=0,004$) (Figura 6 C) com as comunidades que receberam 2,4-D com maior diferenciação das comunidades fúngicas controle (Figura S3C). Nos microcosmos de solo agrícola, a análise da influência dos tratamentos considerando as três amostragens não foram estatisticamente suportadas ($F_{2,24}=0,139$), porém a análise dentro de cada amostragem as comunidades fúngicas sob influência da aplicação de herbicida se diferenciaram do controle na amostragem 1($F_{2,6}=0,014$) e 2($F_{2,6}=0,027$) (Figura 6 D).

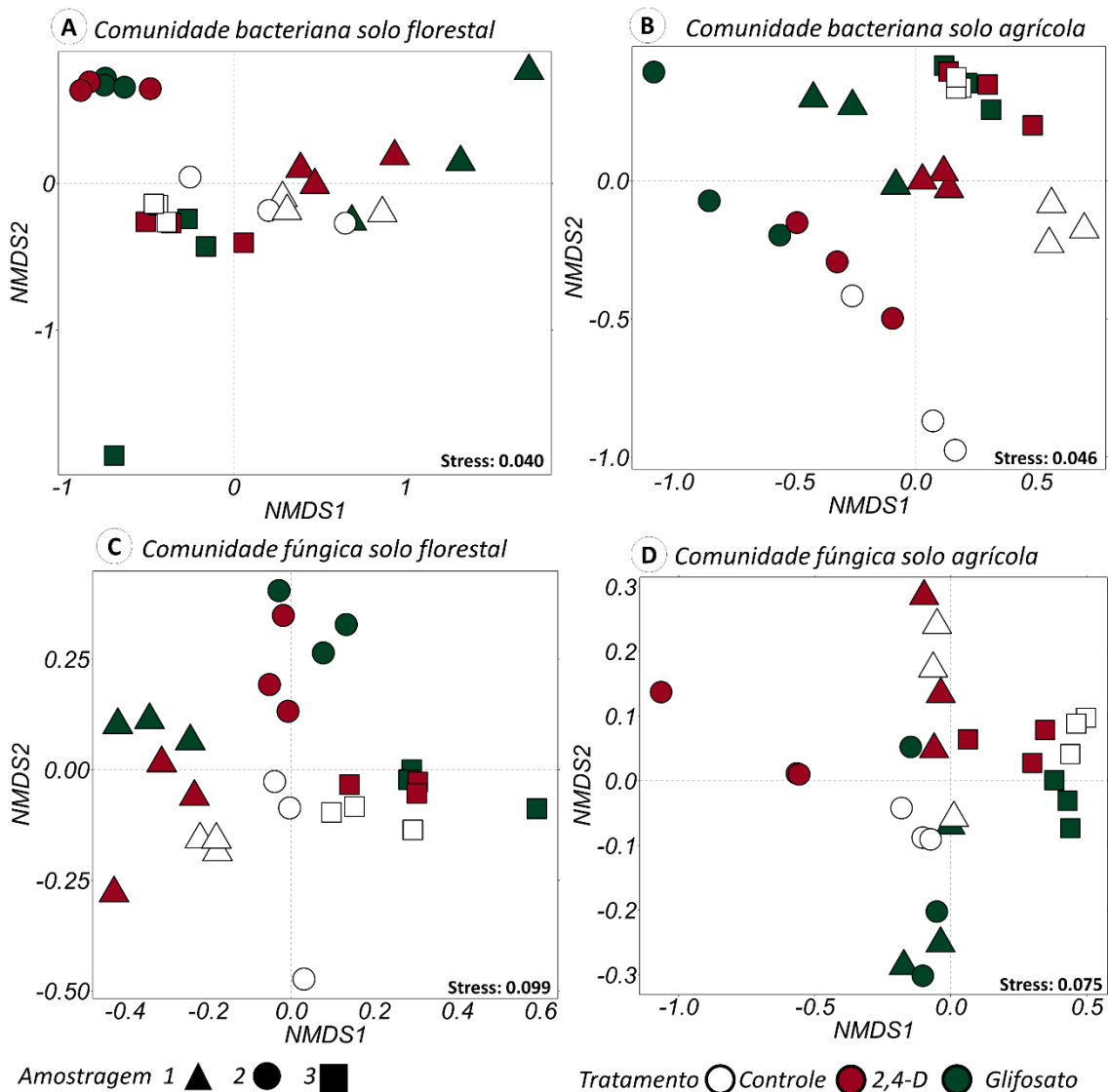


Figura 6. Estruturação das comunidades microbianas presentes nos microcosmos tratados com os herbicidas 2,4-D e glifosato separadamente. A) Comunidades bacterianas de microcosmos de solo florestal, B) Comunidades bacterianas de microcosmos de solo agrícola, C) Comunidades fúngicas de microcosmos de solo florestal e D) Comunidades fúngicas de microcosmos de solo agrícola.

2.3.6 Estruturação das comunidades presentes no solo agrícola e florestal tratadas com inseticidas

Para as comunidades bacterianas sob a influência dos 3 inseticidas testados, as comunidades presentes nos microcosmos de solo florestal não apresentaram diferenças significativas após a aplicação dos inseticidas na análise considerando o todas as amostragens ($F_{3,32}=0,262$), mas diferenças estatisticamente suportadas foram encontradas nas amostragens 1 ($F_{3,8}=0,028$) e 3 ($F_{3,8}= 0,004$) (Figura 7 A), sendo que as comunidades bacterianas que receberam o inseticida acefato apresentaram maior diferença das comunidades controles nessas duas amostragens (Figura S2 E). Para as

comunidades bacterianas dos microcosmos de solo agrícola, não foram encontradas diferenças significativas das comunidades que receberam a aplicação de inseticidas, tanto na análise considerando as amostragens em conjunto, quanto nas análises dentro de cada amostragem (Figura 7 B).

Nas análises de β -diversidade para as comunidades fúngicas de microcosmos de solo florestal, a aplicação de inseticidas ocasionou diferenças estatisticamente suportadas na análise considerando as 3 amostragens ($F_{3,32}=0,014$), e nas amostragens 1 ($F_{3,8}=0,001$) e 3 ($F_{3,8}=0,002$) analisadas separadamente (Figura 7 C), sendo que o inseticida acefato causou maiores diferenciações da comunidade fúngica comparados com o tratamento controle (Figura S3 E). Nos microcosmos de solos agrícolas não foi encontrada diferença significativa analisando as amostragens em conjunto, porém diferenças significativas foram encontradas na última amostragem ($F_{3,8}=0,032$) (Figura 7 D) também com os inseticidas cadusafos e acefato causando maior diferenciação da comunidade fúngica em relação à comunidade controle (Figura S3 F).

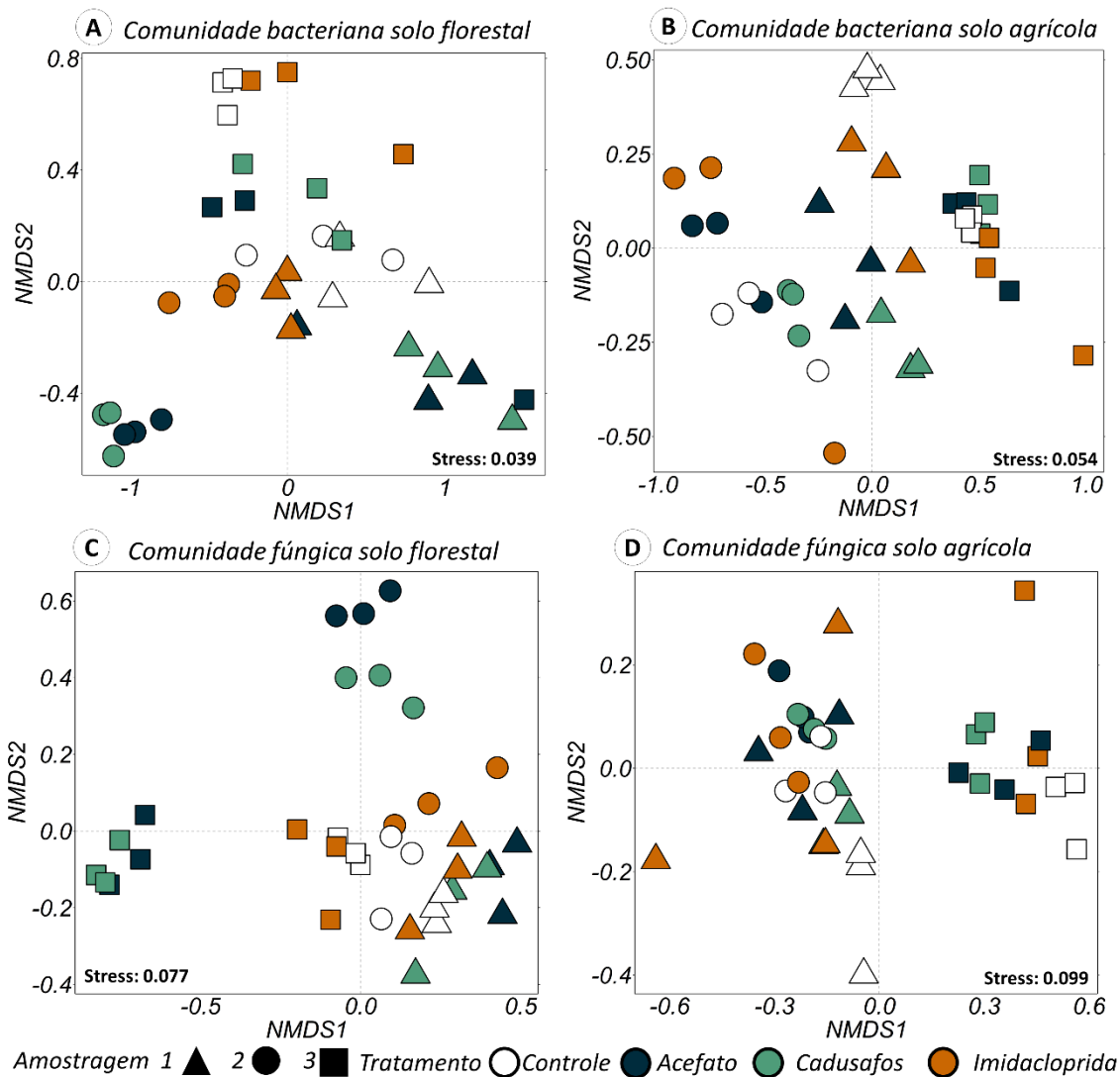


Figura 7. Estruturação das comunidades microbianas presentes nos microcosmos tratados com os inseticidas acefato, cadusafos e imidacloprida separadamente. A) Comunidades bacterianas de microcosmos de solo florestal, B) Comunidades bacterianas de microcosmos de solo agrícola, C) Comunidades fúngicas de microcosmos de solo florestal e D) Comunidades fúngicas de microcosmos de solo agrícola.

2.3.7 Compilação dos resultados significativos dos dados de diversidade β

As comunidades bacterianas de solo agrícola se mostraram mais suscetíveis à aplicação dos fungicidas comparados com as comunidades bacterianas do solo florestal. Comparando as comunidades bacterianas e fúngicas dentro de cada solo, pode ser observado que os fungos de solo florestal foram mais suscetíveis aos fungicidas que as bactérias do mesmo solo, enquanto as bactérias de solo agrícola se mostram mais suscetíveis que os fungos presentes nesse tipo de solo (Tabela 5).

Considerando o efeito dos herbicidas no perfil das comunidades microbianas, pode ser observado que bactérias de solo agrícola foram ligeiramente mais suscetíveis

que bactérias do solo florestal, enquanto os fungos de solo florestal foram mais suscetíveis que os fungos de solo agrícola. Verificando os efeitos para as comunidades microbianas dentro de cada tipo de solo, a comunidade fúngica foi mais suscetível no solo florestal que a comunidade bacteriana, enquanto no solo agrícola foi observado o oposto, a comunidade bacteriana se mostrando mais suscetível que a comunidade fúngica no solo agrícola (Tabela 5).

Analisando o efeito dos inseticidas no perfil das comunidades microbianas, tanto as comunidades bacterianas, quanto as comunidades fúngicas de solo florestal foram mais responsivas a aplicação dessas moléculas que as comunidades microbianas de solo agrícola. As comunidades fúngicas do solo florestal foram ligeiramente mais responsivas que as comunidades bacterianas, enquanto no solo agrícola o oposto foi observado, com as comunidades fúngicas sendo mais responsivas que as comunidades bacterianas (Tabela 5).

Em suma, as comunidades fúngicas de solo florestal foram mais suscetíveis a aplicação dos pesticidas das classes fungicida e herbicida, em contrapartida, as comunidades bacterianas de solo agrícola se mostram mais suscetíveis à aplicação dos pesticidas dessas duas classes. Também foi observado que os fungicidas e herbicidas causaram uma maior número de modificações nas comunidades microbianas que os inseticidas (Tabela 5).

Tabela 5. Compilação dos resultados significativos de diversidade β (PERMANOVA) das comunidades bacterianas e fúngicas dos microcosmos de solo agrícola e florestal para as três classes de pesticidas.

	Amostragem	Solo florestal		Solo agrícola	
		Bactérias	Fungos	Bactérias	Fungos
Fungicidas	Todas	ns	*	*	ns
	1	ns	*	*	ns
	2	ns	ns	**	**
	3	**	**	*	*
Herbicidas	Todas	ns	*	*	ns
	1	*	**	**	*
	2	**	**	**	*
	3	ns	ns	ns	ns
Inseticidas	Todas	ns	*	ns	ns
	1	*	**	ns	ns
	2	ns	ns	ns	ns
	3	**	**	ns	*

Legenda: ns: não significativo; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$

2.4 Discussão

Os dados obtidos indicaram alterações significativas da estruturação das comunidades microbianas, avaliadas pelos indicadores de β -diversidade, após a aplicação dos pesticidas para os dois tipos de solos testados, sendo que essa diferença pode ser observada desde a primeira amostragem. Resultados significativos também foram observados nos demais parâmetros analisados, como o potencial de atividade enzimática e a quantificação de genes de interesse. Estes dados trazem inovação pelo uso de dois solos para comparar os efeitos, complementando estudos anteriores realizados com as mesmas moléculas, mas abrangendo apenas um solo (Dennis et al., 2018; Feld et al., 2015; Wang et al., 2009).

As métricas de β -diversidade baseadas nas análises dos T-RFs demonstraram que as comunidades fúngicas do solo florestal foram mais suscetíveis a aplicação dos herbicidas e fungicidas que as bacterianas, em contrapartida, as comunidades bacterianas do solo agrícola foram mais suscetíveis que as fúngicas. Com as métricas avaliadas não foi possível demonstrar se as modificações nas comunidades bacterianas de solo agrícola ocorreram devido à inibição ou estímulo de táxons bacterianos, porém na amostragem 3 houve incremento no potencial de atividade da enzima β -glicosidase na aplicação do fungicida carbendazim que foi detectado nesse solo previamente. Solos submetidos a aplicação de um mesmo pesticida por diferentes ciclos de cultivo possuem uma comunidade degradadora mais ativa (Guijarro et al., 2018).

As alterações observadas nas comunidades fúngicas de solos florestais podem ser explicadas pela sensibilidade dessas comunidades aos pesticidas, principalmente por não terem sido expostas anteriormente a essas moléculas. Essa afirmação baseia-se na quantificação do gene ITS, em que foi observada uma tendência, embora não significativa, de redução na abundância desse gene para a maioria dos pesticidas nas amostragens 1, 2 e 3. Outro ponto a ser considerado é que a comunidade fúngica do solo agrícola pode ter passado por uma seleção após os ciclos de manejo agrícola, o que pode ter reduzido a abundância da comunidade fúngica desses solos evidenciados pelos valores inferiores do gene ITS comparado ao solo de floresta. Os dados de riqueza e diversidade na amostragem 1 e 3 mostram um aumento significativo nos valores dessas métricas para os pesticidas acefato, cadusafos e 2,4-D, sendo que o incremento nessas métricas são observados após distúrbios, como mudanças no uso do solo (Lammel et al., 2021; Rodrigues et al., 2013).

Considerando os dados de potencial enzimático, as enzimas mensuradas apresentaram mais alterações significativas em microcosmos de solo florestal após a aplicação dos pesticidas comparadas aos microcosmos de solo agrícola, sendo que o potencial enzimático é o indicador mais comumente empregado para avaliar os efeitos adversos dos pesticidas na comunidade microbiana do solo (Han et al., 2020; Mahapatra et al., 2017; Riah et al., 2014; Zhang et al., 2019). Dentre os resultados significativos obtidos no presente estudo, a maioria revela aumentos nas atividades enzimáticas das três enzimas mensuradas. Esse aumento no potencial enzimático após a aplicação de pesticidas no solo foi reportado em estudos anteriores, como, por exemplo, um trabalho de revisão que descreveu que 28% dos estudos reportaram aumento da fosfatase ácida, 6% verificaram acréscimo na atividade da β -glucosidase e 22% observaram um aumento nas atividades da arilsulfatase após aplicação de pesticidas (Riah et al., 2014). Trabalhos prévios especulam que essas modificações podem ser resultado da multiplicação de comunidades microbianas capazes de degradar os pesticidas aplicados. Uma segunda explicação seria a multiplicação de microrganismos oportunistas que utilizam a matéria orgânica da biomassa morta de microrganismos sensíveis à aplicação de agrotóxicos (Bart et al., 2019; Černohlávková et al., 2009).

Avaliando os resultados significativos de diversidade β , o carbendazim ocasionou um número maior de modificações na classe dos fungicidas, o acefato e cadusafos entre os inseticidas, enquanto as modificações ocasionadas pelos herbicidas foram similares, tanto na comunidade fúngica quanto bacteriana. Os efeitos do carbendazim vem sendo amplamente estudado e trabalhos mostram que mesmo em pequenas doses (cerca de 1 mg kg⁻¹) esse fungicida pode ocasionar modificações na microbiota e no resistoma do solo (Song et al., 2022), evidenciando o seu potencial de causar efeitos adversos tanto nas comunidades fúngicas como nas comunidades bacterianas edáficas.

O acefato além das alterações na estrutura da comunidade bacteriana e fúngica nos dois tipos de solos, também induziu alterações no potencial enzimático da arilsulfatase e fosfatase ácida e na razão do gene *phoD*. A segurança do uso desse inseticida não é um consenso, considerando que alguns países da União Européia e do Reino Unido não aprovam seu uso. Os resultados apresentados por esse estudo reforçam a importância de mensurar os efeitos desse inseticida na comunidade microbiana do solo, considerando que a aplicação do acefato no Brasil é muito comum e seus efeitos da

comunidade microbiana do solo é pouco explorada. O inseticida cadusafos também mostrou alterações significativas, e assim como o acefato não tem um consenso no uso, sendo que esses dois pesticidas são considerados altamente persistentes no ambiente (Masís-Mora et al., 2019). Considerando que o cadusafos é aplicado diretamente no solo, com histórico de causar alterações na comunidade microbiana do solo (Fouché et al., 2017) e alta persistência, os resultados apresentados no presente trabalho, enfatizam que os efeitos desse inseticida na comunidade microbiana do solo devem ser monitorados continuamente.

O presente estudo evidenciou que as comunidades bactérias e fúngicas são passíveis de sofrerem alterações em sua estrutura com a aplicação de diferentes classes pesticidas, resultados alinhados com estudo prévios (Chávez-Ortiz et al., 2022; Garg et al., 2021; Streletskii et al., 2022). Observando os dados após a segunda aplicação dos pesticidas, não ficou evidente se essa repetição na dose modificou a dinâmica da comunidade microbiana, pois as modificações observadas foram similares as amostragens 1 e 2, após a primeira aplicação desses compostos.

De forma geral, fica demonstrado nesse estudo que um mesmo pesticida pode ter efeitos distintos conforme o solo onde é aplicado, corroborando com a hipótese desse trabalho. Os resultados obtidos com esse estudo mostram que os principais pesticidas comercializados no Brasil têm o potencial de modificar a estrutura das comunidades bacterianas e fúngicas em solos com e sem histórico de manejo agrícola. Além das alterações significativas na estrutura do perfil das comunidades microbianas, foi possível observar efeitos na quantificação dos genes mensurados e no potencial enzimático dos solos testados nas três amostragens, enfatizando a importância de investigar continuamente os efeitos dos pesticidas na microbiota do solo utilizando diferentes metodologias. Embora essas alterações significativas tenham sido observadas, torna-se importante que trabalhos futuros utilizem metodologias que permitam a identificação dos grupos afetados e suas funções para mensurar se essas mudanças impactam em funções centrais desempenhadas pelos microrganismos no solo, bem como determinar os grupos que sofreram estímulo ou inibição após a aplicação dos pesticidas.

Referências

- Allegrini, M., Gomez, E. del V., Zabaloy, M.C., 2017. Repeated glyphosate exposure induces shifts in nitrifying communities and metabolism of phenylpropanoids. *Soil Biol. Biochem.* 105, 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.11.024>
- Allison, S.D., Martiny, J.B.H., 2008. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 11512–11519. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801925105>
- Avis, P.G., Dickie, I.A., Mueller, G.M., 2006. A “dirty” business: Testing the limitations of terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) analysis of soil fungi. *Mol. Ecol.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02842.x>
- Bart, S., Pelosi, C., Barraud, A., Péry, A.R.R., Cheviron, N., Grondin, V., Mougín, C., Crouzet, O., 2019. Earthworms Mitigate Pesticide Effects on Soil Microbial Activities. *Front. Microbiol.* 10, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01535>
- Černohlávková, J., Jarkovský, J., Hofman, J., 2009. Effects of fungicides mancozeb and dinocap on carbon and nitrogen mineralization in soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.07.001>
- Chai, L., Wong, M., Mohd-tahir, N., Christian, H., Hansen, B., 2010. Degradation and mineralization kinetics of acephate in humid tropic soils of Malaysia 79, 434–440. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.01.046>
- Chávez-Ortiz, P., Tapia-Torres, Y., Larsen, J., García-Oliva, F., 2022. Glyphosate-based herbicides alter soil carbon and phosphorus dynamics and microbial activity. *Appl. Soil Ecol.* 169. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104256>
- 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, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-171>
- Cycoń, M., Markowicz, A., Borymski, S., Wójcik, M., Piotrowska-Seget, Z., 2013. Imidacloprid induces changes in the structure, genetic diversity and catabolic activity of soil microbial communities. *J. Environ. Manage.* 131, 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.09.041>
- Dennis, P.G., Kukulies, T., Forstner, C., Orton, T.G., Pattison, A.B., 2018. The effects of glyphosate, glufosinate, paraquat and paraquat-diquat on soil microbial activity and bacterial, archaeal and nematode diversity. *Sci. Rep.* 8, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20589-6>
- Eivazi, F., Tabatabai, M.A., 1988. Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biol. Biochem.* 20, 601–606. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(88\)90141-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(88)90141-1)
- Fang, H., Han, L., Cui, Y., Xue, Y., Cai, L., Yu, Y., 2016. Changes in soil microbial community structure and function associated with degradation and resistance of carbendazim and chlortetracycline during repeated treatments. *Sci. Total Environ.* 572, 1203–1212. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.038>

- Fang, H., Lian, J., Wang, H., Cai, L., Yu, Y., 2015. Exploring bacterial community structure and function associated with atrazine biodegradation in repeatedly treated soils. *J. Hazard. Mater.* 286, 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.01.006>
- Feld, L., Hjelmsø, M.H., Nielsen, M.S., Jacobsen, A.D., Rønn, R., Ekelund, F., Krogh, P.H., Strobel, B.W., Jacobsen, C.S., 2015. Pesticide side effects in an agricultural soil ecosystem as measured by *amoA* expression quantification and bacterial diversity changes. *PLoS One* 10, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126080>
- Ferreira, E.B., Cavalcanti, P.P., Nogueira, D.A., 2014. ExpDes: An R Package for ANOVA and Experimental Designs. *Appl. Math.* 05, 2952–2958. <https://doi.org/10.4236/am.2014.519280>
- Fouché, T.C., Claassens, S., Maboeta, M.S., 2017. Ecotoxicological Assessment of Chemical Fumigants Utilising an Earthworm (*Eisenia andrei*) Bioassay and Soil Microbial Communities. <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3339-z>
- Garg, N., Bhattacharjee, A.K., Shukla, P.K., Singh, B., 2021. Influence of imidacloprid on bacterial community diversity of mango orchard soil assessed through 16S rRNA sequencing-based metagenomic analysis. *Environ. Monit. Assess.* 193, 102. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-08885-7>
- Griffiths, B.S., Philippot, L., 2013. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 112–129. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00343.x>
- Han, L., Ge, Q., Mei, J., Cui, Y., Xue, Y., Yu, Y., Fang, H., 2019. Adsorption and Desorption of Carbendazim and Thiamethoxam in Five Different Agricultural Soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 102, 550–554. <https://doi.org/10.1007/s00128-019-02568-3>
- Han, L., Kong, X., Xu, M., Nie, J., 2021. Repeated exposure to fungicide tebuconazole alters the degradation characteristics, soil microbial community and functional profiles. *Environ. Pollut.* 287, 117660. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117660>
- Han, L., Liu, Y., Fang, K., Zhang, X., Liu, T., Wang, F., Wang, X., 2020. Dissipation of chlorothalonil in the presence of chlortetracycline and ciprofloxacin and their combined effects on soil enzyme activity. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07753-0>
- Heuer H., M., K., P., B., Smalla K., A., E., W., 1997. Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. *Asm* 63, 3233–3241.
- IBAMA, 2022. Painel de Informações sobre a Comercialização de Agrotóxicos e Afins no Brasil – série histórica 2009 - 2020 [WWW Document]. Painéis de informações de agrotóxicos. URL <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos#Painel-comercializacao>
- Kindt, R., 2022. BiodiversityR: Package for Community Ecology and Suitability Analysis. R Packag. ed Version 2.14-1.
- Kookana, R.S., Ali, A., Smith, L., Arshad, M., 2014. Contrasting effects of two antimicrobial agents (triclosan and triclocarban) on biomineralisation of an organophosphate pesticide in soils. *Chemosphere* 107, 360–365. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.12.090>

