

INFLUÊNCIA DA MATÉRIA ORGÂNICA NA BIODEGRADAÇÃO DO ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D)

Ida Carolina Neves Direito^{1,2*}, Bárbara Alvarenga Peckle^{1,2}, Leda Cristina Santana Mendonça-Hagler², Andrew Macrae²

1 - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal/ Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ);
Laboratório de Biotecnologia Ambiental, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO)
2 - Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

ABSTRACT:

The herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is one of the most used in the world and can damage the environment and human health. The microorganisms of the soil have important role in the degradation of chemicals compounds such as pesticides. Organic matter, like organic fertilizers and plant secondary metabolites, can stimulate the growth of specific taxonomic groups in the soil. Among the plant secondary metabolites, there are flavonoids. The process of the flavonoids degradation can result in the protocatechuic acid, which is an intermediate in the degradation pathway of aromatics pesticides, such as 2,4-D. This study investigated the influence of organic matter on biodegradation of 2,4-D. First, we analyzed the growth capacity of bacterial isolates, that can use 2,4-D as the sole carbon source, in the presence of biopirrol, quercetin and rutin. Then, we verified the influence of these organic molecules on the microbial community in soil with 2,4-D application history. The results showed that the bacterial isolates were capable to use at least one model of organic matter applied in this study. The results generated in the experiment conducted to verify the influence of organic matter on the microbial community and the degradation of 2,4-D suggest that the association of 2,4-D with the organic matter could be extend their maintenance in the environment, or may represent a stage of adaptation for soil microorganisms.

Keywords: biodegradation, organic matter, pesticide, soil bacteria

RESUMO:

O herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um dos mais utilizados no mundo e pode causar prejuízos ao meio ambiente e à saúde humana. Os microrganismos do solo tem importante função na degradação de compostos químicos como os pesticidas. A matéria orgânica, como adubos orgânicos e metabólitos secundários vegetais, podem estimular o crescimento de grupos taxonômicos específicos no solo. Dentre os metabólitos secundários vegetais, existem os flavonóides. O processo de degradação de flavonóides pode resultar no ácido protocatecúico, o qual é um intermediário na rota de degradação de pesticidas aromáticos, como o 2,4-D. Este estudo investigou a influência da matéria orgânica na biodegradação do 2,4-D. Em um primeiro momento, analisamos a capacidade de crescimento de isolados bacterianos, que podem utilizar 2,4-D como única fonte de carbono, na presença de biopirrol, quercetina e rutina. Em seguida, verificamos a influência destas moléculas orgânicas sobre a comunidade microbiana do solo com histórico de aplicação do 2,4-D. Os resultados mostraram que os isolados bacterianos são capazes de utilizar pelo menos um dos modelos de matéria orgânica empregados. Os resultados gerados no experimento conduzido para verificar a influência da matéria orgânica sobre a comunidade microbiana e a degradação do 2,4-D sugerem que a associação do 2,4-D com a matéria orgânica poderia ampliar a persistência deste no ambiente, ou poderia representar um estágio de adaptação dos microrganismos do solo.

Palavras-chave: bactérias do solo, biodegradação, matéria orgânica e pesticida

INTRODUÇÃO

A degradação e o comportamento dos pesticidas no ambiente são temas de grande interesse para a sociedade (FEST & SCHMIDT, 1973; BURNS, 1975; LANGENBACH et al., 2000; MADIGAN et al., 2004a; MERINI et al., 2007; OSMAN et

al., 2009). Sabe-se que a microbiota do solo apresenta uma importante função nos processos de degradação de pesticidas (WITTICH, 1998; MESARCH et al., 2004; ANDRIGHETTI et al., 2014), e que a diversidade destes microrganismos está intimamente relacionada ao manejo do solo (O'DONNELL et al., 2001).

A manipulação da diversidade microbiana é, no entanto, um pensamento utópico devido às inúmeras variáveis relacionadas a esta diversidade (SIQUEIRA & FRANCO, 1988; YOUNG & RITZ, 2005). Podemos, talvez, compreender um pouco melhor esta dependência e buscar uma destas variáveis que seja mais facilmente manejada. Estamos inclinados a pensar que a resposta a este pensamento é a relação entre matéria orgânica, microrganismos e a degradação de pesticidas.

Sabe-se que, naturalmente, as plantas são responsáveis por mudanças nas comunidades microbianas (O'DONNELL et al., 2001; HIRATA & ANDRADE FILHO, 2011) através da adição de carbono aos solos e construção de uma rede alimentar para os organismos heterotróficos.

Devido às similaridades estruturais existentes entre compostos aromáticos oriundos do metabolismo secundário vegetal e alguns pesticidas (SINGER et al., 2003), supomos que podemos usufruir dos benefícios da adubação orgânica ao solo e à plantação selecionando as populações microbianas com capacidade de degradar pesticidas. A implementação desta prática seria relativamente simples, tendo em vista que a adubação orgânica é uma prática antiga e conhecida por produtores, que aporta com nutrientes aos vegetais e melhorias físico-químicas ao solo (AMABILE