- Kortekamp, A., 2011. *Herbicides and Environment*. INTECH, Rijeka.
- Kumar, A., Trefault, N., Olaniran, A.O., 2014. Microbial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: Insight into the enzymes and catabolic genes involved, their regulation and biotechnological implications. *Crit. Rev. Microbiol.* 7828, 1–15. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.917068>
- Lammel, D.R., Nüsslein, K., Cerri, C.E.P., Veresoglou, S.D., Rillig, M.C., 2021. Soil biota shift with land use change from pristine rainforest and Savannah (Cerrado) to agriculture in southern Amazonia. *Mol. Ecol.* 30, 4899–4912. <https://doi.org/10.1111/mec.16090>
- Lin, Z., Pang, S., Zhou, Z., Wu, X., Li, J., Huang, Y., Zhang, W., Lei, Q., Bhatt, P., Mishra, S., Chen, S., 2022. Novel pathway of acephate degradation by the microbial consortium ZQ01 and its potential for environmental bioremediation. *J. Hazard. Mater.* 426, 127841. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127841>
- Liu, Y., Li, Y., Hua, X., Müller, K., Wang, H., Yang, T., Wang, Q., Peng, X., Wang, M., Pang, Y., Qi, J., Yang, Y., 2018. Glyphosate application increased catabolic activity of gram-negative bacteria but impaired soil fungal community. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 14762–14772. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1676-0>
- Mahapatra, B., Adak, T., Patil, N.K.B., Pandi G, G.P., Gowda, G.B., Jambhulkar, N.N., Yadav, M.K., Panneerselvam, P., Kumar, U., Munda, S., Jena, M., 2017. Imidacloprid application changes microbial dynamics and enzymes in rice soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 144, 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.013>
- Masis-Mora, M., Lizano-Fallas, V., Tortella, G., Beita-Sandí, W., Rodríguez-Rodríguez, C.E., 2019. Removal of triazines, triazoles and organophosphates in biomixtures and application of a biopurification system for the treatment of laboratory wastewaters. *Chemosphere* 233, 733–743. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.001>
- Mckinney, C.W., Dungan, R.S., Moore, A., Leytem, A.B., 2018. Occurrence and abundance of antibiotic resistance genes in agricultural soil receiving dairy manure. *FEMS Microbiol. Ecol.* <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy010/4817531>
- Moretto, A.S., Altarugio, L.M., Andreote, F.D., Andrade, A., Ana, L., 2018. Changes in bacterial community after application of 1–6. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx113>
- Neal, A.L., Hughes, D., Clark, I.M., Jansson, J.K., Hirsch, P.R., 2021. Microbiome Aggregated Traits and Assembly Are More Sensitive to Soil Management than Diversity. *mSystems* 6. <https://doi.org/10.1128/msystems.01056-20>
- Oksanen, A.J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., Minchin, P.R., Hara, R.B.O., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., 2020. *Vegan: Community Ecology Package* Version, in: *R Package ed Version 2.0-4*. Springer Netherlands, Dordrecht, p. 2395–2396. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1179-9_301576
- Riah, W., Laval, K., Laroche-Ajzenberg, E., Mougin, C., Latour, X., Trinsoutrot-Gattin, I., 2014. Effects of pesticides on soil enzymes: a review. *Environ. Chem. Lett.* 12, 257–273. <https://doi.org/10.1007/s10311-014-0458-2>

- Rodrigues, J.L.M., Pellizari, V.H., Mueller, R., Baek, K., Jesus, E.D.C., Paula, F.S., Mirza, B., Hamaoui, G.S., Tsai, S.M., Feigl, B., Tiedje, J.M., Bohannan, B.J.M., Nüsslein, K., 2013. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 988–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220608110>
- Sakurai, M., Wasaki, J., Tomizawa, Y., Shinano, T., Osaki, M., 2008. Analysis of bacterial communities on alkaline phosphatase genes in soil supplied with organic matter. *Soil Sci. Plant Nutr.* 54, 62–71. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00210.x>
- Shade, A., Peter, H., Allison, S.D., Baho, D.L., Berga, M., Bürgmann, H., Huber, D.H., Langenheder, S., Lennon, J.T., Martiny, J.B.H., Matulich, K.L., Schmidt, T.M., Handelsman, J., 2012. Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Front. Microbiol.* 3, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00417>
- Shao, H., Zhang, Y., 2017. Non-target effects on soil microbial parameters of the synthetic pesticide carbendazim with the biopesticides cantharidin and norcantharidin. *Sci. Rep.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05923-8>
- Singh, S., Kumar, V., Singla, S., Sharma, M., Singh, D.P., Prasad, R., Thakur, V.K., Singh, J., 2020. Kinetic study of the biodegradation of acephate by indigenous soil bacterial isolates in the presence of humic acid and metal ions. *Biomolecules* 10, 1–11. <https://doi.org/10.3390/biom10030433>
- Song, J., Li, T., Zheng, Z., Fu, W., Long, Z., Shi, N., Han, Y., Zhang, L., 2022. Carbendazim shapes microbiome and enhances resistome in the earthworm gut. *Microbiome* 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01261-8>
- Stephenson, G.R., Ferris, I.G., Holland, P.T., Nordberg, M., 2006. Glossary of terms relating to pesticides (IUPAC Recommendations 2006). *Pure Appl. Chem.* 78, 2075–2154. <https://doi.org/10.1351/pac200678112075>
- Streletskii, R., Astaykina, A., Krasnov, G., Gorbato, V., 2022. Changes in Bacterial and Fungal Community of Soil under Treatment of Pesticides. *Agronomy* 12, 1–23. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010124>
- Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1970. Arylsulfatase Activity of Soils¹. *Soil Sci. Soc. Am. J.* <https://doi.org/10.2136/sssaj1970.03615995003400020016x>
- Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1, 301–307. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(69\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(69)90012-1)
- Walia, A., Mehta, P., Guleria, S., Chauhan, A., Shirkot, C.K., 2014. Impact of Fungicide Mancozeb at Different Application Rates on Soil Microbial Populations, Soil Biological Processes, and Enzyme Activities in Soil. *Sci. World J.* 2014, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/702909>
- Wang, C.N., Wu, R.L., Li, Y.Y., Qin, Y.F., Li, Y.L., Meng, F.Q., Wang, L.G., Xu, F.L., 2020. Effects of pesticide residues on bacterial community diversity and structure in typical greenhouse soils with increasing cultivation years in Northern China. *Sci. Total Environ.* 710, 136321. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136321>

- Wang, Y.S., Huang, Y.J., Chen, W.C., Yen, J.H., 2009. Effect of carbendazim and pencycuron on soil bacterial community. *J. Hazard. Mater.* 172, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.142>
- Wickham H, 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*, Springer-Verlag New York.
- Yan, H., Wang, D., Dong, B., Tang, F., Wang, B., Fang, H., Yu, Y., 2011. Dissipation of carbendazim and chloramphenicol alone and in combination and their effects on soil fungal:Bacterial ratios and soil enzyme activities. *Chemosphere* 84, 634–641. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.038>
- Zhang, C., Zhou, T., Zhu, L., Du, Z., Li, B., Wang, Jun, Wang, Jinhua, Sun, Y., 2019. Science of the Total Environment Using enzyme activities and soil microbial diversity to understand the effects of fluoxastrobin on microorganisms in fl uvo-aquic soil. *Sci. Total Environ.* 666, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.240>
- Zhang, H., Chen, S., Zhang, Q., Long, Z., Yu, Y., Fang, H., 2020. Fungicides enhanced the abundance of antibiotic resistance genes in greenhouse soil. *Environ. Pollut.* 259, 113877. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113877>
- Zhang, M., Xu, Z., Teng, Y., Christie, P., Wang, J., Ren, W., Luo, Y., Li, Z., 2016. Non-target effects of repeated chlorothalonil application on soil nitrogen cycling: The key functional gene study. *Sci. Total Environ.* 543, 636–643. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.053>

Material suplementar capítulo 2

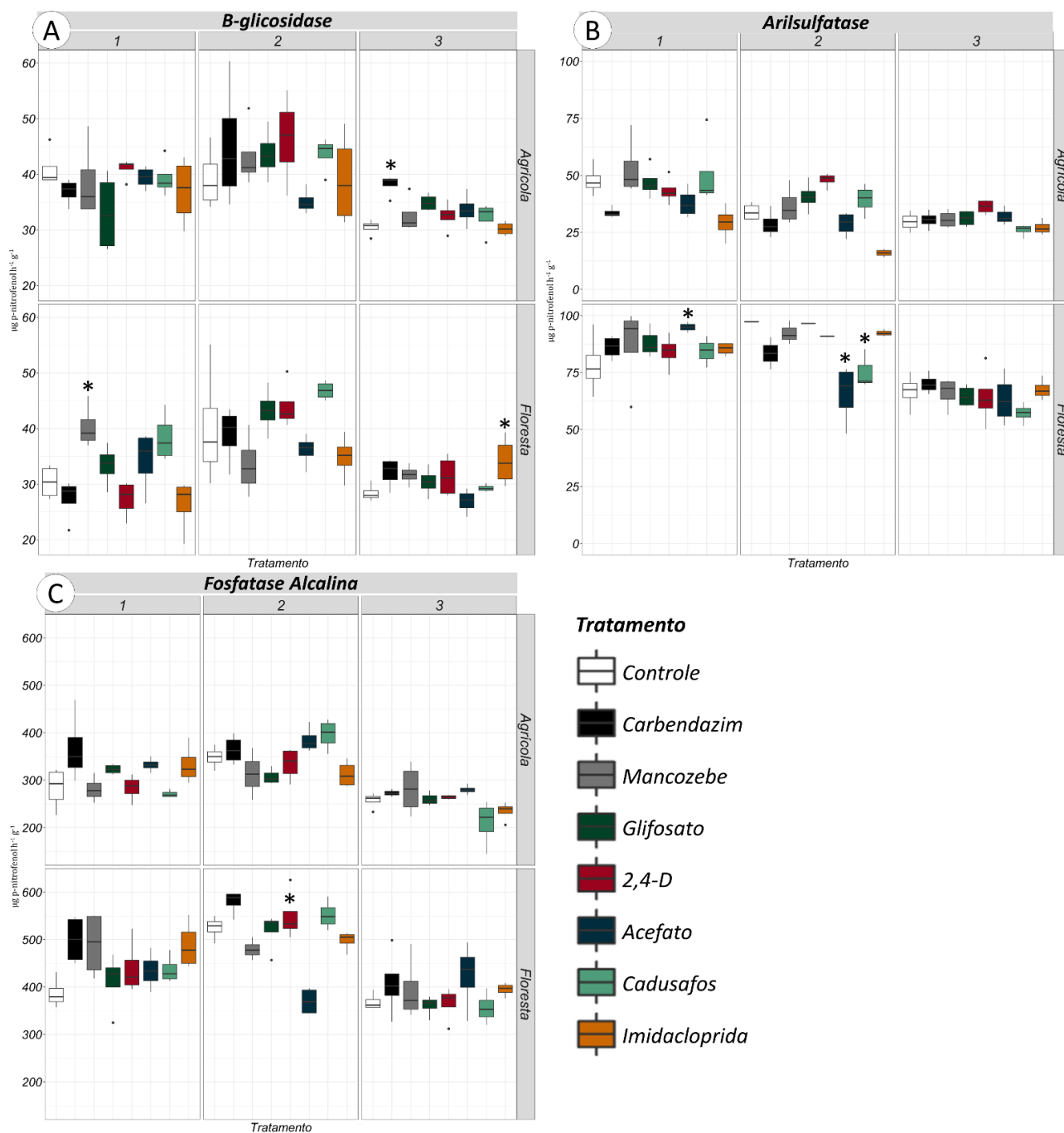


Figura S1. Potencial enzimático das enzimas A) β -glicosidase; B) Arilsulfatase e C) Fosfatase ácida. Os valores indicam distribuição dos dados de 3 repetições, e os tratamentos indicados com * que a diferença foi significativa seguindo o teste de Tukey com um $p < 0,05$ comparado ao tratamento controle.

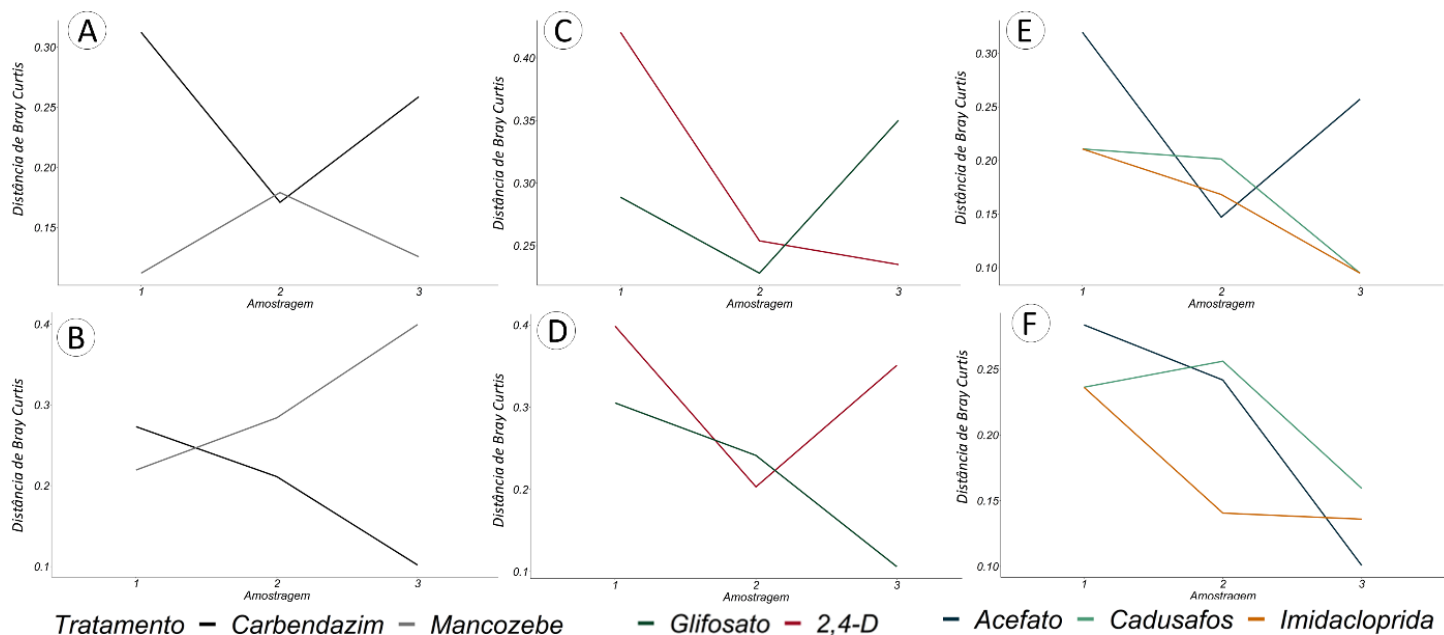


Figura S2. Comparação da distância dos centroides calculados com base nas dissimilaridades de Bray-Curtis entre as comunidades bacterianas tratadas com pesticidas e as comunidades controle. A) Microcosmos de solo florestal tratados com fungicidas, B) Microcosmos de solo agrícola tratados com fungicidas, C) Microcosmos de solo florestal tratados com herbicidas, D) Microcosmos de solo agrícolas tratados com herbicidas, E) Microcosmos de solo florestal tratados com inseticidas e F) Microcosmos de solo agrícolas tratados com inseticidas.

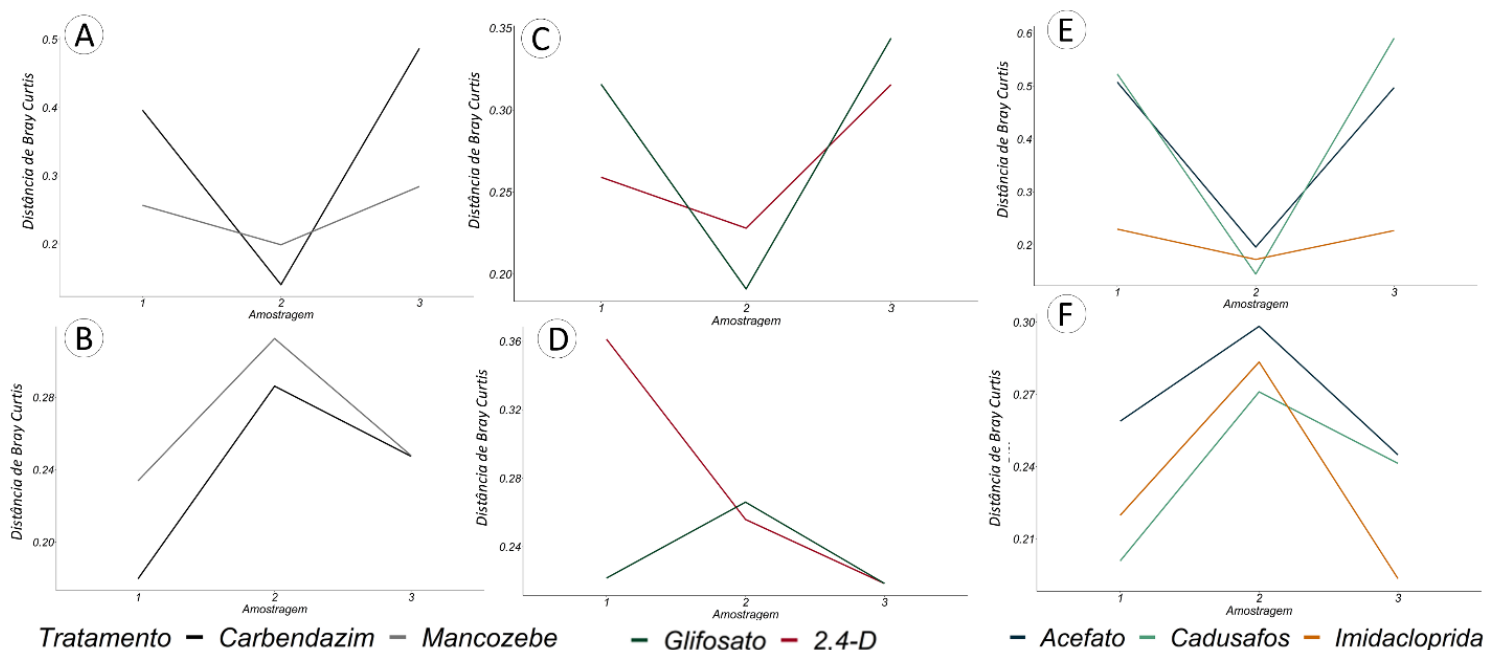


Figura S3. Comparação da distância dos centroides calculados com base nas dissimilaridades de Bray-Curtis entre as comunidades fúngicas tratadas com pesticidas e as comunidades controle. A) Microcosmos de solo florestal tratados com fungicidas, B) Microcosmos de solo agrícola tratados com fungicidas, C) Microcosmos de solo florestal tratados com herbicidas, D) Microcosmos de solo agrícolas tratados com herbicidas, E) Microcosmos de solo florestal tratados com inseticidas e F) Microcosmos de solo agrícolas tratados com inseticidas.

3 A INFLUÊNCIA DA MANIPULAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO NA RESPOSTA DA COMUNIDADE FÚNGICA APÓS A APLICAÇÃO DE FUNGICIDAS

Resumo

Os fungicidas carbendazim e mancozebe são utilizados para prevenir e controlar fungos patogênicos em cultivos agrícolas. No entanto, a ação desses compostos não é espécie-específica com o potencial de prejudicar microrganismos não patogênicos. O efeito potencial desses compostos pode variar de intensidade em solos com diferentes origens, bem como em comunidades microbianas com diferentes níveis de diversidade, considerando que a diversidade é responsável por garantir a redundância funcional das comunidades microbianas. Nesse cenário, o principal objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos potenciais do uso dos fungicidas carbendazim e mancozebe em comunidades fúngicas em solos com diferentes níveis de diversidade microbiana ao longo de 3 amostragens. Para isso, microcosmos de solos estéreis foram inoculados com um gradiente de diversidade utilizando a abordagem de “diluição para a extinção”. O potencial enzimático foi avaliado, assim como a quantificação do gene ITS e a estrutura e composição da comunidade fúngica. A enzima β -glicosidase se mostrou mais sensível às alterações nos microcosmos menos diversos, ao passo que não foi verificada diferenças significativas nas quantificações dos genes. Alterações na estrutura e composição das comunidades fúngicas foram observadas, no entanto, não ficou evidente o efeito da diversidade microbiana na resposta das comunidades fúngicas. Foi possível identificar táxons que tiveram a abundância alterada com a aplicação dos fungicidas, evidenciando o potencial de alteração desses compostos e a importância de se aplicar doses seguindo a recomendação do fabricante.

Palavras-chave: Fungicidas, Potencial enzimático, Diluição para extinção, Comunidade fúngica e Sequenciamento ITS

Abstract

Carbendazim and mancozeb fungicides are used to prevent and control pathogenic fungi in agricultural crops. However, these compounds are not species specific, with the potential to harm non-pathogenic microorganisms. The potential effect of these compounds can vary in intensity in soils with different origins, as well as in microbial communities with different diversity levels since this last component maintains the functional redundancy of microbial communities. Considering this scenario, this work aimed to evaluate the potential effects of carbendazim and mancozeb fungicides on fungal communities in soils with different levels of microbial diversity over 3 samplings. For this, microcosms of sterile soils were inoculated with a diversity gradient using the dilution-to-extinction approach. The enzymatic potential was evaluated, as well as the quantification of interest genes and the structure and composition of the fungal community. The β -glucosidase enzyme was more responsive to changes in less diverse

microcosms, while no significant differences were found in gene quantification. Changes in the structure and composition of fungal communities were observed, however the effect of microbial diversity on the response of fungal communities was not clear. It was possible to identify taxa that had their abundance altered with the fungicides application, evidencing the potential of these compounds in altering fungal communities and the importance of applying doses within the fabricant recommendation.

Keywords: Fungicides, Enzymatic potential, Dilution to extinction, Fungal community, and ITS Sequencing

3.1 Introdução

Os fungicidas são utilizados em cultivos agrícolas para prevenir ou eliminar a presença de fungos e esporos de espécies patogênicas para as plantas. São aplicados diretamente as folhas, no solo ou no tratamento de sementes antes do plantio, sendo que ao menos uma fração desses compostos chegam ao solo, o que tem motivado diversos estudos a investigarem os efeitos desses compostos na comunidade microbiana edáfica (Han et al., 2020; Kumar et al., 2017; Shao e Zhang, 2017). Isto se faz necessário considerando que a ação dos fungicidas não é espécie-específica (Ayesha et al., 2021) e pode atingir outras espécies fúngicas além das cepas patogênicas para o qual o fungicida foi desenvolvido. No Brasil, os fungicidas mancozebe e o carbendazim são amplamente utilizados, classificados como 4º e o 13º componentes ativos mais comercializados no país, respectivamente, em uma série histórica de 2009 a 2020 (IBAMA, 2022).

O mancozebe (polímero de etileno [bis] ditiocarbamato de manganês complexo com sal de zinco) pertence à subclasse dos pesticidas carbamatos (Yang et al., 2019) com aplicação preferencialmente foliar. Estudos prévios que avaliaram os possíveis efeitos desse fungicida nas comunidades microbianas do solo relataram modificações no potencial enzimático do solo, incluindo efeitos inibitórios nas enzimas urease (Rasool e Reshi, 2010), amilase, invertase e fosfatase (Walia et al., 2014). Também foi reportado que o mancozebe pode prejudicar processos como a nitrificação e a amonificação (Černohlávková et al., 2009; Walia et al., 2014), bem como pode provocar a inibição transitória de transcritos do gene *amoA*, gene atuante na oxidação da amônia (Feld et al., 2015). Já outro trabalho em que se avaliou os efeitos dos resíduos de mancozebe no solo, mais especificamente na comunidade rizosférica de citros, não demonstrou efeitos adversos com a aplicação repetida desse fungicida (Huang et al., 2021).

O carbendazim (metil benzimidazol-2-yl carbamato) é um fungicida sistêmico do grupo químico benzimidazol (Han et al., 2019), utilizado no tratamento de sementes e na aplicação foliar. Estudos da influência do carbendazim sobre a atividade de enzimas do solo identificou uma redução na atividade da invertase e da fosfatase alcalina, e efeito neutro ou transitório sobre a urease e fosfatase neutra (Shao e Zhang, 2017; Yan et al., 2011). A análise das taxas de respiração da comunidade fúngica do solo apresentaram decréscimo após a aplicação desse fungicida (Yan et al., 2011). Também foram encontrados relatos de modificações a estrutura da comunidade bacteriana após a aplicação do carbendazim (Wang et al., 2020). O carbendazim também vem sendo associado ao aumento da abundância de genes de resistência a antibióticos em solos (Zhang et al., 2020) e em microbioma intestinal de minhocas (Song et al., 2022), indicando o seu potencial de alterar o resistoma de solos.

Os efeitos potenciais dos biocidas, incluindo os fungicidas, sobre os microrganismos no solo dependem de condições iniciais que essa comunidade se encontra, que são determinadas, pelas práticas de manejo adotados em solos agrícolas (Bending et al., 2007; Sułowicz et al., 2016), pelo histórico de aplicação de pesticidas ou pela própria origem e composição química desses solos (Zhang et al., 2016). Com objetivo de isolar o efeito da estrutura da comunidade microbiana na resposta da comunidade fúngica após a aplicação de fungicidas, no presente estudo, a estrutura da comunidade microbiana foi manipulada em condições de laboratório. Para isso foi aplicado o método de diluição para extinção (van Elsas et al., 2012), que permite a formação de um gradiente de diversidade microbiana do solo a partir de seu estado natural, sendo possível dessa forma estudar o potencial impacto de fungicidas em comunidades com diferentes estruturas microbianas. Por exemplo, a redução da diversidade de uma comunidade afeta de forma menos intensa as funções centrais, como mineralização de compostos simples de carbono (Jacobsen e Hjelmsø, 2014; Wertz et al., 2006), mas limitam a degradação efetiva de pesticidas agrícolas (de Souza et al., 2021; De Souza et al., 2017). Esta variação no efeito da perda de diversidade se dá por consequência da redundância funcional envolvida na execução dos processos centrais como a degradação da matéria orgânica e a baixa redundância funcional na degradação de pesticidas.

Considerando o contexto apresentado, o principal objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos potenciais do uso dos fungicidas carbendazim e mancozebe em comunidades fúngicas em solos com diferentes níveis de diversidade microbiana ao longo de 3 amostragens. As hipóteses principais são que ambos fungicidas devido ao seu modo de ação, que tem como alvo fungos, modificariam significativamente a composição da comunidade fúngica dos microcosmos e o potencial de atividade enzimática; e que esses efeitos seriam mais proeminentes nos microcosmos menos diversos devido à possível redução funcional desses processos nos solos avaliados.

3.2 Metodologia

3.2.1 Coleta de solo e montagem do ensaio de microcosmos

As amostras de solo foram coletadas nos primeiros 10 cm de solo em uma área florestal localizado na Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz (22° 42' 56,7"S 47° 36' 49,7"W). As características físicas e químicas do solo coletado estão apresentadas na tabela S1. Os microcosmos foram preparados utilizando a abordagem de “diluição para a extinção”. O solo coletado foi peneirado (malha de 2 mm) e dividido em duas partes: uma parte foi submetida à esterilização, solo recipiente, e a outra parte foi submetida a diluição seriada que foi posteriormente utilizado como inóculo microbiano. O solo recipiente foi esterilizado por radiação gama (35 kGy) utilizando o Irradiador Multipropósito de Cobalto-60 do CETER/IPEN (Centro de tecnologia de radiações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares). Para validar a esterilidade do solo antes da montagem dos microcosmos, o solo irradiado foi usado para preparo de uma suspensão, a qual foi submetida ao cultivo em meios sólidos TSB (caldo triptona de soja) com antifúngico para a seleção de bactérias e meio BDA (Agar Batata Dextrose) com antibiótico para a seleção de fungos. As placas foram incubadas a 28 °C por sete dias. Após a verificado da supressão do crescimento de fungos e bactérias (figura S1), 25 g deste solo foram colocados em potes de vidro com capacidade de 100 mL. O solo sem esterilização foi primeiramente diluído em água estéril na proporção de 1:10 e misturado em vórtex na velocidade máxima por 10 minutos. Essa suspensão foi submetida a diluição seriada até o fator 10^{-6} , e as soluções obtidas de 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-6} foram escolhidas como inóculo para serem aplicadas ao solo recipiente. A escolha dessas diluições foi baseada em estudos anteriores que validaram essas diluições como um

gradiente adequado de biodiversidade para estudos que avaliam os efeitos da perda de diversidade (De Souza et al., 2017; Ferreira et al., 2020). Após a aplicação das diluições, os microcosmos foram incubados a 28 °C por 30 dias antes da aplicação dos tratamentos (Figura 1).

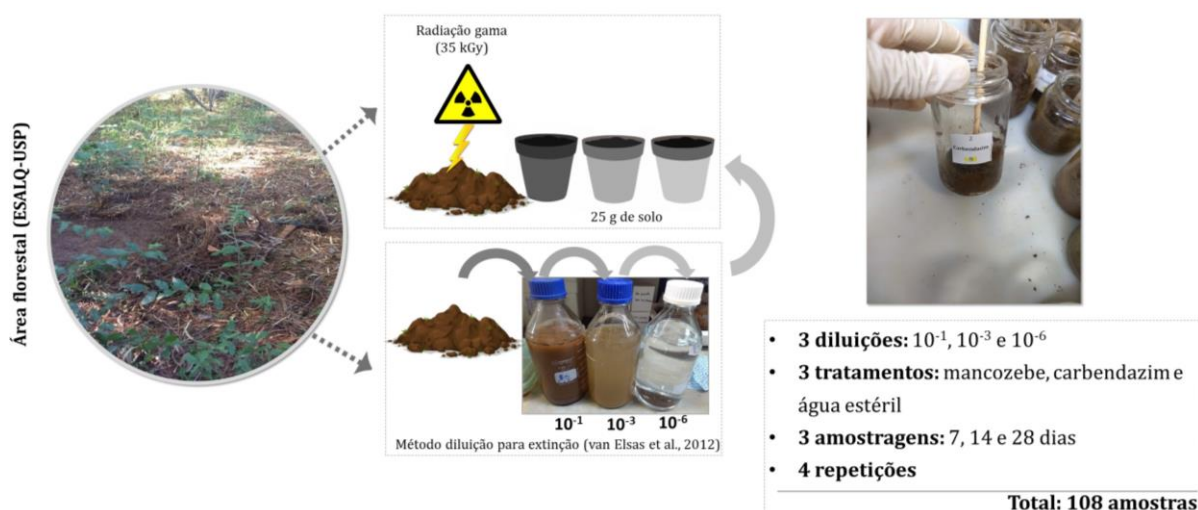


Figura 1. Imagens da área de coleta de solo, experimento e delineamento experimental empregados no estudo

3.2.2 Aplicação dos fungicidas e amostragem dos microcosmos

Foram utilizados fungicidas na formulação comercial: mancozebe (Dithane® NT, Dow AgroSciences), e carbendazim (Carbedazim Nortox®, Nortox). A escolha em utilizar formulações comerciais foi realizada em razão dos adjuvantes e surfactantes presentes nessas formulações, serem passíveis de afetar os microrganismos do solo. Dithane® NT é um pó molhável com 80% do composto ativo mancozebe (complexo de manganês etilenobis (ditiocarbamato) (polimérico) com sal de zinco) utilizado no controle de ácaros e fungos. O princípio ativo, mancozebe, é um fungicida carbamato, de amplo espectro, não sistêmico e com ação protetora. Este composto atua interrompendo o metabolismo lipídico e apresenta atividade multissítio. O Carbendazim Nortox® é uma solução líquida com 50% de carbendazim (metil benzimidazol-2-ilcarbamato) como composto ativo. O carbendazim é um fungicida sistêmico com atividade protetora que atua inibindo a mitose e a divisão celular. Esses fungicidas comerciais foram aplicados seguindo a dose recomendada para Carbendazim Nortox® (0,000769 µl/g de solo seco) e Dithane® NT (3,85 µg/g de solo seco), assumindo uma densidade de solo de 1,0 g cm⁻¹

e distribuição de pesticidas de campo nos primeiros 10 cm do solo. Aplicaram-se os fungicidas dissolvidos em 1 mL de água deionizada estéril e para os tratamentos controle foi aplicada a mesma quantidade de água deionizada previamente esterilizada. Os microcosmos foram cobertos com filme perfurado para permitir a troca gasosa e incubados a 28 °C no escuro até a coleta aos 7,14 e 28 dias de incubação. Um total de 108 microcosmos foram preparados: 3 diluições (10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-6}) x 4 repetições x 3 tratamentos (mancozebe, carbendazim e água estéril) x 3 períodos de amostragem (7, 14, e 28 dias). O experimento teve delineamento aleatorizado e em cada tempo de amostragem, 4 microcosmos foram amostrados destrutivamente. Uma subamostra de 1 g de solo foi armazenada a -80 °C para posterior extração de DNA e o solo restante foi mantido a 4 °C até os ensaios enzimáticos. O teor de umidade dos microcosmos foi ajustado para 60% da capacidade de retenção de água do solo, no início e ao longo do experimento, para isso os potes foram pesados uma vez por semana para calcular a perda de água por evaporação e quando necessário, adicionava-se água estéril para corrigir a umidade perdida para a atmosfera.

3.2.3 Determinação do potencial enzimático

O potencial enzimático das enzimas arilsulfatase e β -glicosidase foram mensuradas utilizando o método de Tabatai (1994). Um grama de solo foi adicionado em tubos de vidro estéreis com solução tampão de Sal de potássio de 4-nitrofenilsulfatopara mensurar a atividade potencial de arilsulfatase e solução de β -D-glicopiranosídeo para acessar a produção potencial de β -glicosidase. Os tubos foram agitados em vórtex em velocidade máxima e incubados por 1 h a 37 °C. O p-nitrofenol e o β -D-glicopiranosídeo liberados foram extraídos, corados com NaOH e a coloração do produto resultante foi mensurada em espectrofotômetro a 410 nm de absorbância. O p-nitrofenol e p-Nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo consumidos durante o ensaio foram determinados comparando os valores de absorbância obtidos durante o ensaio com uma curva padrão com concentrações de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 μg de p-nitrofenol mL^{-1} . A atividade potencial dessas enzimas foi expressa em μg p-nitrofenol $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de solo seco.

3.2.4 Extração de DNA, qPCR e sequenciamento

As extrações de DNA total de amostras de microcosmos foram realizadas com o kit DNeasy® PowerSoil® (Qiagen, Hilden, Alemanha) e o DNA extraído foi armazenado a -20 °C. O método quantitativo de cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) foi utilizado para quantificar a abundância absoluta de fungos através da quantificação da região ITS (espaçador intergênico) usando o conjunto de primers ITS1F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Heuer H. et al., 1997). Cada reação teve um volume final de 20 µl e continha 10 µl de SYBR® green PCR Master Mix (2x Applied Biosystems®), 0,5 µl de BSA (Albumina sérica bovina - 10 mg mL⁻¹), 1 µl de cada primer (100 pmol/µl) e 1 µl de amostra de DNA (20 ng). As reações foram realizadas com o StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems®). Reações duplicadas foram realizadas para cada amostra de DNA e controles negativos (livres de DNA) foram incluídos em cada corrida. A análise da curva de “melting” após cada reação confirmou a especificidade dos produtos. As curvas padrão foram geradas usando diluições seriadas de dez vezes do vetor pGEM-T Easy (Promega®) contendo um fragmento amplificado por PCR do gene ITS. A eficiência da reação (E) foi determinada com a equação: $E = [10^{(-1/\text{slope})} - 1]$, e as cópias do gene (g solo⁻¹) foram expressas em Log₁₀.

Alíquotas do DNA extraído foram utilizadas também para sequenciamento da região intergênica do DNA ribossomal (ITS) utilizando os pares de primers ITS1f (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') (Gardes e Bruns, 1993) na plataforma de sequenciamento Ion Torrent (Walters et al., 2016).

3.2.5 Análise de dados

A análise dos dados das sequências foi realizada usando a pipeline DADA 2, versão 1.16 (Callahan et al., 2017) no ambiente R versão 4.1.2. A função *filterAndTrim* do pacote Dada2 foi usado para filtrar e “trimar” os *reads* usando os parâmetros: maxEE=c(2,2), trunQ=2 e minLen= 50. Na etapa final, a taxonomia dos fungos foi determinada utilizando o banco de dados UNITE (Sistema unificado para as espécies fúngicas baseadas em DNA vinculadas à classificação) (Abarenkov et al., 2010) que fornece a classificação taxonômica da região ITS. As leituras processadas foram importadas para o

pacote Phyloseq (McMurdie e Holmes, 2013) para realizar filtragem, análises estatísticas e a visualização dos dados. Primeiro, foram removidos os *reads* que não foram atribuídos ao reino Fungi, e os *reads* restantes foram submetidos ao processo de rarefação. Para calcular as métricas de α -diversidade, que incluiu o índice de diversidade de Shannon (H') e a riqueza de espécies, foi utilizado a função *diversity* do pacote vegan (Oksanen et al., 2020). A equitabilidade das espécies foi estimada dividindo-se o índice H' pelo logaritmo natural da riqueza de espécies. Para determinar as diferenças estatísticas potenciais entre os tratamentos e as diferentes diluições solos foi utilizado o one-way ANOVA ($\alpha = 0,05$) após a verificação das suposições de normalidade e homocedasticidade dos dados. Para os resultados significativos, foi utilizado o HSD (Diferença Honestamente Significativa) de Tukey ($\alpha = 0,05$) para determinar possíveis diferenças nas comparações pareadas.

Nas análises e visualização da β -diversidade também foi utilizado o pacote vegan (Oksanen et al., 2020). Para calcular as dissimilaridades de Bray-Curtis em pares, foi utilizado a função *metaMDS*. Na geração dos gráficos de NMDS (escalonamento multidimensional não métrico), primeiro a informação do gráfico de ordenamento obtido pela função *ordiplot* foi preparado utilizando a função *sites.long* do pacote BiodiversityR (Kindt, 2022), em seguida as representações em NMDS foram geradas via pacote ggplot2 (Wickham H, 2016). Para avaliar as diferenças potenciais na estrutura das comunidades fúngicas entre os tratamentos para cada nível de diversidade, também foram utilizados as funções do pacote vegan (Oksanen et al., 2020). Primeiramente, foi utilizado a função *betadisper* para verificar a homogeneidade das variâncias por meio de análises de dispersão multivariadas permutacionais (PERMIDISP). Valores significativos para os resultados do PERMIDISP indicam que as diferenças na estrutura da comunidade identificadas pela Análise de Variância Permutacional Multivariada (PERMANOVA) são impulsionadas pela heterogeneidade da dispersão e não pelas diferenças na estrutura dessas comunidades. Após a verificação, utilizou-se a função *adonis* do pacote vegan (Oksanen et al., 2020) para calcular a PERMANOVA com base nas dissimilaridades de Bray-Curtis, e a comparação multinível pareada entre os tratamentos foi executada usando a função *pairwise.adonis2* presente no mesmo pacote.

Foi realizado uma análise de porcentagens de similaridade (SIMPER) usando o ambiente R para identificar cada grupo de táxons fúngicos que contribuíram para os perfis de dissimilaridade de Bray-Curtis entre os diferentes tratamentos aplicados aos

microcosmos que receberam diferentes diluições. Após a identificação dos táxons, o banco de dados FUNGuild (Nguyen et al., 2016), que vincula às informações de sequenciamento de genes fúngicos com as funções ecológicas dos fungos, foi utilizado para identificar os modos tróficos os táxons que apresentaram abundância diferencial. A classificação utilizando o FUNGuild foi realizando por meio da função *funguild_assign* do pacote FUNGuildr também em ambiente R.

3.3 Resultados

3.3.1 Atividade enzimática

Para as enzimas do solo avaliadas, β -glicosidase e arilsulfatase, primeiro foi verificada a significância da interação entre os dois fatores testados: os solos com as diferentes diluições e os dois fungicidas. Para a β -glicosidase essa interação foi significativa ($p < 0,001$), então foi realizado a comparação pareada para cada diluição. Foram observadas variações significativas na atividade potencial da enzima β -glicosidase nos microcosmos 10^{-6} , sendo que na amostragem aos 14 dias o fungicida carbendazim apresentou maiores valores para a atividade desta enzima ($34,45 \mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1}$) em relação ao controle ($19,18 \mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1}$). Para essa mesma diluição na amostragem aos 28 dias, os microcosmos que receberam os fungicidas carbendazim ($46,45 \mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1}$) e mancozebe ($29,07 \mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1}$) apresentaram a atividade da β -glicosidase maior que o tratamento controle ($12,85 \mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1}$) (Figura 2 A). Os microcosmos que receberam as diluições 10^{-3} e 10^{-1} não apresentaram diferenças significativas na atividade da β -glicosidase após a aplicação dos fungicidas.

Em relação à atividade da arilsulfatase, a interação entre as diluições e os tratamentos não foi significativa ($p = 0,07$), então os efeitos da aplicação de fungicidas foram analisados considerando os microcosmos com diferentes diversidades como um único fator. Na segunda amostragem, aos 14 dias, o mancozebe ($44,90 \mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1}$) apresentou uma maior atividade potencial da enzima arilsulfatase comprado ao controle ($37,44 \mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1}$), enquanto o carbendazim ($40,94 \mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1}$) aumentou a atividade desta enzima aos 28 dias de incubação em relação ao controle ($34,45 \mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1}$) (Figura 2 B).

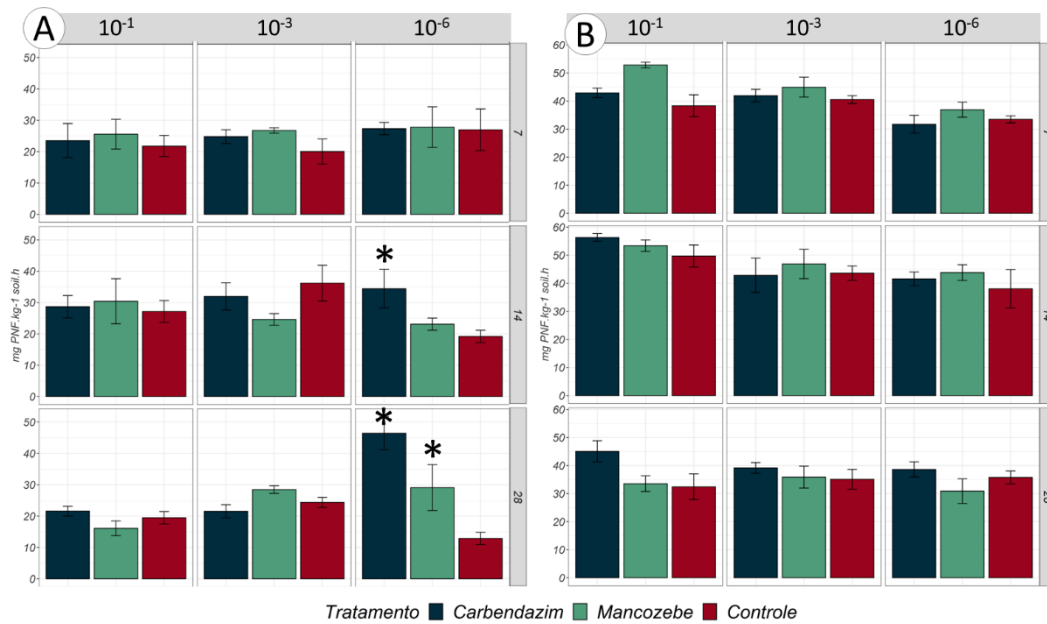


Figura 2. Potencial de atividade enzimática nos microcosmos que receberam os três níveis de diversidade (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-6}) nas três amostragens (7, 14 e 28 dias). (A) Potencial de atividade da enzima β -glicosidase e (B) Potencial de atividade da enzima arilsulfatase. Resultados significativos ($F < 0,05$) obtidos pela ANOVA seguidos pelo Teste de Tukey (HSD) ($F < 0,05$) estão destacados com asterisco (*).

3.3.2 Resultados da quantificação utilizando qPCR, dados de sequenciamento de ITS, β -diversidade e α -diversidade

Foi mensurada a abundância da região ITS das comunidades fúngicas nos três tempos e nas três diluições. Os resultados não apontaram para uma mudança quantitativa na abundância desses genes após a aplicação de fungicidas nos microcosmos que receberam os três diferentes tipos de diluições (Tabela S2).

Como resultado do sequenciamento de ITS, um total de 9.104.411 leituras (*reads*) foi obtido para sequências fúngicas (ITS1) anteriores ao processamento. Após filtragem de qualidade e a remoção de quimeras, um total de 6.341.252 leituras foram retidas (69,65% de retenção). A tabela de variante de sequência de amplicon (ASV) foi rarefeita para 15.000 leituras por amostra, sendo 108 amostras no total, após rarefação 2.195 ASVs foram preservados. Primeiramente, foi verificada se a abordagem “diluição para extinção” resultou em uma manipulação da estrutura das comunidades fúngicas. A modificação na estrutura foi validada usando PERMANOVA comparando a estrutura das comunidades controle entre os diferentes solos em cada amostragem. Para primeira amostragem aos 7 dias os controles diferiram ($R^2 = 0,35$, $F_{2,9} = 2,46$, $p < 0,001$) assim como nas amostragens aos 14 dias ($R^2 = 0,44$, $F_{2,9} = 3,56$, $p < 0,001$) e aos 28 dias ($R^2 = 0,34$, $F_{2,9} = 2,26$, $p = 0,01$).

Após a validação, os dados foram analisados separadamente por diluição e tempo de amostragem, sendo verificado que os fungicidas alteraram a comunidade fúngica dos microcosmos 10^{-1} aos 7 dias ($R^2=0,29$, $F_{2,9}=1,88$, $p= 0,04$) (Figura 3 A). Usando comparação pareada, foi evidenciado que a estrutura da comunidade sob influência do mancozebe foi significativamente diferente do controle ($p=0,029$). Os resultados do PERMIDISP não foram significativos, o que corrobora que as diferenças na dispersão dos centróides entre os tratamentos foram ocasionadas por diferenças na estrutura da comunidade e não pela heterogeneidade da dispersão. Não foram encontrados resultados significativos para os microcosmos 10^{-3} ($R^2=0,11$, $F_{2,9}=0,55$, $p= 0,95$) e 10^{-6} ($R^2=0,15$, $F_{2,9}=0,79$, $p= 0,90$) nessa mesma amostragem aos 7 dias (Figura 3 A). Na segunda amostragem, aos 14 dias, diferenças não foram observadas entre as comunidades fúngicas dos microcosmos controle e microcosmos que tiveram a estrutura da comunidade manipulados (Figura 3 B). Aos 28 dias, os solos manipulados que receberam diluição 10^{-6} apresentaram diferenças significativas entre os microcosmos tratados com fungicidas e os microcosmos controle, mas os resultados do PEMIDISP ($F_{2,8}=70,84$, $p<0,01$) revelaram variação na dispersão dos centróides devido à maior dissimilaridade na comunidade na diluição 10^{-6} nesse tempo de incubação (Figura 3 C), portanto, esses resultados não foram considerados significativos. Para os microcosmos 10^{-3} e 10^{-6} dessa mesma amostragem, aos 28 dias, não foram encontrados resultados significativos na análise de PERMANOVA (Figura 3 C).

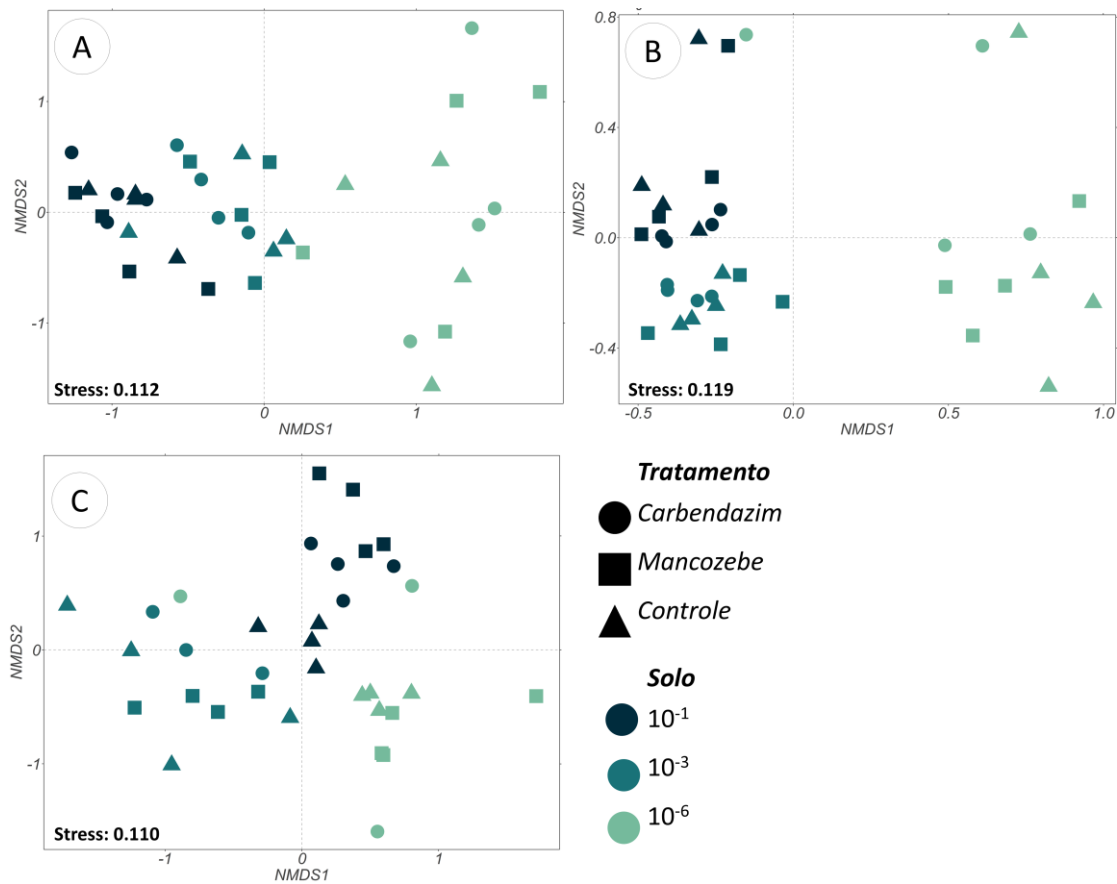


Figura 3. NMDS da comunidade fúngica baseada nas dissimilaridades de Bray-Curtis (A) amostragem aos 7 dias de incubação, (B) amostragem aos 14 dias de incubação e (C) amostragem aos 28 dias de incubação.

Em relação à α -diversidade, a aplicação de fungicidas não alterou as métricas de diversidade, riqueza e equitabilidade das comunidades fúngicas de microcosmos inoculados com as diluições de 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-6} (Figura 4).

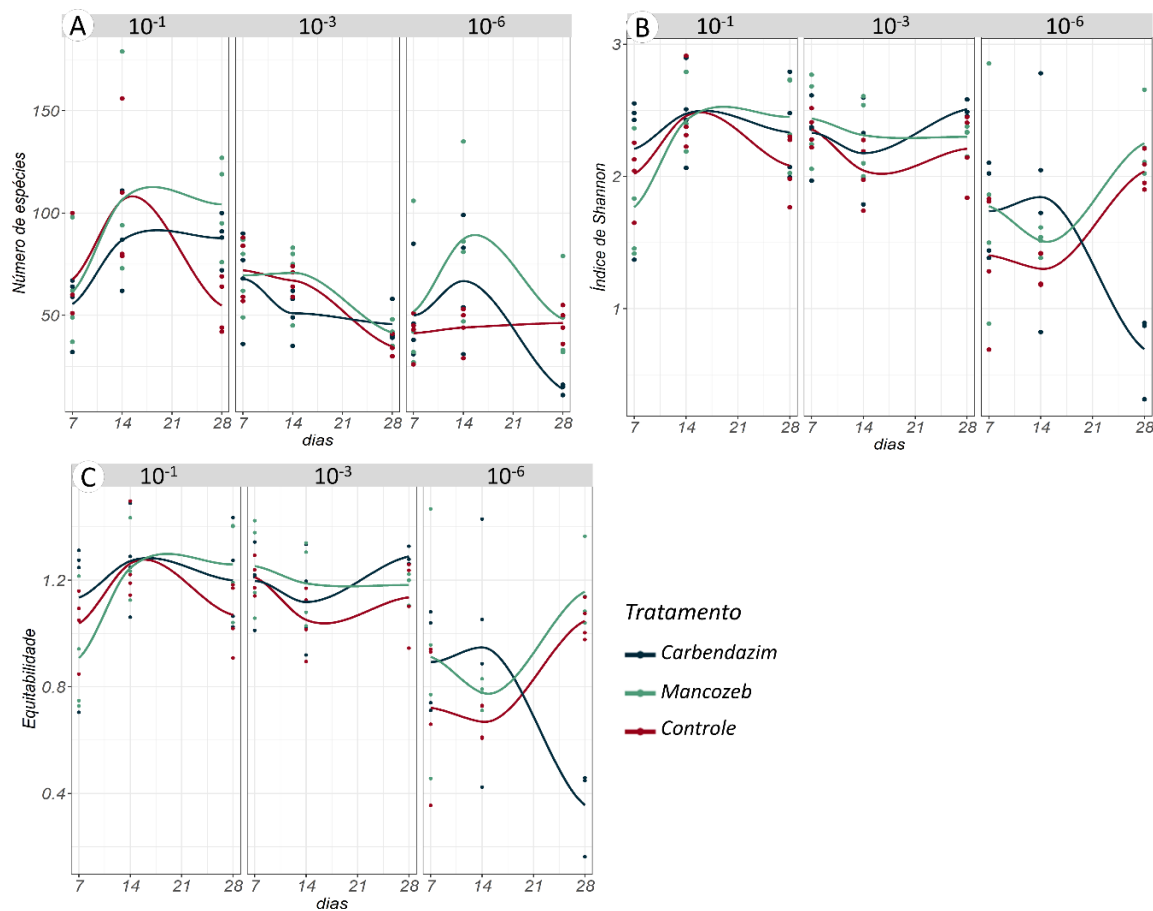


Figura 4. Índices de α -diversidade representados gráfico de regressão (A) Riqueza (B) Diversidade pelo Índice de Shannon (B) Equitabilidade.

3.3.3 Abundância diferencial e composição da comunidade

A análise do SIMPER foi utilizada para determinar os táxons, ao nível de família, que conduziram as mudanças na composição e estrutura das comunidades fúngicas e estão organizadas na tabela 1. No total foram identificadas 11 famílias que tiveram a abundância aumentada distribuídas entre as diferentes diluições e tratamentos ao longo das 3 amostragens. A maioria dessas famílias são pertencentes ao filo Ascomycota, seguindo pelo filo Basidiomycota e o filo Chytridiomycota. Essas famílias foram classificadas pelos modos tróficos utilizando a função *FUNGuild* revelando que a maioria das famílias está classificada como: saprófitos, patotrofo, patotrofo-saprófitos, patotrofo-saprófito-simbiotrófico (Tabela 1).

Tabela 1. Grupo de táxons que apresentaram abundância diferencial utilizando a análise de SIMPER e posteriormente classificadas utilizando o banco de dados para funções ecológicas de fungos FUNGuild.

*Amostragem em dias de incubação.

Filo	Família	Modo trófico	Tratamento	Diluição	Ams*
Ascomycota	Aspergillaceae	Saprófitos	Mancozebe	10 ⁻³	7
			Carbendazim	10 ⁻¹	14
	Bionectriaceae	Patotrofo-Saprófitos	Controle	10 ⁻⁶	28
	Chaetosphaeriaceae	Saprófitos	Controle	10 ⁻¹	14
	Cladosporiaceae	Saprófitos	Controle	10 ⁻⁶	7
	Hypocreaceae	Patotrofo-Saprófitos-Sibiotrófico	Carbendazim	10 ⁻¹	14
	Nectriaceae	Patotrofo-Saprófitos-Sibiotrófico	Carbendazim	10 ⁻¹	7
	Ophiocordycipitaceae	Patotrofo Patotrofo-Sibiotrófico	Mancozebe Carbendazim	10 ⁻³ 10 ⁻¹	7 14
Basidiomycota	Trichosporonaceae	Patotrofo	Controle	10 ⁻¹	14
			Controle	10 ⁻⁶	28
	Trimorphomycetaceae	Não classificado	Controle	10 ⁻¹	28
	Chytridiomycota	Terramycetaceae	Saprófitos	Controle	10 ⁻¹

Para avaliar visualmente a composição da comunidade fúngica após a aplicação dos diferentes fungicidas ao longo do período de incubação, foram construídos gráficos de barras apresentando a abundância relativa ao nível de família para as 50 famílias mais abundantes (Figura 5). Foi observada uma dominância das famílias Trichosporonaceae e Nectriaceae nas diluições 10⁻¹, das famílias Nectriaceae e Hypocreaceae na diluição 10⁻³ e das famílias Pleosporaceae, Aspergillaceae e Bionectriaceae na diluição 10⁻⁶ (Figura 5).

Em relação às diferenças entre as comunidades que receberam os fungicidas e as comunidades controle, dentro de cada tipo de solo e amostragem, foi demonstrado que a família Nectriaceae estava mais abundante nos microcosmos 10⁻¹ ($F_{2,9}=11,32$, $p=0,003$) tratados com mancozebe (média= 25,94%) e carbendazim (média=19,69%) comparados aos microcosmos controle (média=11,12%) na amostragem aos 28 dias. A família Hypocreaceae se mostrou mais abundante no microcosmo 10⁻¹ que receberam o fungicida carbendazim (média=7,27%) que os microcosmos que receberam o tratamento controle (média =2,03%), também na amostragem aos 28 dias ($F_{2,9}=5,99$, $p=0,022$). A família Trimorphomycetaceae estava menos abundante nos microcosmos 10⁻¹ que receberam os fungicidas carbendazim (média=6,41%) e mancozebe (média=5,46%)

em comparação aos microcosmos que receberam o tratamento controle (média=14,40%) na mesma amostragem aos 28 dias ($F_{2,9}= 8,86$, $p= 0,007$). No solo 10^{-3} na amostragem aos 28 dias a família Bionectriaceae apresentou uma redução na abundância relativa ($F_{2,9}=141,1$, $p=1,6 \cdot 10^{-7}$) nos microcosmos tratados com mancozebe (média=2,14%) comparados ao controle (média=2,77%), nesse mesmo microcosmo e amostragem a família Trichosporonaceae mostrou uma menor abundância ($F_{2,9}= 272,9$; $p= 8,82 \cdot 10^{-9}$) nos microcosmos tratados com mancozebe (média=50,5%) em comparação aos microcosmos controle (média=59,26%) (Figura 5).

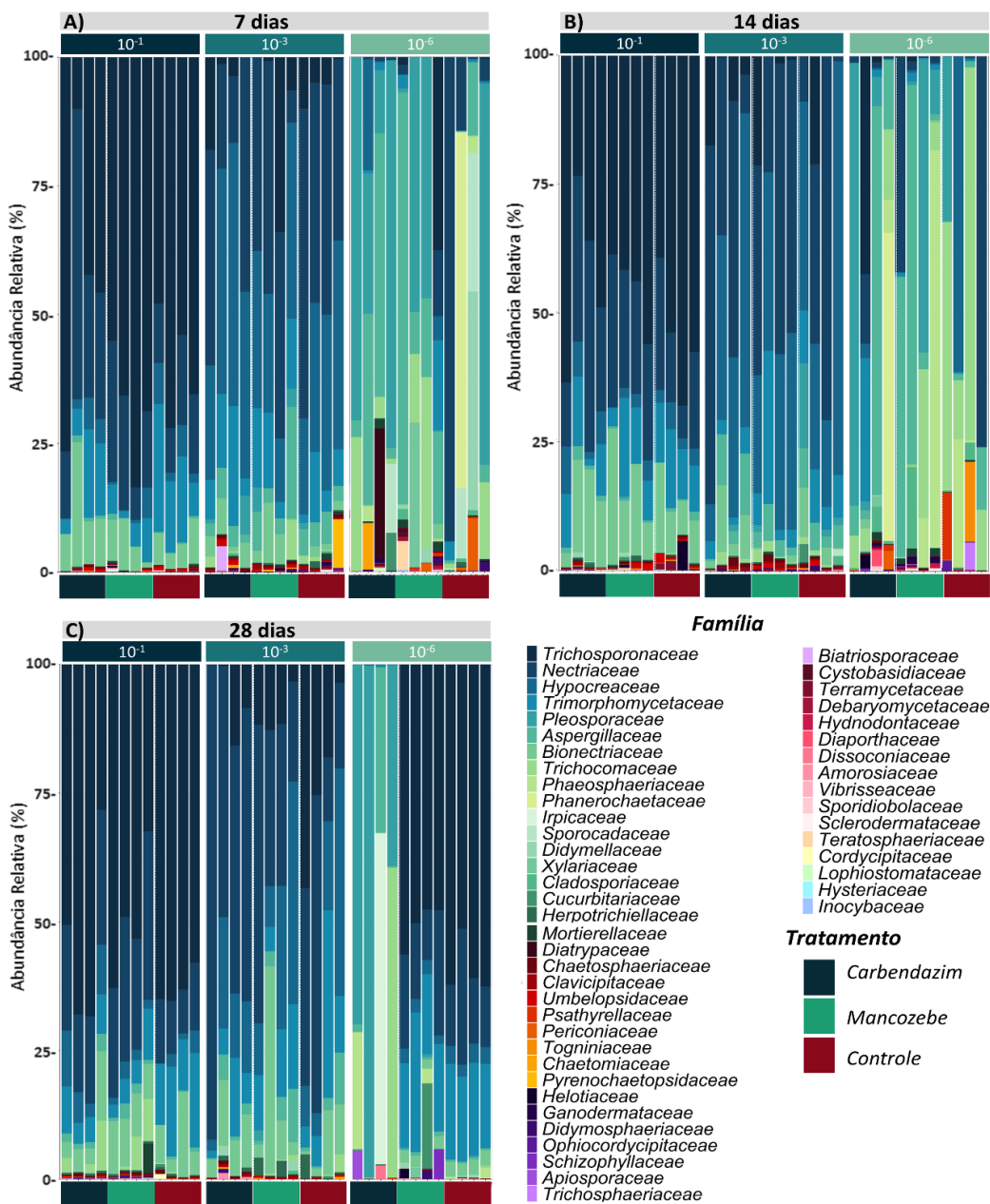


Figura 5. Abundância relativa (%) de táxons fúngicos mostrado ao nível de família para os microcosmos que receberam a diluição 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-6} . A) amostragem aos 7 dias de incubação; B) amostragem aos 14 dias e C) amostragem aos 28 dias de incubação.

3.4 Discussão

Estudar os possíveis efeitos não-alvo de fungicidas é importante para avaliar a compatibilidade das práticas de manejo de doenças com os microrganismos presentes no solo, especialmente os fungos edáficos, que assim como os demais grupos microbianos, desempenham funções como ciclagem de nutrientes e supressividade de doenças. Além disso, existe a importância de testar os efeitos dessas moléculas em solos com diferentes comunidades microbianas, com diferentes níveis de diversidade,

considerando que os potenciais efeitos desses fungicidas na comunidade microbiana do solo podem variar em solos com diferentes manejos ou com diferentes origens (Zhang et al., 2016).

Nesse estudo, os parâmetros para avaliar os potenciais efeitos dos fungicidas apresentaram resultados distintos, mas em conjunto, os resultados desse trabalho demonstram que ambos fungicidas estudados tiveram um baixo impacto na comunidade fúngica nas doses aplicadas e que os efeitos tiveram pouca variação nos microcosmos com diferentes diluições. A enzima β -glucosidase se mostrou mais sensível para detectar aos efeitos da aplicação nas comunidades microbianas que a enzima arilfulfatase. As alterações significativas na β -glicosidase em microcosmos 10^{-6} que receberam a aplicação de fungicidas indica que nos microcosmos menos diversos, a atividade dessa enzima é mais susceptível as aplicações de fungicidas, corroborando com a nossa hipótese de que comunidades menos diversas seriam mais susceptíveis às modificações. O incremento na atividade potencial de enzimas presentes no solo também foi relatado em trabalhos prévios que avaliaram a atividade enzimática após a aplicação de pesticidas e outros compostos xenobióticos. Com a aplicação de um fungicida da classe das estrobilurinas, foi verificado um decréscimo da atividade da β -glucosidade em altas doses e uma promoção da atividade com a aplicação de doses padrões (Zhang et al., 2019). O mesmo aumento na atividade foi observado após a aplicação de fungicidas a base de cobre (Bart et al., 2019) e após a aplicação de solventes no solo (Sun et al., 2017). Para a arilsulfatase, ambos fungicidas também elevaram a atividade dessa enzima em comparação aos tratamentos controle, embora a manipulação da comunidade microbiana não tenha tido efeito na atividade enzimática.

Observando os resultados de β -diversidade da comunidade fúngica, uma discreta modificação na comunidade foi observada para microcosmos que receberam a diluição 10^{-1} após a aplicação de mancozebe, contrariando nossa hipótese de microcosmos com maior nível de diversidade seriam mais resistentes a mudanças na composição das comunidades fúngicas que os microcosmos que receberam comunidades microbianas mais diluídas. A família que possivelmente direcionou essa diferença na composição foi a Trimorphomycetaceae, que apresentou uma abundância relativa maior em amostras do tratamento controle identificado pelas análises de SIMPER e uma abundância relativa elevada nos microcosmos que receberam os tratamentos carbendazim e mancozebe.

Outros microcosmos ao longo do experimento também apresentaram diferenças na abundância de alguns táxons, embora não seja possível comprovar, há indícios de que algumas famílias possam estar envolvidas com a degradação dos fungicidas aplicados. Famílias como Aspergillaceae e Hypocreaceae foram encontradas em maior abundância nos microcosmos tratados com os fungicidas, sendo que os ASVs correspondentes a essas famílias foram classificados pertencendo aos gêneros *Penicillium* e *Trichoderma*, respectivamente. Espécies pertencentes a esses gêneros foram descritas previamente como degradadores de fungicidas; um isolado pertencente ao gênero *Penicillium* foi utilizado para a degradação do fungicida isopirazam (Ahmad e Gul, 2020) e apontado como resistente a fungicidas da classe azol (Prudnikova et al., 2021). Isolados de *Trichoderma* também mostraram eficiência na degradação de antibióticos e fungicidas azóis (Manasfi et al., 2020). As famílias que foram mais abundantes nos tratamentos controles foram classificadas como saprófitos, degradadores de matéria orgânica e patótrofos, podendo ser apontadas como susceptíveis aos tratamentos com fungicidas ou às alterações na abundância de outras famílias fúngicas que se tornaram prevalentes com a aplicação dos fungicidas.

O presente estudo traz informações sobre o potencial efeito dos fungicidas carbendazim e mancozebe na comunidade fúngica do solo mensurado pelo sequenciamento da região intergênica ITS, complementando importantes trabalhos que avaliaram esses efeitos potenciais mensurando a atividade enzimática da comunidade microbiana do solo (Cycoń et al., 2010; Ding et al., 2019; Floch et al., 2011; Shao e Zhang, 2017; Yan et al., 2011). Embora as modificações na comunidade fúngicas tratadas com fungicidas tenham sido sutis em comparação as comunidades controles, foi possível destacar os grupos alterados com a aplicação de ambos fungicidas, ampliando o conhecimento dos efeitos dessas moléculas na comunidade fúngica do solo. Considerando os resultados apresentados, é importante destacar a importância da aplicação dos fungicidas seguindo a dose recomendada para minimizar efeitos adversos em microrganismos não alvos. Doses mais altas de carbendazim e aplicadas repetidamente mostraram modificações na estrutura da comunidade bacteriana tanto pela supressão de gêneros susceptíveis quanto pelo estímulo de gêneros resistentes e aqueles capazes de degradar esse fungicida (Fang et al., 2016).

Em suma, os resultados desse trabalho mostraram que o potencial enzimático da β -glicosidase foi alterado com aplicação de pesticida na comunidade microbiana menos

diversa, porém modificações na estrutura da comunidade fúngica do solo após a aplicação de fungicidas foram mais sutis. Embora não tenha sido evidente o efeito da diversidade na resposta da comunidade fúngica a adição de fungicidas, foi possível destacar os grupos alterados com os tratamentos aplicados. Estudos futuros que incluam diferentes doses de fungicidas, aplicados em solo com diferentes estruturas de comunidade microbiana, poderá ampliar a compreensão dos possíveis efeitos da aplicação de doses mais altas e como essas atuam em comunidades fúngicas menos diversas. O mesmo delineamento, porém, com foco em comunidades bacterianas traria importantes informações dos potenciais efeitos dos fungicidas nos grupos bacterianos com a aplicação desses compostos, considerando que são passíveis de serem afetados pelos fungicidas.

Referências

- Ahmad, K.S., Gul, P., 2020. Fungicide isopyrazam degradative response toward extrinsically added fungal and bacterial strains. *Journal of Basic Microbiology* 60, 484–493. doi:10.1002/jobm.201900687
- Ayesha, M.S., Suryanarayanan, T.S., Nataraja, K.N., Prasad, S.R., Shaanker, R.U., 2021. Seed Treatment With Systemic Fungicides: Time for Review. *Frontiers in Plant Science* 12. doi:10.3389/fpls.2021.654512
- Bart, S., Pelosi, C., Barraud, A., Péry, A.R.R., Cheviron, N., Grondin, V., Mougín, C., Crouzet, O., 2019. Earthworms Mitigate Pesticide Effects on Soil Microbial Activities. *Frontiers in Microbiology* 10, 1–11. doi:10.3389/fmicb.2019.01535
- Bending, G.D., Rodríguez-Cruz, M.S., Lincoln, S.D., 2007. Fungicide impacts on microbial communities in soils with contrasting management histories. *Chemosphere* 69, 82–88. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.04.042
- Černohlávková, J., Jarkovský, J., Hofman, J., 2009. Effects of fungicides mancozeb and dinocap on carbon and nitrogen mineralization in soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 80–85. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.07.001
- Cycoń, M., Piotrowska-Seget, Z., Kozdrój, J., 2010. Responses of indigenous microorganisms to a fungicidal mixture of mancozeb and dimethomorph added to sandy soils. *International Biodeterioration and Biodegradation* 64, 316–323. doi:10.1016/j.ibiod.2010.03.006
- De Souza, A.J., De Andrade, P.A.M., De Araújo Pereira, A.P., Andreote, F.D., Tornisielo, V.L., Regitano, J.B., 2017. The depleted mineralization of the fungicide chlorothalonil derived from loss in soil microbial diversity. *Scientific Reports* 7, 1–8. doi:10.1038/s41598-017-14803-0

- de Souza, A.J., Pereira, A.P. de A., Andreote, F.D., Tornisielo, V.L., Tizioto, P.C., Coutinho, L.L., Regitano, J.B., 2021. Sulfadiazine dissipation as a function of soil bacterial diversity. *Environmental Pollution* 271. doi:10.1016/j.envpol.2020.116374
- Ding, H., Zheng, X., Zhang, J., Zhang, Y., Yu, J., Chen, D., 2019. Influence of chlorothalonil and carbendazim fungicides on the transformation processes of urea nitrogen and related microbial populations in soil. *Environmental Science and Pollution Research* 26, 31133–31141. doi:10.1007/s11356-019-06213-8
- Fang, H., Han, L., Cui, Y., Xue, Y., Cai, L., Yu, Y., 2016. Changes in soil microbial community structure and function associated with degradation and resistance of carbendazim and chlortetracycline during repeated treatments. *Science of the Total Environment* 572, 1203–1212. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.08.038
- Feld, L., Hjelmsø, M.H., Nielsen, M.S., Jacobsen, A.D., Rønn, R., Ekelund, F., Krogh, P.H., Strobel, B.W., Jacobsen, C.S., 2015. Pesticide side effects in an agricultural soil ecosystem as measured by amoA expression quantification and bacterial diversity changes. *PLoS ONE* 10, 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0126080
- Ferreira, D.A., Freitas, T., Pylro, V.S., Salles, J.F., Andreote, F.D., Dini-andreote, F., 2020. Soil Microbial Diversity Affects the Plant-Root Colonization by Arbuscular Mycorrhizal Fungi.
- Floch, C., Chevremont, A.C., Joanico, K., Capowiez, Y., Criquet, S., 2011. Indicators of pesticide contamination: Soil enzyme compared to functional diversity of bacterial communities via Biolog® Ecoplates. *European Journal of Soil Biology* 47, 256–263. doi:10.1016/j.ejsobi.2011.05.007
- Gardes, M., Bruns, T.D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-- application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology* 2, 113–118. doi:10.1111/J.1365-294X.1993.TB00005.X
- Han, L., Ge, Q., Mei, J., Cui, Y., Xue, Y., Yu, Y., Fang, H., 2019. Adsorption and Desorption of Carbendazim and Thiamethoxam in Five Different Agricultural Soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 102, 550–554. doi:10.1007/s00128-019-02568-3
- Han, L., Liu, Y., Fang, K., Zhang, X., Liu, T., Wang, F., Wang, X., 2020. Azoxystrobin dissipation and its effect on soil microbial community structure and function in the presence of chlorothalonil, chlortetracycline and ciprofloxacin. *Environmental Pollution* 257, 113578. doi:10.1016/j.envpol.2019.113578
- Heuer H., M., K., P., B., Smalla K., A., E., W., 1997. Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. *Asm* 63, 3233–3241.
- Huang, Z., Wang, P., Pu, Z., Lu, L., Chen, G., Hu, X., Fayyaz, A., Gai, Y., 2021. Effects of mancozeb on citrus rhizosphere bacterial community. *Microbial Pathogenesis* 154, 104845. doi:10.1016/j.micpath.2021.104845

- IBAMA, 2022. Painel de Informações sobre a Comercialização de Agrotóxicos e Afins no Brasil – série histórica 2009 - 2020 [WWW Document]. Painéis de informações de agrotóxicos. URL <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos#Painel-comercializacao>
- Jacobsen, C.S., Hjelmsø, M.H., 2014. Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology* 27, 15–20. doi:10.1016/j.copbio.2013.09.003
- Kindt, R., 2022. BiodiversityR: Package for Community Ecology and Suitability Analysis. R Package ed Version 2.14-1.
- Kumar, U., Berliner, J., Adak, T., Rath, P.C., Dey, A., Pokhare, S.S., Jambhulkar, N.N., Panneerselvam, P., Kumar, A., Mohapatra, S.D., 2017. Non-target effect of continuous application of chlorpyrifos on soil microbes, nematodes and its persistence under sub-humid tropical rice-rice cropping system. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 135, 225–235. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.10.003
- Manasfi, R., Chiron, S., Montemurro, N., Perez, S., Brienza, M., 2020. Biodegradation of fluoroquinolone antibiotics and the climbazole fungicide by *Trichoderma* species. *Environmental Science and Pollution Research* 27, 23331–23341. doi:10.1007/s11356-020-08442-8
- Nguyen, N.H., Song, Z., Bates, S.T., Branco, S., Tedersoo, L., Menke, J., Schilling, J.S., Kennedy, P.G., 2016. FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology* 20, 241–248. doi:10.1016/j.funeco.2015.06.006
- Oksanen, A.J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., Minchin, P.R., Hara, R.B.O., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., 2020. *Vegan: Community Ecology Package* Version, in: R Package ed Version 2.0-4. Springer Netherlands, Dordrecht, p. 2395–2396. doi:10.1007/978-94-024-1179-9_301576
- Prudnikova, S., Streltsova, N., Volova, T., 2021. The effect of the pesticide delivery method on the microbial community of field soil. *Environmental Science and Pollution Research* 28, 8681–8697. doi:10.1007/s11356-020-11228-7
- Rasool, N., Reshi, Z.A., 2010. Effect of the fungicide Mancozeb at different application rates on enzyme activities in a silt loam soil of the Kashmir Himalaya, India. *Tropical Ecology* 51, 199–205.
- Shao, H., Zhang, Y., 2017. Non-target effects on soil microbial parameters of the synthetic pesticide carbendazim with the biopesticides cantharidin and norcantharidin. *Scientific Reports* 7, 1–12. doi:10.1038/s41598-017-05923-8
- Song, J., Li, T., Zheng, Z., Fu, W., Long, Z., Shi, N., Han, Y., Zhang, L., 2022. Carbendazim shapes microbiome and enhances resistome in the earthworm gut. *Microbiome* 1–14. doi:10.1186/s40168-022-01261-8
- Sułowicz, S., Cycoń, M., Piotrowska-Seget, Z., 2016. Non-target impact of fungicide tetraconazole on microbial communities in soils with different agricultural management. *Ecotoxicology*. doi:10.1007/s10646-016-1661-7

- Sun, X., Zhu, L., Wang, Jinhua, Wang, Jun, Su, B., Liu, T., Zhang, C., 2017. Toxic effects of ionic liquid 1-octyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate on soil enzyme activity and soil microbial community diversity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 135, 201–208. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.09.026
- Tabatabai, M.A., 1994. Methods of soil analysis: Part 2 Microbiological and biochemical properties, in: *Soil enzymes*. p. 775–833.
- van Elsas, J.D., Chiurazzi, M., Mallon, C.A., Elhottova, D., Kristufek, V., Salles, J.F., 2012. Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 1159–1164. doi:10.1073/pnas.1109326109
- Walia, A., Mehta, P., Guleria, S., Chauhan, A., Shirkot, C.K., 2014. Impact of Fungicide Mancozeb at Different Application Rates on Soil Microbial Populations, Soil Biological Processes, and Enzyme Activities in Soil. *The Scientific World Journal* 2014, 1–9. doi:10.1155/2014/702909
- Walters, W., Hyde, E.R., Berg-Lyons, D., Ackermann, G., Humphrey, G., Parada, A., Gilbert, J.A., Jansson, J.K., Caporaso, J.G., Fuhrman, J.A., Apprill, A., Knight, R., 2016. Improved Bacterial 16S rRNA Gene (V4 and V4-5) and Fungal Internal Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. *mSystems* 1, e00009-15. doi:10.1128/mSystems.00009-15
- Wang, C.N., Wu, R.L., Li, Y.Y., Qin, Y.F., Li, Y.L., Meng, F.Q., Wang, L.G., Xu, F.L., 2020. Effects of pesticide residues on bacterial community diversity and structure in typical greenhouse soils with increasing cultivation years in Northern China. *Science of the Total Environment* 710, 136321. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.136321
- Wertz, S., Degrange, V., Prosser, J.I., Poly, F., Commeaux, C., Freitag, T., Guillaumaud, N., Roux, X. Le, 2006. Maintenance of soil functioning following erosion of microbial diversity. *Environmental Microbiology* 8, 2162–2169. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01098.x
- Wickham H, 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*, Springer-Verlag New York.
- Yan, H., Wang, D., Dong, B., Tang, F., Wang, B., Fang, H., Yu, Y., 2011. Dissipation of carbendazim and chloramphenicol alone and in combination and their effects on soil fungal:Bacterial ratios and soil enzyme activities. *Chemosphere* 84, 634–641. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.03.038
- Yang, L.N., He, M.H., Ouyang, H.B., Zhu, W., Pan, Z.C., Sui, Q.J., Shang, L.P., Zhan, J., 2019. Cross-resistance of the pathogenic fungus *Alternaria alternata* to fungicides with different modes of action. *BMC Microbiology* 19, 1–10. doi:10.1186/s12866-019-1574-8
- Zhang, C., Zhou, T., Zhu, L., Juhasz, A., Du, Z., Li, B., Wang, Jun, Wang, Jinhua, Sun, Y., 2019. Response of soil microbes after direct contact with pyraclostrobin in fluvo-aquic soil. *Environmental Pollution* 255, 113164. doi:10.1016/j.envpol.2019.113164
- Zhang, H., Chen, S., Zhang, Q., Long, Z., Yu, Y., Fang, H., 2020. Fungicides enhanced the abundance of antibiotic resistance genes in greenhouse soil. *Environmental Pollution* 259, 113877. doi:10.1016/j.envpol.2019.113877
- Zhang, M., Teng, Y., Xu, Z., Wang, J., Christie, P., Luo, Y., 2016. Cumulative effects of repeated chlorothalonil application on soil microbial activity and community in contrasting soils. *Journal of Soils and Sediments* 16, 1754–1763. doi:10.1007/s11368-016-1404-7

Material suplementar capítulo 3

Tabela S1. Parâmetros físico-químicos mensurados para a amostra de solo coletado que foi utilizado para a montagem dos microcosmos como solo recipiente, estéril, e inóculo microbiano submetido a diluição seriada.

Parâmetros químicos	Solo
pH CaCl ₂	4,6
M.O. Colorimétrica g.dm ⁻³	45
K Resina mmolc.dm ⁻³	1,3
Ca Resina mmolc.dm ⁻³	20
Mg Resina mmolc.dm ⁻³	7
H+Al SMP mmolc.dm ⁻³	52
SB mmolc.dm ⁻³	28,3
CTC mmolc.dm ⁻³	80,3
V (%)	35
Parâmetros físicos	Solo
AT g kg ⁻¹	723
Silte g kg ⁻¹	126
Argila (c/ disp) g kg ⁻¹	151
Classe de Textura	md-ar

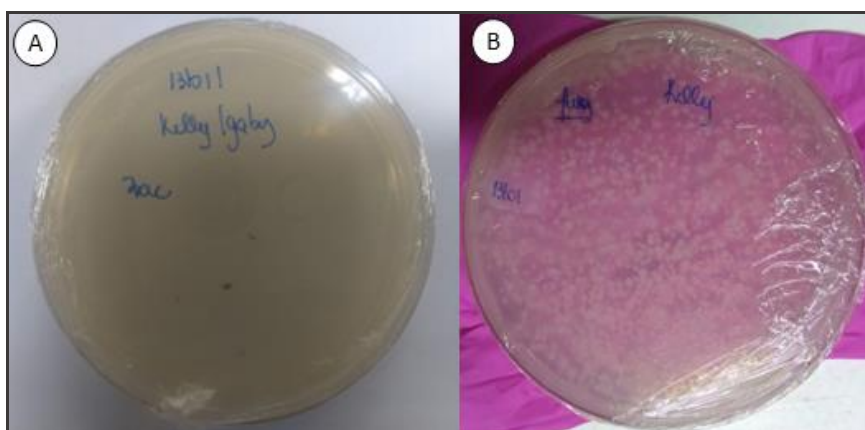


Figura S1. Fotos dos meios de cultivo inoculados com solo previamente esterilizado por radiação gama 35 kGy (A) meio TSB para a seleção de bactérias em que foi verificado o crescimento de poucas colônias e (B) meio BDA onde foi possível verificar uma baixa diversidade de fungos no solo, constatando a redução significativa da comunidade microbiana após a esterilização.

Tabela S2. Resultados da quantificação por qPCR do gene ITS para as três diluições ao logo das três amostragens.

Ams*	Tratamento	10⁻¹	10⁻³	10⁻⁶
7 dias	Carbendazim	2,64E+08± 8,03E+07	1,22E+08± 6,08E+07	1,53E+08± 1,06E+08
	Mancozebe	3,00E+08± 2,52E+08	8,60E+07± 4,50E+07	1,25E+08± 8,85E+07
	Controle	2,28E+08± 1,33E+08	5,05E+07± 2,88E+07	9,66E+07± 6,48E+07
14 dias	Carbendazim	8,17E+07± 2,69E+07	1,36E+08± 3,68E+07	9,29E+07± 1,04E+08
	Mancozebe	1,28E+08± 9,28E+07	1,24E+08± 1,09E+08	4,92E+07± 3,48E+07
	Controle	8,73E+07± 1,73E+07	1,33E+08± 5,88E+07	1,37E+08± 6,63E+07
28 dias	Carbendazim	1,35E+08± 5,65E+07	2,03E+08± 1,02E+08	2,80E+08± 1,54E+08
	Mancozebe	7,22E+07± 3,22E+07	1,28E+08± 2,00E+07	1,12E+08± 6,51E+07
	Controle	2,52E+08± 1,92E+08	1,50E+08± 7,75E+07	3,17E+07± 1,61E+07

*Amostragem em dias de incubação.

4 ESTRUTURAÇÃO DIFERENCIAL DA RIZOSFERA DE SOJA PROMOVIDA PELO TRATAMENTO DE SEMENTES COM PESTICIDAS

Resumo

A composição do microbioma da rizosfera é o resultado da transmissão vertical e horizontal dos microrganismos presentes nas sementes e no solo. Fatores como o genótipo da planta e distúrbios bióticos e abióticos também modulam essa comunidade microbiana. No cultivo de soja uma prática comum é o tratamento de sementes com pesticidas protetivos que apresentam o potencial de modular na estruturação do microbioma da rizosfera. Nesse cenário, o presente trabalho avaliou em experimentos de mesocosmos, em casa de vegetação, os potenciais efeitos não-alvo de três tratamentos de sementes comerciais sobre a estruturação das comunidades fúngicas e bacterianas associadas à rizosfera da soja em quatro estágios de desenvolvimento da planta. Para isso foi empregado o sequenciamento de marcadores filogenéticos, análises fenotípicas e a mensuração da colonização das plantas de soja por fungos micorrízicos e fixadores de nitrogênio. A estrutura das rizobactérias mostraram modificações desde o estágio de emergência (VE) até o terceiro nó (V3) e as comunidades fúngicas apresentaram modificações a partir do estágio de primeiro nó (V1) até o pleno florescimento (R2). Foram identificados táxons bacterianos associados a degradação dos fungicidas presentes na formulação dos pesticidas e a redução da função relacionada a simbiose desempenhada por fungos micorrízicos arbusculares na rizosfera das plantas tratadas com os pesticidas. Os resultados do presente trabalho demonstram o potencial dos pesticidas de sementes em modular o microbioma da rizosfera de soja desde os estágios iniciais até as fases finais do crescimento da soja. Embora não tenham sido observadas alterações negativas no fenótipo das plantas, os resultados mostram a importância de continuar investigando se as modificações na estruturação dessa comunidade atingem diretamente a funcionalidade dos microrganismos benéficos associados a rizosfera da soja.

Palavras-chave: Comunidade bacteriana da rizosfera, Comunidade fúngica da rizosfera, Tratamento de sementes com pesticidas, Estágios de desenvolvimento da soja, Sequenciamento.

Abstract

The composition of the rhizosphere microbiome results from vertical and horizontal transmission of microorganisms harbored by seeds and soil, being modulated by the plant genotype and by biotic and abiotic disturbances. In soybean cultivation, a common practice is the treatment of seeds with protective pesticides which has the potential to modulate rhizosphere microbiome structure. In this scenario, the present work evaluated mesocosm experiments in a greenhouse, the potential non-target effects of three commercial seed treatments on the structuring of fungal and bacterial communities associated with the soybean rhizosphere at four stages of plant

development. Here, it was applied methods as the sequencing of phylogenetic markers, phenotypic analysis, and the measurement of colonization of soybean plants by mycorrhizal and nitrogen-fixing fungi. The β diversity of rhizobacteria showed changes from the emergence stage (VE) to the third node (V3) and the fungal communities showed changes from the first node stage (V1) to full flowering (R2). Also, it was identified bacterial taxa associated with the degradation of fungicides present in the pesticide formulation and the reduction of the symbiosis-related function performed by arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of treated plants. The results of the present work demonstrate the potential of seed pesticides to modulate the soybean rhizosphere microbiome from early to late stages of soybean growth. Although no negative changes were observed in the phenotype of plants, the results show the importance of continuing to investigate if the changes in the structuring of this community directly affect the functionality of beneficial microorganisms associated with the soybean rhizosphere.

Keywords: Rhizosphere bacterial community, Rhizosphere fungal community, Pesticide seed treatment, Soybean developmental stages, and Sequencing.

4.1 Introdução

A rizosfera é a região que se localiza imediatamente na interface entre as raízes e o solo, sendo influenciada pelos exsudatos radiculares (Philippot et al., 2013). Considerado um *hotspot*, essa região é altamente ativa e colonizada por microrganismos que exercem efeitos positivos no crescimento e na saúde das plantas, principalmente por meio da disponibilização de nutrientes, na supressão de doenças e na proteção de estresses abióticos (Mendes et al., 2013). A composição do microbioma na rizosfera resulta de uma combinação da transmissão vertical do microbioma presentes nas sementes (Adam et al., 2018) e da transferência horizontal de grupos microbianos competentes do solo (Munoz-Ucros et al., 2021). Além desses fatores, a composição da comunidade da rizosfera é altamente influenciada pelo genótipo da planta (Xu et al., 2009), tipo de solo e pela composição química dos exsudatos das raízes (Chaparro et al., 2014). No entanto, a composição das comunidades bacterianas e fúngicas da rizosfera também podem ser moduladas em resposta a distúrbios bióticos e abióticos (Itoh et al., 2018). Na agricultura, práticas comuns também podem ser determinantes na composição da rizosfera, como, por exemplo, a aplicação de pesticidas (Itoh et al., 2018). Os pesticidas são aplicados nas folhas, diretamente no solo ou por tratamento de sementes antes da semeadura.

Estima-se que 95% das sementes de soja (*Glycine Max* L. Merr.) são tratadas com pesticidas protetivos, os quais incluem os inseticidas, fungicidas sistêmicos e de contato (White e Hoppin, 2004). Esses pesticidas são responsáveis por proteger as sementes e plântulas contra pragas do solo e doenças transmitidas por sementes durante as primeiras semanas de desenvolvimento (Kazda et al., 2005). Os fungicidas de contato têm como alvo os patógenos da superfície da semente e do solo, impedindo que os fungos patogênicos entrem no tecido da planta (Ayesha et al., 2021). Como um exemplo de fungicidas de contato, o tiram é um fungicida carbamato com ação protetora, que atua inibindo a germinação de esporos e o crescimento micelial com atividade multissítio nas células de fungos (Gao et al., 2021). Os fungicidas sistêmicos têm como alvo os patógenos de superfície e os patógenos internos da semente. Dentre eles, o carbendazim é o fungicida mais utilizado na agricultura (Ayesha et al., 2021), classificado como um fungicida benzimidazol de amplo espectro, que atua prejudicando a divisão celular através da inibição da montagem de β -tubulina na mitose (Ding et al., 2019). O fungicida tiofanato-metílico é um fungicida carbamato de amplo espectro com atividade protetora que atua danificando a divisão celular em fungos (Malhat et al., 2021). Além disso, a piraclostrobina é categorizada como um fungicida sistêmico com ação protetora, pertencente à classe das estrobilurinas, atuando na inibição da respiração dos fungos (Zhang et al., 2017). Sobre os inseticidas aplicados no tratamento de sementes, o fipronil é um inseticida fenilpirazol de amplo espectro, com ação de contato e ingestão, atuando como antagonista do canal receptor de cloreto GABA (Raveton et al., 2007).

Embora os pesticidas sejam desenvolvidos para controlar pragas e patógenos, eles podem apresentar efeitos sobre organismos não-alvos. Os fungicidas são eficientes em suprimir patógenos fúngicos do solo e de sementes, mas não são espécie-específicos, da mesma forma que os inseticidas agem prejudicando a fisiologia dos insetos, mas estudos mostram efeitos não-alvo em microrganismos do solo. Com relação aos fungicidas, estudos anteriores mostraram que o carbendazim altera a colonização de micorrízica das plantas (Raya-Hernández et al., 2020) e parâmetros microbianos do solo, como atividades enzimáticas (Shao e Zhang, 2017) e respiração do solo (Yan et al., 2011). O fungicida tiram também foi encontrado interferindo nas atividades enzimáticas em dois solos agrícolas (Madakka et al., 2017), enquanto a piraclostrobina diminuiu as

atividades enzimáticas no solo, a diversidade do solo e provocou modificações na estrutura das comunidades microbianas (Zhang et al., 2019). Em relação ao fipronil, este inseticida foi considerado prejudicial às funções de ciclagem de nitrogênio da microbiota do solo (Sim et al., 2022).

Enquanto a maioria dos estudos se concentrou em investigar os efeitos não-alvo dos pesticidas na microbiota do solo, poucos estudos tiveram como objetivo analisar os potenciais impactos dos tratamentos de sementes na estruturação do microbioma vegetal. Em relação ao último, esses estudos concentram-se na influência potencial de tratamentos de sementes, inseticidas e fungicidas, sobre os microrganismos endofíticos (Chen et al., 2020; Nettles et al., 2016) e os presentes na filosfera (Parizadeh et al., 2021), enquanto os efeitos na ecologia da rizosfera têm sido pouco estudados. Foi encontrado um estudo que investigou os efeitos na rizosfera do trigo após o tratamento de sementes com os inseticidas neonicotinóides (Li et al., 2018), o qual indicou a ausência de efeitos do tratamento de sementes na comunidade da rizosfera. No entanto, apenas um estudo até agora investigou o efeito de fungicidas combinados com inseticidas usados para tratar sementes na rizosfera das plantas. Curiosamente, os resultados relatam mudanças significativas, permanecendo por mais de quatro semanas após a semeadura, nas comunidades fúngicas e bacterianas da rizosfera do milho e nas comunidades fúngicas da rizosfera das plantas de soja (Nettles et al., 2016). Considerando os potenciais impactos dos tratamentos de sementes sobre os mecanismos que impulsionam a estruturação da comunidade rizosférica, ainda é necessário compreender melhor como tais tratamentos afetam a trajetória de táxons específicos na rizosfera, nos estágios iniciais e posteriores do desenvolvimento da planta.

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os potenciais efeitos de três tratamentos de sementes comerciais sobre as comunidades fúngicas e bacterianas associadas a rizosfera da soja em quatro estágios de desenvolvimento da planta: estágio de emergência (VE), estágio de primeiro nó (V1), estágio de terceiro nó (V3) e estágio de floração plena (R2). Especificamente, foi abordado nesse estudo as seguintes questões sobre a montagem da comunidade microbiana da rizosfera sob influência do tratamento de sementes com pesticidas: (1) Com a possível modificação na estrutura da rizosfera tratadas com os pesticidas de sementes, os efeitos são persistentes ao longo do desenvolvimento das plantas e a trajetória observada nas comunidades bacterianas e

fúngicas são semelhantes? (2) No caso de mudanças na estrutura da comunidade, quais táxons responsáveis pelas diferenças nas comunidades fúngicas e bacterianas? (3) Os tratamentos de sementes influenciarão negativamente a produção de massa seca de raízes e parte aérea e a colonização de bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos?

Em um cenário onde ocorre perturbação da estrutura das comunidades fúngicas e bacterianas, esperam-se efeitos mais proeminentes na colonização microbiana no estágio de emergência (VE) com estabilização das comunidades microbianas nos estágios posteriores. Além disso, uma segunda hipótese é que os pesticidas utilizados nos tratamentos de sementes devido à presença de fungicidas na sua composição causarão mudanças mais proeminentes na estrutura das comunidades fúngicas do que nas comunidades bacterianas.

4.2 Metodologia

4.2.1 Montagem do experimento em mesocosmos

O experimento de mesocosmos foi realizado em casa de vegetação para normalizar a influência de mudanças nas condições ambientais, como temperatura, umidade e outros fatores os quais poderiam afetar o desenvolvimento da soja. Amostras de solo foram coletadas em solo agrícola, classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico típico, em uma área experimental da Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' (ESALQ/USP, Piracicaba, Brasil) no município de Piracicaba, São Paulo, Brasil (22° 43' 05,0"S 47° 36' 55,5"W). O solo foi coletado de uma superfície (0-10 cm) e peneirado em peneira de 2 mm antes das análises químicas e físicas realizadas no Laboratório de Análise de Solos da ESALQ/USP. Para a caracterização química foram determinados pH, matéria orgânica (MO), fósforo (P), enxofre (S), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), alumínio (Al), saturação por bases (BS), V % e M% , cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn) seguindo a metodologia descrita por (Raij et al., 2001). Para análise física, foram determinados as porcentagens de argila, silte e areia, os resultados das análises químicas e físicas estão descritos na tabela S1 em material suplementar.

Os mesocosmos foram montados em potes plásticos de 3,5 kg contendo 3 kg de solo peneirado que foram pré-incubados por 30 dias a 25 °C e 60% da capacidade de retenção de água. Após esse período, foram semeadas três sementes de soja em cada vaso e após a emergência, uma plântula foi selecionada para ser mantida. O genótipo de soja (*Glycine Max* L. Merr.) da variedade AS 3730 foi utilizado como planta modelo, as sementes foram tratadas com três tipos de defensivos de sementes como formulação comercial na dose recomendada conforme tabela 1. Esses três pesticidas são amplamente utilizados atualmente no Brasil para tratar sementes de soja. Para o tratamento, primeiramente, as sementes foram revestidas com os pesticidas comerciais após a secagem da superfície das sementes, e em seguida foi realizada a inoculação com *B. japonicum* na concentração de $1,2 \times 10^6$ células semente⁻¹. Como tratamento controle, foram utilizadas sementes não tratadas.

Tabela 1. Pesticidas aplicados como tratamento de sementes de soja para o estudo de estruturação da rizosfera

Nome comercial	Composto ativo	Concentração do Composto ativo (g/L ou kg)	Recomendação de aplicação do produto comercial (mL/sementes kg)
Carbendazim Nortox®	Carbendazim ¹	500 g/L	120 mL/100kg sementes
Derosal®	Carbendazim ¹ + Tiram ²	150 g/L + 350 g/L	200 mL/100kg sementes
Standak®	Piraclostrobina ¹ + tiofanato-metilíco ¹ +fipronil ³	25 g/L+ 225 g/L+ 250 g/L	200 mL/100kg sementes

Legenda: ¹Fungicida localmente sistêmico, ² Fungicida de contato e ³ Inseticida

Foram utilizados nos experimentos um total de 102 mesocosmos, ou seja, 4 tratamentos (sementes revestidas com 3 tipos de pesticidas e sementes não revestidas), 6 repetições, 4 pontos de amostragem da rizosfera da soja, 6 vasos contendo apenas o solo peneirado sem planta para servir como referência de solo sem interferência de raízes. Os mesocosmos foram mantidos em condições controladas a 28° C durante o dia e 19° C durante a noite com fotoperíodo de 12 horas (Figura 1). A adubação padrão sem adição de nitrogênio foi aplicada conforme recomendado, a umidade também foi ajustada regularmente por meio de rega manual.

Tratamentos:

- 1) Carbendazim Nortox® (fungicida)
- 2) Derosal ®(Carbendazim+Tiram)
- 3) Standak Top ®(Piraclostrobina+Tiofanato Metílico+Fipronil)
- 4) Sementes não tratadas (Controle)

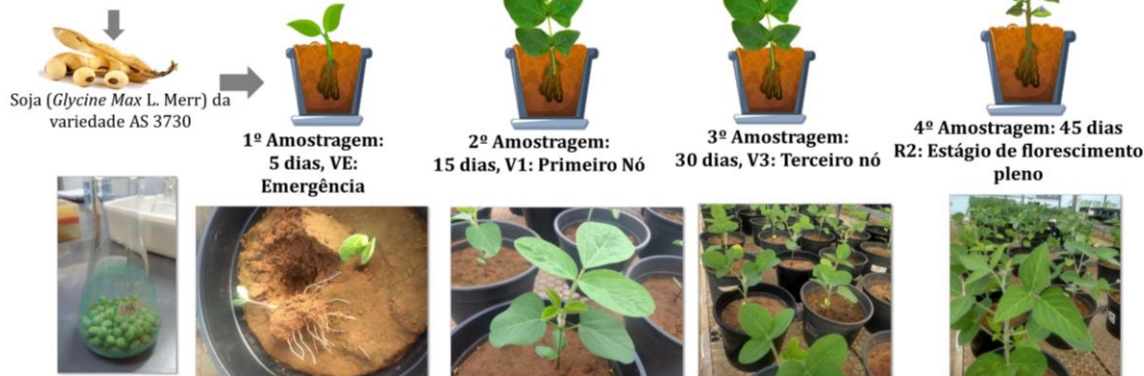


Figura 1. Delineamento experimental e imagens do experimento desenvolvido nesse capítulo.

4.2.2 Amostragem da rizosfera, avaliação do peso seco da soja, determinação da nodulação e colonização micorrízica

As plantas foram coletadas nos estágios VE (emergência), V1 (primeiro nó), V3 (terceiro nó) e R2 (floração plena). Todos os tratamentos atingiram os respectivos estágios de amostragens uniformemente. A coleta do solo da rizosfera da soja foi realizada primeiro agitando as raízes, em seguida, o solo aderido às raízes foi coletado com o auxílio de ponteiras plásticas estéreis. Após a coleta da rizosfera, a parte aérea e as raízes foram separadas e limpas com água destilada.

A nodulação foi determinada através da contagem do número de nódulos das raízes frescas. Posteriormente, esses materiais foram secos a 72° C em secador forçado a ar até atingirem peso constante para determinação do peso seco. Para determinar a colonização micorrízica arbuscular, fragmentos secos de raízes finas foram separados, hidratados com solução de etanol (70%), clareados em KOH 10% (p:v) por 12 h, corados com solução de tinta de caneta (0,05%) por 1 min a 90° C, e mantidos em solução de ácido láctico-glicerina (Vierheilig et al., 1998). A determinação da colonização do comprimento da raiz foi determinada por exame visual, utilizando microscopia de luz, de 100 fragmentos de raízes por amostra.

Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), após verificação dos pressupostos. O teste post hoc de Diferença Honestamente Significativa

de Tukey (Tukey HSD) a 5% de significância foi usado para comparar diferenças estatisticamente potenciais entre os tratamentos sobre o conjunto de variáveis. Essas análises foram realizadas no ambiente R versão 4.1.2.

4.2.3 Extração de DNA, sequenciamento e processamento dos dados

As extrações de DNA das amostras de solo e rizosfera foram realizadas com o kit DNeasy® PowerSoil® (Qiagen, Hilden, Alemanha), conforme o protocolo determinado pelo fabricante, e armazenadas a -20 °C. A qualidade e a quantidade das amostras foram medidas usando eletroforese em gel de agarose a 1,5% e espectrofotômetro NanoDrop™ OneC Microvolume UV-Vis (Thermo Scientific).

As comunidades bacterianas foram analisadas por meio de amplificação por PCR empregando o par de primers 341f (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') e 785r (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (Klindworth et al., 2013) que têm como alvo a região V3-V4 do rRNA 16S. Para as comunidades fúngicas, a amplificação foi realizada com os primers ITS1f (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS2r (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') (Gardes e Bruns, 1993) que amplificam a região ITS1 do ITS (espaçador interno transcrito). Os produtos amplificados foram sequenciados em uma plataforma de sequenciamento Illumina MiSeq no laboratório de Genômica do Instituto Huck (Huck Institute of the Life Science), da Universidade Estadual da Pensilvânia (Penn State University).

A análise das sequências de origem bacteriana e fúngica foram realizadas usando a *pipeline* DADA 2, versão 1.16 (Callahan et al., 2016), no ambiente R versão 4.1.2. Para dados de sequência bacteriana, a função *filterAndTrim* no pacote Dada2 foi usado para filtrar e trinar *reads* usando os parâmetros: maxN=0, maxEE=c(2,2), e truncLen=c(230,225). Na última etapa, a taxonomia foi determinada usando o banco de dados Silva v138.1(Quast et al., 2013). Para os dados fúngicos, o processamento foi semelhante aos dados bacterianos, com exceção dos parâmetros usados na função *filterAndTrim*: maxN=, maxEE=c(2,2), truncQ=2, e minLen= 50. O banco de dados também diferiu do processamento das comunidades bacterianas, para a comunidade fúngica foi utilizado o UNITE (Sistema unificado para as espécies fúngicas baseadas em DNA vinculadas à classificação)(Abarenkov et al., 2010) que fornece a classificação taxonômica da região

ITS. As leituras processadas foram importadas para o pacote Phyloseq (McMurdie e Holmes, 2013) para filtragem adicional, visualização e análises estatísticas.

4.2.4 Análise estatística de dados de sequências bacterianas e fúngicas

Na primeira etapa, as leituras (*reads*) que não foram atribuídos a bactérias e fungos foram removidos e as leituras restantes foram submetidos ao processo de rarefação. Para as análises de α -diversidade, o índice de diversidade de Shannon (H') e a riqueza de espécies foram calculados usando a função *diversity* do pacote *vegan* (Oksanen et al., 2020), enquanto a equitabilidade de espécies foi calculada dividindo-se o índice H' pelo logaritmo natural da riqueza de espécies. As diferenças estatísticas potenciais nestas métricas entre os tratamentos foram determinadas primeiro utilizando ANOVA (one-way) ($\alpha=0,05$) após a verificação das suposições de normalidade e homocedasticidade. As comparações pareadas foram determinadas usando o HSD de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Para análises de β -diversidade, o pacote *vegan* (Oksanen et al., 2020) foi usado para calcular as dissimilaridades de Bray-Curtis aos pares usando a função *metaMDS*. Além disso, a função *ordiplot* foi usada como primeiro passo para visualizar as dissimilaridades por meio de ordenação restrita usando a função *capscale*. Os gráficos finais foram gerados usando o pacote *ggplot2* (Wickham H, 2016), onde a função auxiliar *sites.long* do pacote *BiodiversityR* (Kindt, 2022) foi utilizado para preparar as informações do *ordiplot* em seguida criar os gráficos CAP (análise canônica das coordenadas principais) via *ggplot2*.

Para avaliar as diferenças potenciais na estrutura da comunidade microbiana entre os tratamentos também foram utilizadas as funções do pacote *vegan* (Oksanen et al., 2020). Primeiramente, a homogeneidade das variâncias foi verificada por meio de Análises Multivariadas Permutacionais de dispersão (PERMIDISP) usando a função *betadisper* no intuito de testar as diferenças na homogeneidade das dispersões das amostras. Após a verificação, a Análise de Variância Permutacional Multivariada (PERMANOVA) foi realizada com base nas dissimilaridades de Bray-Curtis usando a função *adonis*, e a comparação pareada multinível entre os tratamentos foi executada usando a função *pairwise.adonis2*.

O impacto geral dos pesticidas utilizados para o tratamento das sementes foi mensurado calculando distância entre os centróides (obtidos pela dissimilaridade de Bray-Curtis) para cada tratamento e comparado entre as distâncias dos centróides do tratamento controle, para as comunidades bacterianas e fúngicas da rizosfera. A visualização desses dados foi feita por gráfico de linhas utilizando o pacote ggplot2.

Para identificar a contribuição de cada grupo de táxons para os perfis de dissimilaridade de Bray-Curtis da comunidade bacteriana e fúngica entre os diferentes tratamentos, foi realizado uma Análise de Porcentagens de Similaridade (SIMPER) (Clarke, 1993) utilizando o ambiente R. Em seguida foi aplicado um modelo baseado em ANOVA para as comunidades bacterianas para predizer a significância dos grupos que apresentaram abundância diferencial. Na visualização desses grupos bacterianos foram gerados gráficos de bolhas para cada estágio de desenvolvimento da soja usando o pacote ggplot2. Para as comunidades fúngicas, os 10 grupos mais abundantes selecionados após a análise de SIMPER foram classificados pelo modo trófico utilizando o banco de dados do FUNGuild (Nguyen et al., 2016) que combina as funções ecológicas de fungos com os dados de sequenciamento de genes fúngicos. Para isso foi utilizado a função *funguild_assign* do pacote FUNGuildr no ambiente R, as informações foram organizadas e apresentadas em tabelas.

4.3 Resultados

4.3.1 Efeitos de pesticidas de sementes sobre atributos microbiológicos e características fenotípicas das plantas de soja

Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) para os valores de massa seca de raízes e parte aérea entre os tratamentos de sementes com pesticidas. Também não foi observado alterações significativas no resultado das avaliações da nodulação por bactérias fixadoras de nitrogênio e da colonização micorrízica (Figura S1).

4.3.2 Efeitos de pesticidas usados tratar as sementes na comunidade microbiana da rizosfera da soja

Um total de 4.593.795 leituras (uma média de 38.281 por amostra) foi obtido para sequências bacterianas (16Sv3-v4) antes do processamento. Com filtragem de qualidade e remoção de quimeras, um total de 1.676.358 leituras (uma média de 14.087 por amostra) foram retidos (35,50% de retenção). Para a rarefação da tabela de ASVs foi determinado o número de 6.500 leituras por amostra, após esse procedimento foram mantidas 22.310 ASVs. Para sequências fúngicas (ITS1), um total de 5.335.660 leituras (média de 45.217 por amostra) foi obtido antes do processamento. Após a filtragem de qualidade e remoção de quimeras, um total de 3500.894 leituras (uma média de 29.922 por amostra) foram retidos (65,61% de retenção). A tabela ASV foi rarefeita para 15.000 leituras por amostra, após a rarefação 9.878 ASVs foram preservadas.

Para acessar as diferenças das comunidades microbianas da rizosfera associadas às sementes tratadas, a β -diversidade foi calculada usando as dissimilaridades de Bray-Curtis e visualizada usando gráficos CAP. Diferenças na β -diversidade das comunidades bacterianas foram encontradas usando PERMANOVA considerando as amostras da rizosfera de todos os estágios de desenvolvimento ($R^2= 0,049$, $F_{3,76}= 1,732$, $p= 0,001$) (Figura 2 A). Mudanças na estrutura da comunidade bacteriana começaram no estágio VE ($R^2= 0.217$, $F_{3,18}= 1,663$, $p= 0,002$) (Figura 2 B) e permaneceram nos estágios V1 ($R^2= 0,2001$, $F_{3,20}= 1,673$, $p= 0,012$) (Figura 2 C) e V3 ($R^2= 0,169$, $F_{3,20}= 1,357$, $p= 0,001$) (Figura 2 D), as mudanças observadas no estágio R2 não foram significativas para as comunidades bacterianas (Figura 2 E). Os resultados do PERMIDISP não foram significativos para as diferenças na dispersão dos centróides, o que revelou que as diferenças entre os tratamentos não foram influenciadas pelas diferenças na dispersão e sim pelos tratamentos, confirmando a significância dos resultados obtidas por meio da PERMANOVA (Tabela S2). O efeito geral dos pesticidas na comunidade bacteriana da rizosfera está demonstrado na figura 2 F, onde pode ser observado que os pesticidas que possuem carbendazim em sua composição, Derosal® e Carbendazim Nortox®, apresentaram um padrão similar de modificação da comunidade ao longo do desenvolvimento da soja, e que as dissimilaridades com o controle são mais expressivas nos 2 primeiros estágios de desenvolvimento, reduzindo nos estágios V3 e R2 (Figura 2 F).

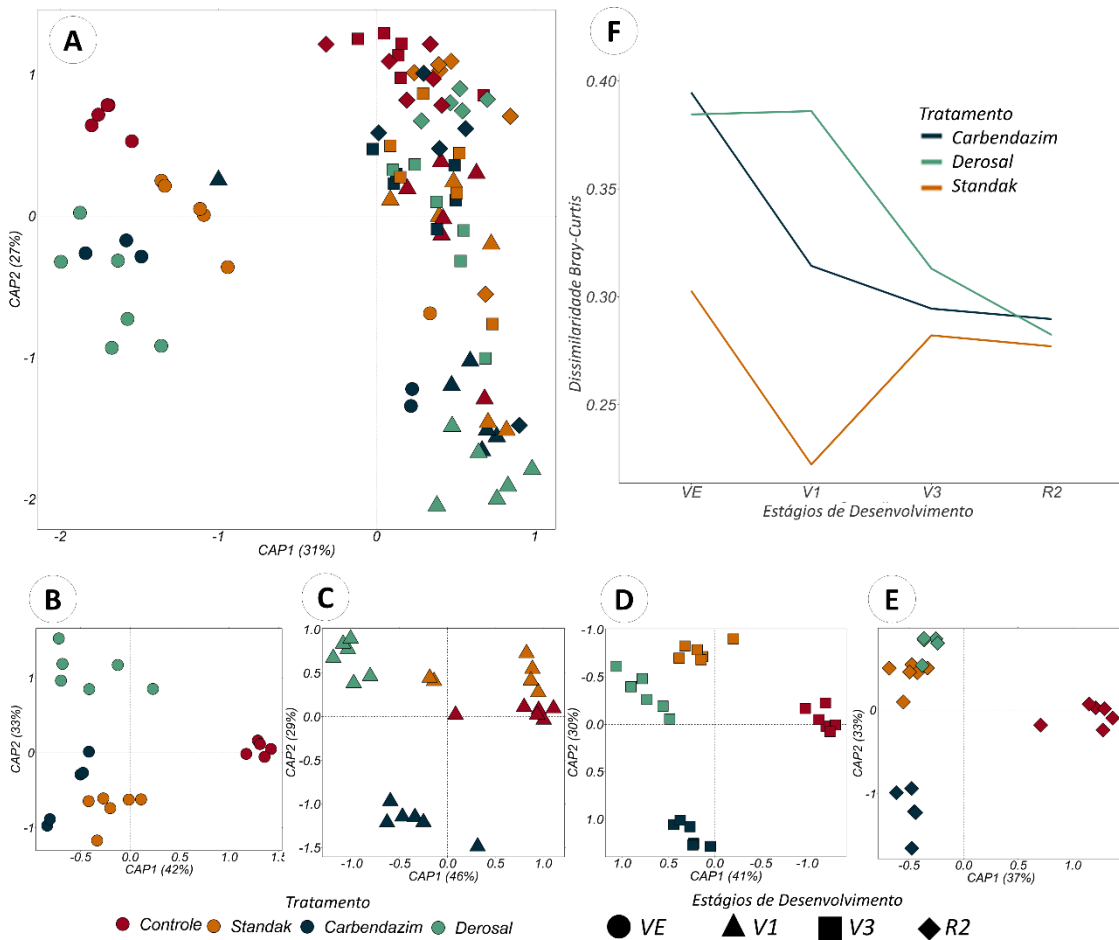


Figura 2. Estruturação da comunidade bacteriana ao longo do desenvolvimento da soja baseado em dissimilaridades de Bray-Curtis. A) Comunidade bacteriana da rizosfera tratadas com os pesticidas nos quatro estágios de desenvolvimento: emergência (VE), primeiro nó (V1), terceiro nó (V3) e florescimento pleno (R2). Comunidade bacteriana B) no estágio VE, C) no estágio V1, D) no estágio V3 e E) no estágio R2. F) Efeito geral dos pesticidas comparados ao tratamento controle.

Para as comunidades fúngicas, as mudanças devido à aplicação dos tratamentos não foram estatisticamente significativas quando os resultados foram analisados para as amostras da rizosfera de todos os estágios de desenvolvimento da soja ($R^2= 0,033$, $F_{3,74}=1,338$, $p= 0,122$) (Figura 3 A). No entanto, quando os dados foram particionados e analisados dentro de cada estágio de desenvolvimento, mudanças significativas foram encontradas no estágio V1 ($R^2= 0,223$, $F_{3,16}= 1,530$, $p=0,022$) (Figura 3 C), V3 ($R^2=0,202$, $F_{3,20}= 1,690$, $p=0,035$) (Figura 2 D) e R2 ($R^2=0,198$, $F_{3,20}=1,647$, $p=0,027$) (Figura 3 E), no estágio VE não foram encontradas diferenças significativas (Figura 3 B). O teste PERMIDIST também foi usado para verificar diferenças na dispersão em todos os estágios de desenvolvimento, o que confirmou que as diferenças entre as comunidades tratadas foram motivadas por diferenças de similaridade e não por diferenças de dispersão (Tabela S3).

O efeito geral dos pesticidas na comunidade fúngica da rizosfera está representado na figura 3 F, similar ao padrão observado para as comunidades bacterianas, os pesticidas Derosal® e Carbendazim Nortox®, que apresentam carbendazim em sua composição, apresentaram valores similares de dissimilaridades em relação ao controle especialmente nos estágios VE, V1 e R2. No entanto, diferentemente das comunidades bacterianas, as dissimilaridades da comunidade fúngica foram menores no estágio VE, aumentando nos estágios V1 e V3 para as comunidades tratadas com os pesticidas Carbendazim Nortox® e Standak®, reduzindo a dissimilaridade nos estágios V3 e R2 nas comunidades sob influência de todos os pesticidas aplicados (Figura 3 F).

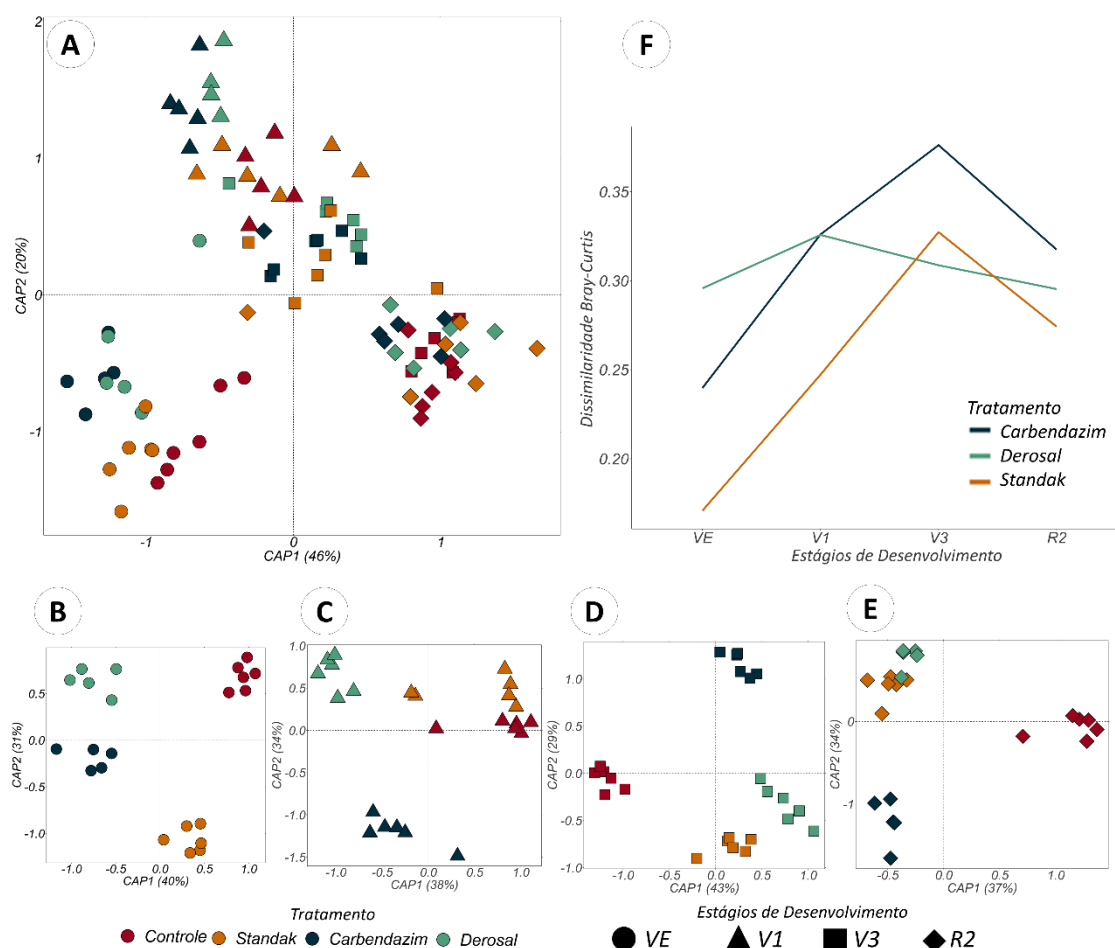


Figura 3. Estruturação da comunidade fúngica ao longo do desenvolvimento da soja baseado em dissimilaridades de Bray-Curtis. A) Comunidade fúngica da rizosfera tratadas com os pesticidas nos quatro estágios de desenvolvimento: emergência (VE), primeiro nó (V1), terceiro nó (V3) e florescimento pleno (R2). Comunidade fúngica B) no estágio VE, C) no estágio V1, D) no estágio V3 e E) no estágio R2. F) Efeito geral dos pesticidas comparados ao tratamento controle.

Para compreender melhor a influência dos tratamentos na formação das comunidades microbianas associadas à rizosfera sobre o desenvolvimento da soja, as diferenças de Bray-Curtis de cada tratamento foram comparadas graficamente entre os estágios VE e V1; V1 e V3, e V3 e R2. As comunidades bacterianas do controle tornaram-se mais semelhantes ao longo dos estágios sucessivos, o que ficou claro também para as comunidades influenciadas pelo tratamento com Derosal® e menos evidente para as comunidades tratadas com Carbendazim Nortox® e Standak® (Figura S2). Com relação às comunidades fúngicas, nas comunidades controle, a dissimilaridade entre os estágios V1 e V3 tenderam a aumentar, porém, diminuíram entre os estágios V3 e R2, enquanto nas comunidades influenciadas pelo Carbendazim Nortox®, as dissimilaridades aumentam ao longo dos estágios de desenvolvimento, e as dissimilaridades das comunidades sob influência dos pesticidas Derosal® e Standak® mostraram se mais estáveis ao longo dos estágios de desenvolvimento da soja (Figura S3).

Os efeitos dos tratamentos sobre a α -diversidade foram estatisticamente menos robustos, embora tenham sido observadas mudanças significativas para as comunidades bacterianas e fúngicas sob influência dos pesticidas (Figura 4), como a comunidade bacteriana tratada com Standak® que apresentou um índice de riqueza menor em comparação com o tratamento controle no estágio VE ($F_{3,18}=4.019$ $p= 0,024$) (Figura 4 A).

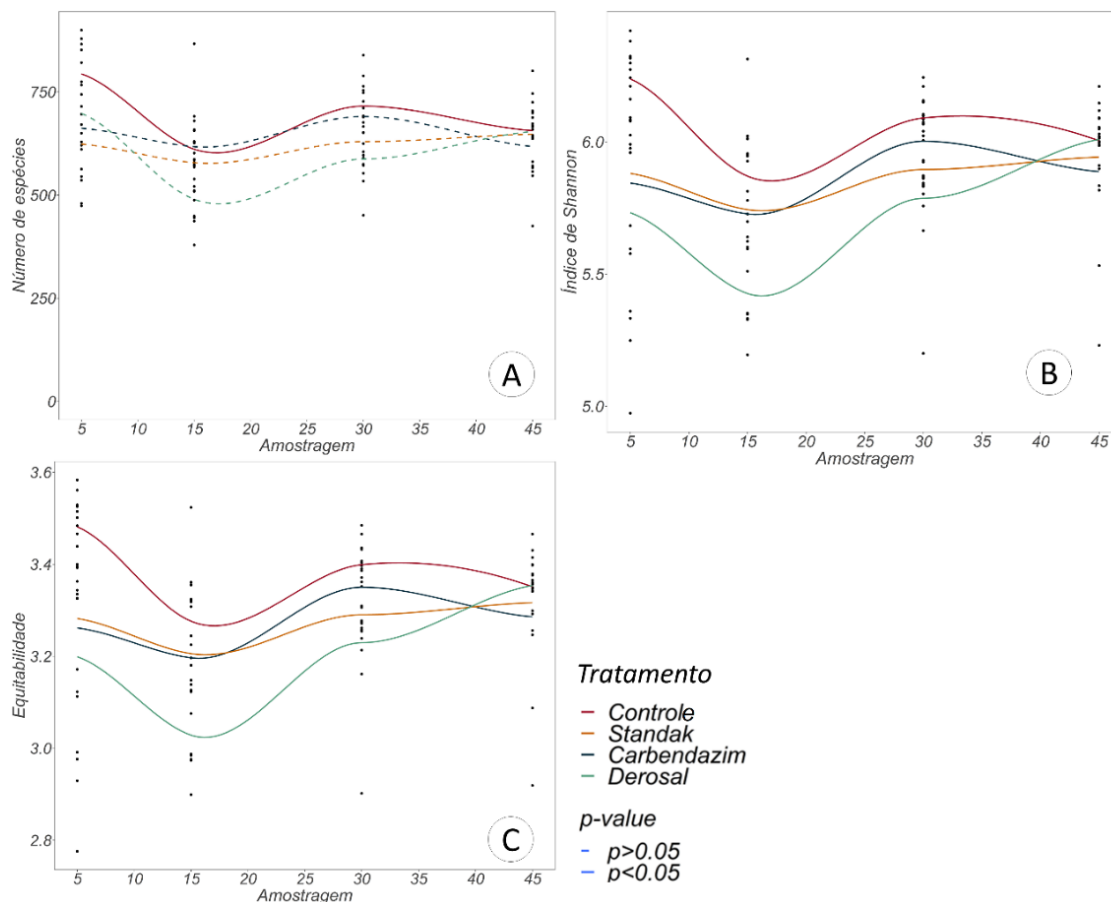


Figura 4. Métricas de α -diversidade para as comunidades bacterianas da rizosfera. A) Riqueza, B) Índice de Shannon e C) Equitabilidade.

Para as comunidades fúngicas, o tratamento Carbendazim Nortox® apresentou maiores valores de riqueza (Figura 5 A), H' (Figura 5 B) e equitabilidade (Figura 5 C) no estágio V3 em relação às comunidades controle, mas apresentou uma tendência de aumento da riqueza ao longo do tempo em relação à comunidade do tratamento controle e aquelas influenciadas pelo Standak®. Comunidades que tiveram a influência do pesticida Derosal® apresentaram maior estabilidade nos valores de riqueza ao longo dos estágios de desenvolvimento. Para o índice de Shannon e equitabilidade, plantas que foram tratadas e controle exibiram uma diminuição para ambas as métricas ao longo dos estágios de desenvolvimento da soja (Figura 5 A e 5 C).

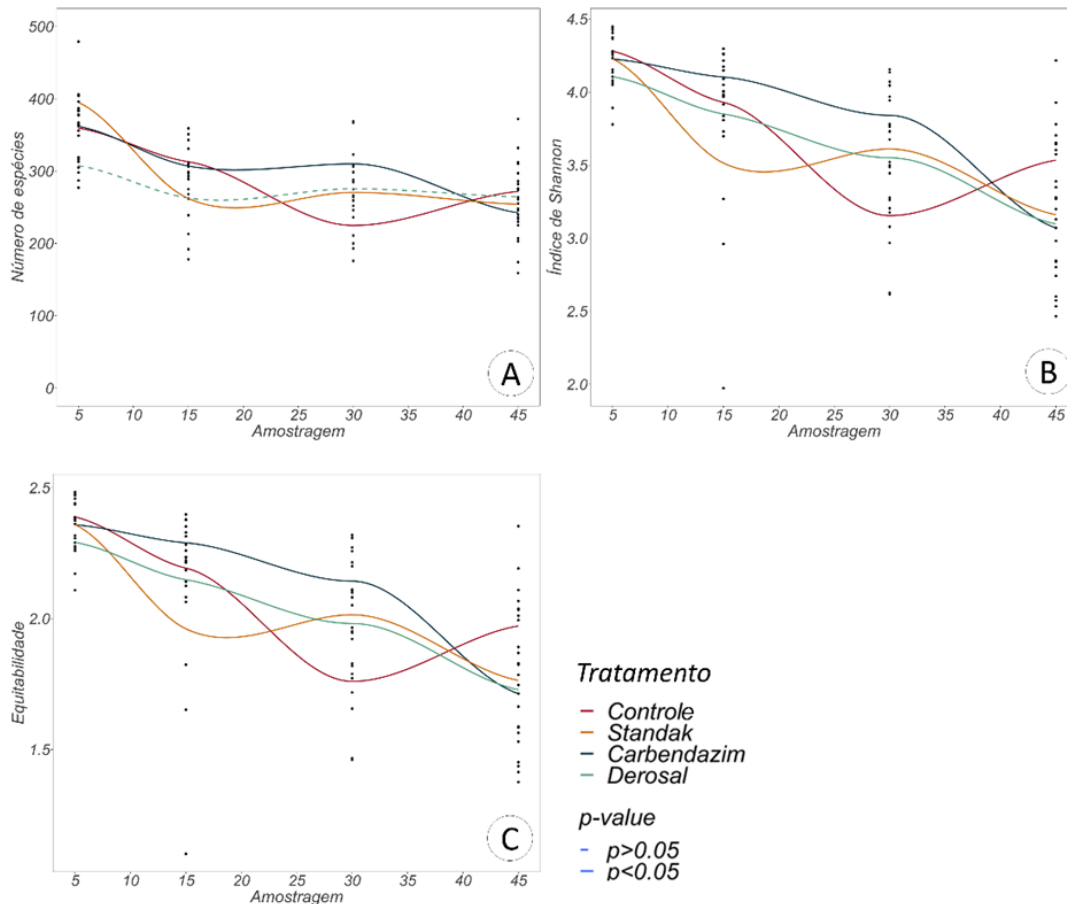


Figura 5. Métricas de α -diversidade para as comunidades fúngicas da rizosfera. A) Riqueza, B) Índice de Shannon e C) Equitabilidade.

4.3.3 Mudanças na composição do microbioma bacteriano da rizosfera sob influência de pesticidas de sementes

Para identificar quais famílias bacterianas contribuíram para as diferenças na composição bacteriana da rizosfera após os tratamentos das sementes com pesticidas, a análise do SIMPER identificou em cada estágio de desenvolvimento 64 táxons que direcionaram as diferenças na composição. No entanto, após a aplicação do modelo ANOVA, 10 táxons foram selecionados como significativos para o estágio VE, 6 para o estágio V1, 6 para o estágio V3 e 4 para o estágio R2. No estágio VE, Streptomycetaceae foi enriquecida no microbioma da rizosfera que teve influência de Carbendazim Nortox® e Sphingomonadaceae, Bryobacteraceae, Xanthomonadaceae foram favorecidas pelo tratamento Derosal®. As comunidades da rizosfera sob influência de Standak® apresentaram um enriquecimento da família Pyrinomonadaceae, enquanto as famílias Rhodanobacteraceae, Pedosphaeraceae, Micropepsaceae, Nitrosomonadaceae e Gemmatimonadaceae foram reduzidas nas comunidades bacterianas sob influência dos

três pesticidas (Figura 6 A). Foi observado no estágio V1 que as famílias Burkholderiaceae e Oxalobacteraceae foram favorecidos na comunidade de rizobactérias sob influência de Derosal[®], enquanto as famílias Rhizobiaceae e Xanthobacteraceae apresentaram abundância reduzida nas comunidades microbianas tratadas com Derosal[®] e Carbendazim Nortox[®]. No tratamento controle, as famílias Rhodanobacteraceae e Methylophilaceae apresentaram uma redução na abundância. No estágio V3, as famílias Gemmatimonadaceae e Nitrosomonadaceae foram enriquecidas em comunidades microbianas sob influência de Standak[®]. A família Sphingomonadaceae também foi favorecida nas comunidades rizosféricas sob influência dos pesticidas, enquanto as famílias Caulobacteraceae, Pedosphaeraceae, Micropepsaceae foram reduzidas em comunidades microbianas sob influência dos pesticidas de sementes. Na fase final de desenvolvimento, R2, a família Methylophilaceae foi enriquecida em comunidades sob influência dos pesticidas, e a família Caulobacteraceae foi particularmente enriquecida em comunidades sob influência do pesticida Derosal[®]. A família Pyrinomonadaceae apresentou um decréscimo sutil nas comunidades rizobacterianas tratadas com Carbendazim Nortox[®] e Standak[®], enquanto a família Sphingomonadaceae apresentou uma abundância menor nas comunidades sob influência dos pesticidas.

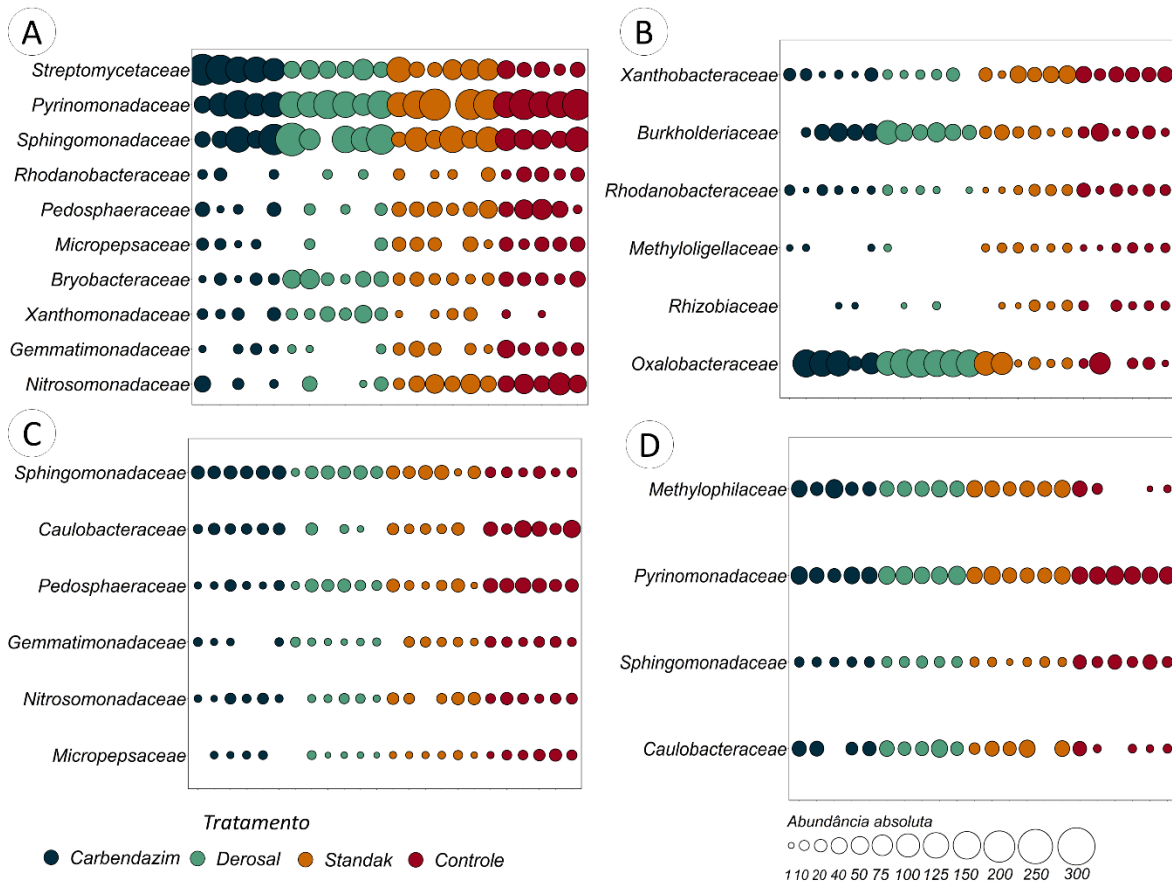


Figura 6. Abundância diferencial de táxons bacterianos selecionados pela análise de SIMPER seguido por ANOVA nos quatro estágios de desenvolvimento da soja: A) VE (emergência), B) V1 (primeiro nó), C) V3 (terceiro nó) e D) R2 (florescimento pleno).

4.3.4 Mudanças na composição do microbioma fúngico da rizosfera sob influência de pesticidas de sementes

A análise do SIMPER identificou em cada estágio de desenvolvimento 65 táxons fúngicos responsáveis pelas mudanças de composição das comunidades sob influência dos tratamentos. Os 10 grupos mais abundantes foram selecionados para a classificação utilizando o banco de dados FUNGuild. Os modos tróficos determinados por esse banco de dados estão representados na tabela 2. Nos estágios VE, V1 e V3 o tratamento Carbendazim Nortox® induziu uma maior abundância de grupos saprotróficos, enquanto no estágio R2 comunidades controles apresentaram maior abundância desse grupo. Nos estágios V3 e R2 o grupo simbiotrófico correspondente ao gênero *Claroideoglossum*, descrito como um fungo micorrízico arbuscular (AMF), foi mais abundante nas comunidades controle (Tabela 2). Os gêneros selecionados após as análises de SIMPER e

as guildas fúngicas a qual cada táxon corresponde estão apresentados nas tabelas S4 no material suplementar.

Tabela 2. Classificação utilizando o banco de dados FUNGuild dos modos tróficos dos táxons fúngicos selecionados pela análise de SIMPER em valores de abundância absoluta.

		Modos tróficos fúngicos					
		Média ± Desvio Padrão					
		Patotrófico-Saprotrófico	Patotrófico-Saprotrófico-Simbiotrófico	Saprotrófico	Saprotrófico-Simbiotrófico	Não classificado	
VE	Ctr	9,28± 5,23*	4,44± 0,86	4,74± 2,36	6,40± 0,83*	4,59± 0,61	
	Stdk	3,16± 4,51	4,65± 1,13	3,75± 1,91	4,25± 1,09	5,02± 1,26*	
	Carb	2,28± 2,43	4,93± 0,38*	7,24± 3,69*	4,08± 1,05	4,60± 0,93	
	Der	2,78± 4,42	4,15± 0,57	2,57± 1,55	3,13± 1,37	3,87± 0,71	
		Patotrófico-Saprotrófico-Simbiotrófico	Saprotrófico	Saprotrófico-Simbiotrófico	Não classificado		
V1	Ctr	4,87±1,44	2,77±3,49	3,41±0,66	3,26±0,62		
	Stdk	4,59±3,67	5,37±5,94	3,91±2,56	6,70±4,48*		
	Carb	5,85±1,66*	6,59±4,35*	8,38±3,38*	5,66±1,94		
	Der	4,72±1,11	5,25±1,83	4,39±1,46	3,79±1,09		
		Patotrófico-Saprotrófico	Patotrófico-Saprotrófico-Simbiotrófico	Saprotrófico	Saprotrófico-Simbiotrófico	Simbiotrófico (AMF)	Não classificado
V3	Ctr	15,93±18,59*	1,95±0,81	4,35±4,47	2,55±1,36	13,11±9,89*	7,15±4,00*
	Stdk	0,26±0,41	5,64±2,74*	2,66±4,36	4,36±3,87	3,56±8,72	2,71±0,77
	Carb	0,317±0,63	5,11±1,19	7,73±3,66*	4,85±1,72	0±0	4,33±2,17
	Der	0,16±0,30	3,98±2,58	1,93±1,76	4,91±4,26*	0±0	2,47±0,97
		Patotrófico-Saprotrófico	Patotrófico-Saprotrófico-Simbiotrófico	Saprotrófico	Saprotrófico-Simbiotrófico	Simbiotrófico (AMF)	não classificado
R2	Ctr	2,30±5,54	5,25±1,88*	15,22±28,17*	5,49±2,72*	6,19±5,16*	3,96±0,97
	Stdk	2,66±4,49	3,82±3,47	0,56±0,56	3,98±4,03	2,65±1,97	4,56±0,56
	Carb	11,23±26,98*	4,72±2,23	0,37±0,71	3,75±2,30	3,04±3,11	3,54±1,16
	Der	0,48±0,55	2,88±1,30	0,51±0,21	3,45±1,89	4,79±3,24	4,62±1,45*

Legenda: Ctr(Controle), Stdk (Standak), Carb (carbendazim) e Der (Derosal) *Correspondem ao tratamento em que o modo trófico apresentou abundância diferencial significativa.

4.4 Discussão

O presente estudo indica que pesticidas aplicados profilaticamente às sementes de soja podem atuar na montagem do microbioma da rizosfera nos estágios iniciais de desenvolvimento da soja, e esse efeito pode permanecer pelo menos até 45 dias após o plantio, para ambas as comunidades fúngicas e até 30 dias para as comunidades bacterianas. As mudanças observadas nas comunidades fúngicas estão alinhadas com os resultados de um estudo anterior, que relatou mudanças significativas na estrutura das comunidades fúngicas na rizosfera da soja influenciadas pela mistura de fungicidas e

inseticidas usados como tratamento de sementes (Nettles et al., 2016). No entanto, em contraste com os resultados obtidos no presente trabalho, este estudo não encontrou modificações significativas nas comunidades de rizobactérias de plantas de soja, embora mudanças significativas tenham sido encontradas para a comunidade bacteriana da rizosfera de milho, indicando o potencial efeito de pesticidas de sementes nessas comunidades.

Os efeitos dos pesticidas nas comunidades bacterianas relatados no presente estudo seguem os resultados da literatura existente, que relatou efeitos nas comunidades bacterianas do solo após a aplicação de fungicidas (Shao e Zhang, 2017; Zhang et al., 2019) e inseticidas (Cycoń e Piotrowska-Seget, 2015). Alguns desses estudos vêm considerando mudanças na estrutura da comunidade bacteriana como consequência do aumento da densidade de bactérias degradadoras de pesticidas. Nesse trabalho, foram encontrados grupos apontados pela literatura como degradadores de pesticidas, entre os grupos indicados pela análise de SIMPER como impulsionadores de diferenças nas comunidades bacterianas. No estágio VE, o gênero *Streptomyces* apresentou um aumento na comunidade da rizosfera influenciada pela aplicação de Carbenidazim Nortox®, e *Sphingomonas* foi enriquecido nas comunidades sob influência de Carbenidazim Nortox® e Derosal®. Ambos os gêneros foram relatados como capazes de degradar o fungicida carbenidazim presente na formulação desses dois fungicidas citados (Singh et al., 2019; Streletskii et al., 2022). O gênero *Gemmatimonas*, enriquecido na comunidade de rizobactérias em V3 sob exposição Standak®, foi relatado estimulando aumento da frequência em comunidades bacterianas de solos fluvo-aquicos sob influência de piraclostrobina (Zhang et al., 2019), fungicida presente na composição deste pesticida comercial.

Além disso, o presente estudo investigou as diferenças entre as trajetórias das comunidades bacterianas e fúngicas da rizosfera da soja sob influência de pesticidas de sementes. Analisando o efeito geral do tratamento de sementes no desenvolvimento da soja para ambas as comunidades da rizosfera, o efeito do tratamento foi evidente para as comunidades bacterianas, enquanto a influência do crescimento da soja nas comunidades fúngicas foi mais proeminente do que a influência do tratamento, sendo os efeitos do tratamento de sementes evidentes quando os dados foram analisados separadamente, dentro de cada estágio de desenvolvimento. Este resultado diferiu do esperado, uma vez que a hipótese era que as modificações nas comunidades fúngicas

seriam mais evidentes devido à presença de fungicida nos tratamentos de sementes. Sendo assim, especula-se que o resultado observado se deve à seleção imposta pelos rizodepósitos, mais proeminente para a comunidade fúngica que para a comunidade bacteriana durante o desenvolvimento da soja, conforme relatado em um estudo anterior (Moroenyane et al., 2021). Considerando esse cenário, a influência da exsudação radicular sobrepõe os efeitos dos pesticidas de sementes nas comunidades fúngicas, tornando menos evidente a modificação na estrutura das comunidades fúngicas da rizosfera sob influência dos pesticidas avaliados.

Analisando a diversidade β também foram reveladas diferenças nas trajetórias das comunidades fúngicas e bacterianas da rizosfera da soja. Mudanças na β -diversidade das comunidades fúngicas iniciaram em V1, enquanto para as comunidades bacterianas mudanças foram observadas no estágio de emergência (VE) e permaneceram até o estágio V3. Outros parâmetros também mostraram diferenças proeminentes nas comunidades de rizobactérias nos estágios VE e V1. A distância entre os centróides calculada pelas dissimilaridades de Bray-Curtis mostrou que as comunidades tratadas com Carbendazim Nortox® e Derosal® estavam mais distantes das comunidades controle nesses estágios. Em relação às comunidades fúngicas, as dissimilaridades entre as comunidades tratadas com Derosal® foram maiores no estágio V1, enquanto as comunidades sob influência de Carbendazim Nortox® e Standak® apresentaram maior dissimilaridade com o controle no estágio V3. Esses resultados estão alinhados com a hipótese inicial de que as diferenças na estrutura da comunidade microbiana seriam mais proeminentes nos estágios iniciais, no entanto, para as comunidades bacterianas, essas diferenças começaram primeiro sendo mais evidentes do que as comunidades fúngicas nos estágios VE e V1.

Foram mensuradas a massa seca de raízes e a parte aérea ao longo do crescimento da soja para testar se o tratamento das sementes poderia impactar no desenvolvimento das plantas. O presente estudo não mostrou diferenças entre plantas de sementes tratadas e não tratadas, esse resultado pode ser discutido em dois aspectos distintos. Em primeiro lugar, a nodulação de bactérias fixadoras de nitrogênio e a colonização de fungos micorrízicos arbusculares não apresentaram diminuição nas raízes de soja sob influência dos tratamentos de sementes. No entanto, dados do SIMPER classificados pelas guildas fúngicas sugeriu que a rizosfera do tratamento controle

apresentou abundância maior de fungos micorrízicos arbusculares nos estágios V3 e V4 que a rizosfera sob influência dos pesticidas. Estudos anteriores reportaram efeitos inibitórios do fungicida carbendazim em fungos micorrízicos arbusculares (Jakobsen et al., 2021; Welc et al., 2010), sendo que esse fungicida é utilizado para suprimir as comunidades de AMF, sendo empregado, por exemplo, para criar um tratamento negativo para avaliar os efeitos da supressão dessa comunidade em plantas (Dostálek et al., 2013; Raya-Hernández et al., 2020). Embora os dados de sequenciamento apontam para uma inibição de AMF nas raízes que tiveram a influência dos pesticidas de sementes, não observamos prejuízo no desenvolvimento da soja que pudesse ser atribuído à falta de simbiose benéfica com os fungos micorrízicos.

Um segundo ponto que deve ser considerado é que as plantas do tratamento controle não apresentaram doenças causadas por patógenos de solo ou pragas do solo, portanto, a produção de raízes e parte aérea nessas plantas foi semelhante às plantas que tiveram as sementes tratadas com pesticidas. Essa observação pode indicar uma menor ou inexistência de patógenos e pragas de solo naquela área, o que sugere que avaliações de risco baseadas nas condições abióticas e principalmente na incidência de doenças de solo nas áreas agrícolas poderiam reduzir o uso de pesticidas de sementes (Ayesha et al., 2021; Lamichhane et al., 2020). Além disso, a identificação de gêneros de patógenos que ocorrem na área poderia ajudar na escolha de fungicidas específicos para controlar esses patógenos e, conseqüentemente, reduzir a aplicação de fungicidas dispensáveis (Lamichhane et al., 2020).

Embora o impacto dos tratamentos de sementes nas comunidades microbianas tenha sido mostrado anteriormente (Nettles et al., 2016), no presente estudo esses efeitos foram explorados em quatro estágios de desenvolvimento da soja sendo identificado grupos responsáveis por conduzir as diferenças de composição nas comunidades fúngicas e bacterianas da rizosfera após a exposição aos tratamentos de sementes. Alterações na estrutura, principalmente em comunidades bacterianas, podem ocorrer pela supressão de grupos bacterianos, também pelo aumento da frequência de potenciais degradadores de pesticidas, como sugerido pelo enriquecimento desses grupos na rizosfera sob influência de pesticidas de sementes. Especula-se que essas alterações poderiam ocorrer também devido a impactos na espermosfera, afetando a transmissão horizontal desta comunidade para a rizosfera. Além disso, distúrbios na transmissão vertical podem ocorrer, pois as sementes servem como inóculo microbiano

para a comunidade da rizosfera, e a montagem nesta interface pode ser alterada após o tratamento com pesticidas. (Vasanthakumari et al., 2019).

Concluindo, os resultados do presente trabalho demonstraram que os tratamentos de sementes com pesticidas ocasionam alterações na estruturação na comunidade bacteriana e fúngica na rizosfera de soja nos estágios iniciais da planta e que essas alterações afetaram a sucessão dessas comunidades ao longo do crescimento da soja, evidenciado pelas mudanças observadas na estrutura bacteriana até os 45 dias após o plantio. Os tratamentos também aumentaram a abundância de alguns táxons que são potenciais degradadores dos pesticidas aplicados e reduziram a abundância do táxon ligado aos fungos micorrízicos arbusculares. Embora os tratamentos não demonstraram efeitos negativos no desenvolvimento das plantas ao longo do experimento, corroborados pelas análises fenotípicas, os resultados significativos na estruturação das comunidades microbianas evidenciam a importância de explorar se essas modificações alteraram significativamente as funções de microrganismos que possuem interação benéficas com as plantas, em futuros experimentos em que incluam análises que possibilitam acessar as funções dos microrganismos presentes na rizosfera.

Referências

- Adam, E., Bernhart, M., Müller, H., Winkler, J., Berg, G., 2018. The Cucurbita pepo seed microbiome: genotype-specific composition and implications for breeding. *Plant Soil* 422, 35–49. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3113-9>
- Ayesha, M.S., Suryanarayanan, T.S., Nataraja, K.N., Prasad, S.R., Shaanker, R.U., 2021. Seed Treatment With Systemic Fungicides: Time for Review. *Front. Plant Sci.* 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.654512>
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Chaparro, J.M., Badri, D. V., Vivanco, J.M., 2014. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *ISME J.* 8, 790–803. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.196>
- Chen, X., Krug, L., Yang, M., Berg, G., Cernava, T., 2020. Conventional seed coating reduces prevalence of proteobacterial endophytes in *Nicotiana tabacum*. *Ind. Crops Prod.* 155, 112784. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112784>
- Clarke, K.R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Aust. J. Ecol.* 18, 117–143. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1993.tb00438.x>

- Cycoń, M., Piotrowska-Seget, Z., 2015. Biochemical and microbial soil functioning after application of the insecticide imidacloprid. *J. Environ. Sci.* 27, 147–158. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.05.034>
- Ding, H., Zheng, X., Zhang, J., Zhang, Y., Yu, J., Chen, D., 2019. Influence of chlorothalonil and carbendazim fungicides on the transformation processes of urea nitrogen and related microbial populations in soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 31133–31141. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06213-8>
- Dostálek, T., Pánková, H., Münzbergová, Z., Rydlová, J., 2013. The effect of AMF suppression on plant species composition in a nutrient-poor dry grassland. *PLoS One* 8, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080535>
- Gao, S., Liu, Y., Jiang, J., Li, X., Ye, F., Fu, Y., Zhao, L., 2021. Thiram/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex electrospun nanofibers for a fast dissolving water-based drug delivery system. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 201, 111625. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111625>
- Gardes, M., Bruns, T.D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-- application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2, 113–118. <https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.1993.TB00005.X>
- Itoh, H., Hori, T., Sato, Y., Nagayama, A., Tago, K., Hayatsu, M., Kikuchi, Y., 2018. Infection dynamics of insecticide-degrading symbionts from soil to insects in response to insecticide spraying. *ISME J.* 12, 909–920. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0021-9>
- Jakobsen, I., Murmann, L.M., Rosendahl, S., 2021. Hormetic responses to fungicides in arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 159, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108299>
- Kazda, J., Baranyk, P., Nerad, D., 2005. The implication of seed treatment of winter oilseed rape. *Plant, Soil Environ.* 51, 403–409. <https://doi.org/10.17221/3604-pse>
- Kindt, R., 2022. BiodiversityR: Package for Community Ecology and Suitability Analysis. R Packag. ed Version 2.14-1.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 41. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Lamichhane, J.R., You, M.P., Laudinot, V., Barbetti, M.J., Aubertot, J.N., 2020. Revisiting sustainability of fungicide seed treatments for field crops. *Plant Dis.* 104, 610–623. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1157-FE>
- Li, Y., An, J., Dang, Z., Lv, H., Pan, W., Gao, Z., 2018. Treating wheat seeds with neonicotinoid insecticides does not harm the rhizosphere microbial community. *PLoS One* 13, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205200>
- Madakka, M., Jayaraju, N., Rangaswamy, V., 2017. Changes in the metabolic activities of two agricultural soils as influenced by the pesticides and insecticides combination. *Appl. Soil Ecol.* 120, 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.07.037>

- Malhat, F., Abdallah, O., Ahmed, F., Salam, S.A., Anagnostopoulos, C., Ahmed, M.T., 2021. Dissipation behavior of thiophanate-methyl in strawberry under open field condition in Egypt and consumer risk assessment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 1029–1039. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10186-4>
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Mendes, R., Garbeva, P., Raaijmakers, J.M., 2013. The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 634–663. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>
- Moroenyane, I., Tremblay, J., Yergeau, É., 2021. Temporal and spatial interactions modulate the soybean microbiome. *FEMS Microbiol. Ecol.* 97, 1–12. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa206>
- Munoz-Ucros, J., Zwetsloot, M.J., Cuellar-Gempeler, C., Bauerle, T.L., 2021. Spatiotemporal patterns of rhizosphere microbiome assembly: From ecological theory to agricultural application. *J. Appl. Ecol.* 58, 894–904. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13850>
- Nettles, R., Watkins, J., Ricks, K., Boyer, M., Licht, M., Atwood, L.W., Peoples, M., Smith, R.G., Mortensen, D.A., Koide, R.T., 2016. Influence of pesticide seed treatments on rhizosphere fungal and bacterial communities and leaf fungal endophyte communities in maize and soybean. *Appl. Soil Ecol.* 102, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.02.008>
- Nguyen, N.H., Song, Z., Bates, S.T., Branco, S., Tedersoo, L., Menke, J., Schilling, J.S., Kennedy, P.G., 2016. FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecol.* 20, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.06.006>
- Oksanen, A.J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mcglinn, D., Minchin, P.R., Hara, R.B.O., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., 2020. *Vegan: Community Ecology Package* Version, in: *R Package ed Version 2.0-4*. Springer Netherlands, Dordrecht, p. 2395–2396. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1179-9_301576
- Parizadeh, M., Mimee, B., Kembel, S.W., 2021. Neonicotinoid Seed Treatments Have Significant Non-target Effects on Phyllosphere and Soil Bacterial Communities. *Front. Microbiol.* 11, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.619827>
- Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., Van Der Putten, W.H., 2013. Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>
- Raij, B. van;, Andrade, J.C. de; Cantarella, H., Quaggio, J.A., 2001. Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. Instituto Agronômico, Campinas.
- Raveton, M., Aajoud, A., Willison, J., Cherifi, M., Tissut, M., Ravanel, P., 2007. Soil distribution of fipronil and its metabolites originating from a seed-coated formulation. *Chemosphere* 69, 1124–1129. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.03.063>

- Raya-Hernández, A.I., Jaramillo-López, P.F., López-Carmona, D.A., Díaz, T., Carrera-Valtierra, J.A., Larsen, J., 2020. Field evidence for maize-mycorrhiza interactions in agroecosystems with low and high P soils under mineral and organic fertilization. *Appl. Soil Ecol.* 149, 103511. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103511>
- Shao, H., Zhang, Y., 2017. Non-target effects on soil microbial parameters of the synthetic pesticide carbendazim with the biopesticides cantharidin and norcantharidin. *Sci. Rep.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05923-8>
- Sim, J.X.F., Doolette, C.L., Vasileiadis, S., Drigo, B., Wyrsch, E.R., Djordjevic, S.P., Donner, E., Karpouzas, D.G., Lombi, E., 2022. Pesticide effects on nitrogen cycle related microbial functions and community composition. *Sci. Total Environ.* 807, 150734. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150734>
- Singh, Simranjeet, Kumar, V., Singh, Satyender, Singh, J., 2019. Influence of humic acid, iron and copper on microbial degradation of fungicide Carbendazim. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 20, 101196. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101196>
- Streletskii, R., Astaykina, A., Krasnov, G., Gorbatov, V., 2022. Changes in Bacterial and Fungal Community of Soil under Treatment of Pesticides. *Agronomy* 12, 1–23. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010124>
- Vasanthakumari, M.M., Shridhar, J., Madhura, R.J., Nandhitha, M., Kasthuri, C., Janardhana, B., Nataraja, K.N., Ravikanth, G., Uma Shaanker, R., 2019. Role of endophytes in early seedling growth of plants: a test using systemic fungicide seed treatment. *Plant Physiol. Reports* 24, 86–95. <https://doi.org/10.1007/s40502-018-0404-6>
- Vierheilig, H., Coughlan, A.P., Wyss, U., Piché, Y., 1998. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/aem.64.12.5004-5007.1998>
- Welc, M., Ravnskov, S., Kieliszewska-Rokicka, B., Larsen, J., 2010. Suppression of other soil microorganisms by mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in root-free soil. *Soil Biol. Biochem.* 42, 1534–1540. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.05.024>
- White, K.E., Hoppin, J.A., 2004. Seed treatment and its implication for fungicide exposure assessment. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 14, 195–203. <https://doi.org/10.1038/sj.jea.7500312>
- Wickham H, 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*, Springer-Verlag New York.
- Xu, Y., Wang, G., Jin, J., Liu, J., Zhang, Q., Liu, X., 2009. Bacterial communities in soybean rhizosphere in response to soil type, soybean genotype, and their growth stage. *Soil Biol. Biochem.* 41, 919–925. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.10.027>
- Yan, H., Wang, D., Dong, B., Tang, F., Wang, B., Fang, H., Yu, Y., 2011. Dissipation of carbendazim and chloramphenicol alone and in combination and their effects on soil fungal:Bacterial ratios and soil enzyme activities. *Chemosphere* 84, 634–641. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.038>
- Zhang, C., Wang, Jun, Zhang, S., Zhu, L., Du, Z., Wang, Jinhua, 2017. Acute and subchronic toxicity of pyraclostrobin in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 188, 510–516. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.025>

Zhang, C., Zhou, T., Zhu, L., Juhasz, A., Du, Z., Li, B., Wang, Jun, Wang, Jinhua, Sun, Y., 2019. Response of soil microbes after direct contact with pyraclostrobin in fluvo-aquic soil. *Environ. Pollut.* 255, 113164. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113164>

Material suplementar capítulo 4

Tabela S1. Propriedades físico-químicas do solo utilizado no experimento.

Parâmetros químicos	Solo
pH (CaCl ₂)	4,7
Matéria Orgânica (g.dm ⁻³)	11
Enxofre (mg.dm ⁻³)	<8
Fósforo(mg.dm ⁻³)	15
Potássio (mmolc.dm ⁻³)	1,1
Cálcio (mmolc.dm ⁻³)	16
Magnésio (mmolc.dm ⁻³)	7
Alumínio (mmolc.dm ⁻³)	1
Saturação de bases (mmolc.dm ⁻³)	24,1
V%	52
m%	4
Boro (mg.dm ⁻³)	<0.12
Cobre (mg.dm ⁻³)	1,1
Ferro (mg.dm ⁻³)	34
Manganês (mg.dm ⁻³)	17,1
Zinco (mg.dm ⁻³)	3,5
Estrutura física do solo	Solo
Areia (g kg ⁻¹)	775
Silte (g kg ⁻¹)	15
Argila (g kg ⁻¹)	210

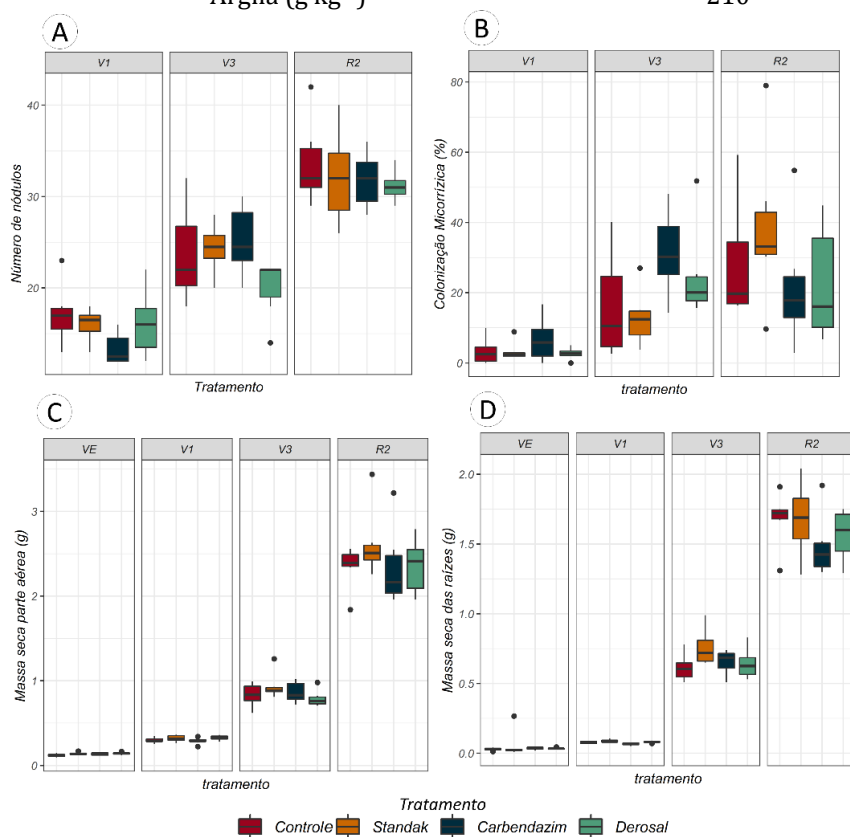


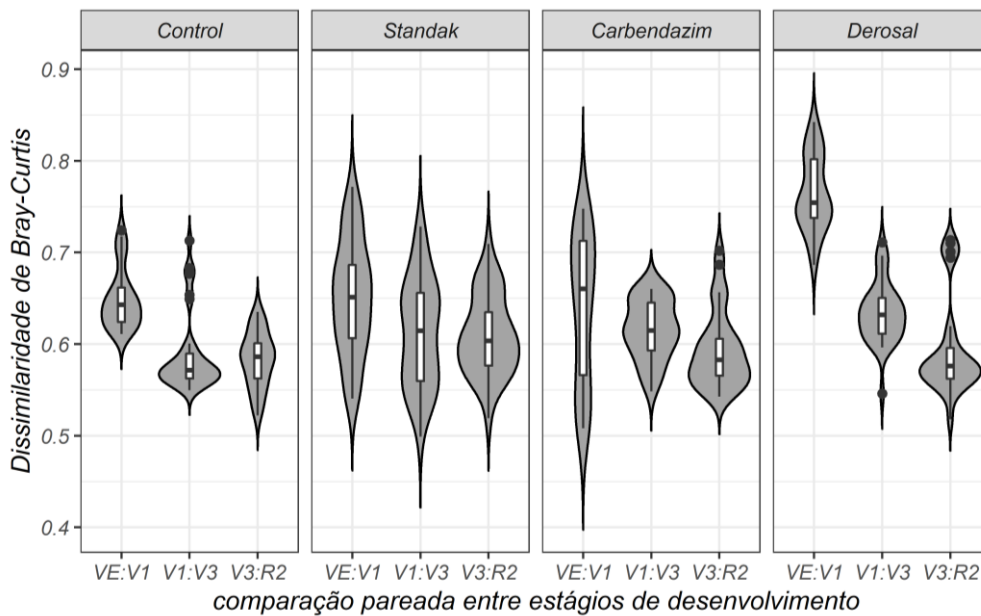
Figura S1. Atributos fenotípicos mensurados ao longo do experimento. A) Nodulação, B) Colonização Micorrízica, C) Massa Seca parte Aérea e D) Massa seca das raízes.

Tabela S2. Resultados de PERMIDISP para as comunidades bacterianas.

		Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
VE, V1, V3 e R2	Tratamento	3	0,026351668	0,0087839	3,913614	0,0112872
	Total	88	0,197511114	0,0022444		
VE	Tratamento	3	0,023909149	0,0079697	2,0653825	0,1407025
	Total	18	0,069456819	0,0038587		
V1	Tratamento	3	0,009337851	0,0031126	0,8406315	0,487577
	Total	20	0,074054251	0,0037027		
V3	Tratamento	3	0,012031515	0,0040105	2,1622363	0,1242905
	Total	20	0,0370959	0,0018548		
R2	Tratamento	3	0,006698765	0,0022329	0,6773132	0,577192
	Total	18	0,059341223	0,0032967		

Tabela S3. Resultados de PERMIDISP para as comunidades fúngicas

		Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
VE, V1, V3 e R2	Tratamento	3	0,012951	0,004317	0,784536	0,505777
	Total	86	0,473217	0,005503		
VE	Tratamento	3	0,027086	0,009029	2,187344	0,124814
	Total	18	0,074298	0,004128		
V1	Tratamento	3	0,057488	0,019163	2,365871	0,109318
	Total	16	0,129594	0,0081		
V3	Tratamento	3	0,021446	0,007149	0,835212	0,49031
	Total	20	0,171185	0,008559		
R2	Tratamento	3	0,050503	0,016834	1,172904	0,344928
	Total	20	0,287054	0,014353		

**Figura S2.** Comparação das distâncias de Bray-Curtis entre os estágios subsequentes de desenvolvimento da soja para a comunidade bacteriana da rizosfera de soja sob influência de cada um dos pesticidas e tratamento controle.

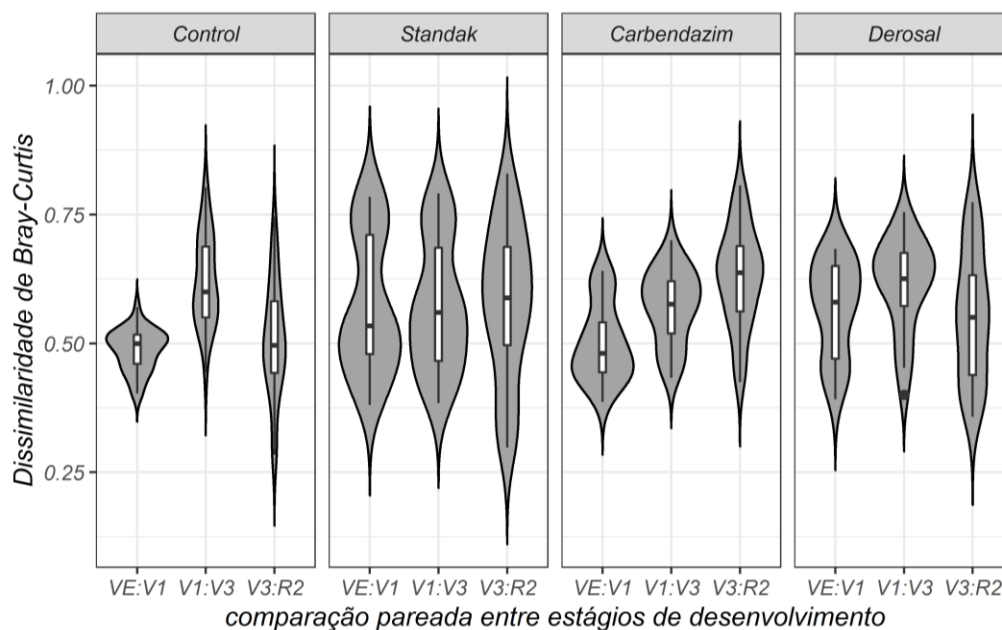


Figura S3. Comparação das distâncias de Bray-Curtis entre os estágios subsequentes de desenvolvimento da soja para a comunidade fúngica da rizosfera de soja sob influência de cada um dos pesticidas e tratamento controle.

Tabela S4. Classificação utilizando o banco de dados FUNGuild das guildas fúngicas para cada uma das 10 famílias fúngicas selecionadas pela análise de SIMPER.

Guildas Tróficas	Gênero Fúngico	Tratamentos				
		Estágio de emergência (VE)	Ctr	Stdk	Carb	Der
Saprotrófico indefinido	Cercophora		4,23+5,66	3,99+3,24	9,11+8,81*	1,02+2,27
Não classificado	Condenascus		4,41+1,10	5,32+1,52*	4,63+1,50	3,70+1,18
Patógeno Animal-Parasita Fúngico-Saprotrófico indefinido	Exophiala		9,28+5,23*	3,15+4,51	2,28+2,43	2,79+4,42
Patógeno Animal-Endofítico-Parasita Fúngico-Líquén Parasita-Patógeno de Planta- Saprotrófico de madeira	Fusicolla		4,38+1,78	3,75+2,00	4,76+0,97	5,46+1,40*
Patógeno Animal-Endofítico-Parasita Fúngico-Líquén Parasita-Patógeno de Planta- Saprotrófico de madeira	Gibberella		4,44+1,61	5,31+2,48*	3,76+1,28	4,54+1,52
Endofítico-Saprotrófico de serrapilheira-Saprotrófico de solo-Saprotrófico indefinido	Mortierella		6,40+0,83*	4,25+1,09	4,08+1,05	3,13+1,37
Patógeno Animal-Endofítico-Parasita Fúngico-Líquén Parasita-Patógeno de Planta- Saprotrófico de madeira	Neocosmospora		4,75+0,56	4,61+0,63	5,14+0,75*	3,63+0,60
Saprotrófico indefinido	Talaromyces		2,23+2,74	4,25+3,62	9,40+3,25	2,82+3,50
Patógeno de animal-Endofítico-Epifítico-Parasita de fungo-Patógeno de planta-Saprotrófico de madeira	Trichoderma		4,20+1,68	4,94+1,33	6,04+2,28*	2,98+1,13
Saprotrófico de esterco-Saprotrófico de planta	Westerdykella		7,75+4,39*	3,01+2,75	3,20+1,96	3,88+2,34

Estágio de primeiro Nó (V1)		Ctr	Stdk	Carb	Der
Saprotrófico indefinido	Cercophora	4,05+9,07	4,56+8,00	8,37+5,38*	2,62+5,23
Não classificado	Condenascus	1,76+0,55	9,08+10,70*	4,90+5,53	3,046+1,32
Patógeno Animal-Endofítico-Parasita Fúngico-Líquén Parasita-Patógeno de Planta- Saprotrófico de madeira	Fusicolla	4,52+1,43	4,87+4,21	5,92+2,44*	4,65+0,85
Patógeno Animal-Endofítico-Parasita Fúngico-Líquén Parasita-Patógeno de Planta- Saprotrófico de madeira	Gibberella	5,82+4,42	4,29+4,16	6,15+2,01*	3,61+1
Endofítico-Saprotrófico de serrapilheira-Saprotrófico de solo-Saprotrófico indefinido	Mortierella	3,41+0,66	3,91+2,56	8,38+3,38*	4,39+1,46
Patógeno Animal-Endofítico-Parasita Fúngico-Líquén Parasita-Patógeno de Planta- Saprotrófico de madeira	Neocosmospora	3,32+0,88	3,97+3,20	7,10+2,23*	6,02+1,51
Saprotrófico indefinido	Nigrospora	1,26+1,28	5,48+6,59	2,03+4,10	12,67+7,89*
Não classificado	Saitozyma	4,76+1,11	4,33+2,65	6,42+2,02*	4,54+2,96
Animal Pathogen-Endophyte-Epiphyte-Fungal Parasite-Plant Pathogen-Wood Saprotrroph	Trichoderma	5,81+1,40*	5,25+3,86	4,22+2,48	4,60+3,10
Saprotrófico de esterco-Saprotrófico de planta	Westerdykella	3,45+2,88	6,04+7,34	9,38+8,82*	0,47+0,94
Estágio de terceiro nó (V3)		Ctr	Stdk	Carb	Der
Fungo parasita-Saprotrófico de solo-Saprotrófico indefinido- Saprotrófico de madeira	Albifimbria	15,93+18,59*	0,25+0,41	0,32+0,63	0,16+0,30
Saprotrófico indefinido	Atractiella	4,35+4,47	2,66+4,36	7,73+3,66*	1,93+1,76
Micorríza arbuscular	Claroideoglo mus	13,11+9,90*	3,56+8,72	0+0	0+0
Não classificado	Condenascus	7,10+1,17*	3,63+3,67	2,45+2,01	3,50+2,37
Patógeno Animal-Endofítico-Parasita Fúngico-Líquén Parasita-Patógeno de Planta- Saprotrófico de madeira	Fusicolla	1,75+1,04	5,08+2,80	6,36+1,75*	3,45+2,11
Patógeno Animal-Endofítico-Parasita Fúngico-Líquén Parasita-Patógeno de Planta- Saprotrófico de madeira	Gibberella	1,84+0,813	5,97+3	4,47+1,18	4,39+3,41*
Endofítico-Saprotrófico de serrapilheira-Saprotrófico de solo-Saprotrófico indefinido	Mortierella	2,55+1,36	4,36+3,87	4,85+1,72	4,91+4,26*
Patógeno Animal-Endofítico-Parasita Fúngico-Líquén Parasita-Patógeno de Planta- Saprotrófico de madeira	Neocosmospora	2,18+0,55	4,81+2,08	4,81+1,23	4,86+3,50*
Não classificado	Saitozyma	2,63+1,54	4,50+1,67	5,95+2,44*	3,59+2,16
Patógeno Animal-Endofítico -Epifítico-Parasita de fungo- Patógeno de Planta-Saprotrófico de madeira	Trichoderma	2,01+1,31	6,70+6,06*	4,76+1,68	3,21+1,49
Estágio de florescência plena (R2)		Ctr	Stdk	Carb	Der
Parasita de fungo- Saprotrófico de solo - Saprotrófico indefinido- Saprotrófico de madeira	Albifimbria	2,30+5,54	2,66+4,49	11,23+26,98*	0,48+0,55
Saprotrófico indefinido	Atractiella	15,22+28,17*	0,56+0,56	0,37+0,71	0,51+0,21
Micorríza arbuscular	Claroideoglo mus	6,19+5,16*	2,65+1,97	3,04+3,11	4,79+3,24
Não classificado	Condenascus	2,75+2,04	4,98+2,29	3,47+2,34	5,46+1,33*
Patógeno Animal-Endofítico-Parasita Fúngico-Líquén Parasita-Patógeno de Planta- Saprotrófico de madeira	Fusicolla	6,44+3,34*	3,08+1,38	3,91+1,88	3,24+1,85

Patógeno Animal-Endofítico-Parasita Fúngico-Líquén Parasita-Patógeno de Planta- Saprotrófico de madeira	Gibberella	5,10+1,60*	4,53+5,61	3,97+1,27	3,08+1,26
Endofítico-Saprotrófico de serrapilheira-Saprotrófico de solo-Saprotrófico indefinido	Mortierella	5,50+2,72*	3,98+4,03	3,75+2,29	3,45+1,89
Patógeno Animal-Endofítico-Parasita Fúngico-Líquén Parasita-Patógeno de Planta- Saprotrófico de madeira	Neocosmospora	4,85+1,72	2,81+2,50	6,40+4,97*	2,61+1,02
Não classificado	Saitozyma	5,17+2,55*	4,13+3,15	3,60+1,61	3,78+3,76
Patógeno animal-Endofítico-Epifítico-Parasita de fungo-Patógeno de planta-Saprotrófico de madeira	Trichoderma	4,60+2,97	4,86+5,00*	4,60+1,89	2,61+2,01

Legenda: Ctr (Controle), Std (Standak), Carb (carbendazim) e Der (Derosal) *Correspondem ao tratamento em que a família fúngica apresentou maior abundância.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Capítulo 2:

- Os resultados obtidos com esse experimento demonstram que um mesmo pesticida pode ter efeitos distintos conforme o histórico de uso solo onde é aplicado, demonstrado pelo efeito mais proeminentes nas comunidades fúngicas do solo florestal, enquanto no solo agrícola os efeitos foram mais evidentes nas comunidades bacterianas;
- Foi demonstrado que os principais pesticidas comercializados no Brasil têm o potencial de modificar a dinâmica das comunidades bacterianas e fúngicas em solos com e sem histórico de manejo agrícola. Os pesticidas pertencentes as classes dos herbicidas e dos fungicidas ocasionaram maiores modificações nos perfis dessas comunidades;
- Foi possível observar alterações significativas nos perfis das comunidades microbianas, na quantificação dos genes de interesse e no potencial enzimático dos solos testados nas três amostragens, enfatizando a importância de investigar continuamente os efeitos dos pesticidas na microbiota do solo combinando diferentes metodologias.

Capítulo 3:

- Comunidades microbianas menos diversas apresentaram alterações significativas no potencial enzimático da β -glicosidase com aplicação de fungicida, no entanto, modificações na diversidade β da comunidade fúngica foram mais sutis. Embora não tenha sido evidente o efeito da diversidade na resposta da comunidade fúngica, foram identificados táxons que apresentaram a abundância alteradas com a aplicação dos fungicidas;
- Os grupos que apresentaram abundância diferencial pertenciam majoritariamente ao filo Ascomycota. As famílias Nectriaceae e Hypocreaceae pertencentes a esse filo mostraram-se mais abundantes em microcosmos tratados com os fungicidas. Enquanto a família Bionectriaceae do filo Ascomycota e a família Trichosporonaceae do filo Basidiomycota apresentaram abundância reduzida nos microcosmos tratados com os fungicidas.

Capítulo 4:

- Os resultados demonstraram que os tratamentos de sementes que incluíram mistura de fungicidas com inseticidas e os tratamentos apenas com fungicidas ocasionam modificações na diversidade β das comunidades bacterianas e fúngicas na rizosfera de soja;
- As alterações na estruturação das comunidades microbianas tiveram início nos estágios iniciais do desenvolvimento da planta, afetando, portanto, a sucessão dessas comunidades na rizosfera ao longo do crescimento da soja, evidenciado pelas mudanças observadas na estrutura bacteriana até os 45 dias após o plantio;
- Os pesticidas induziram o aumento na abundância de táxons que são potenciais degradadores dos pesticidas aplicados, como, por exemplo, os gêneros *Streptomyces*, *Sphingomonas* que possuem o potencial de degradar o fungicida carbendazim e o gênero *Gemmatimonas* com o potencial de degradar o fungicida piraclostrobina. Pela análise de SIMPER foi possível observar uma redução na abundância do táxon ligado aos fungos micorrízicos arbusculares na rizosfera tratada com os pesticidas de sementes.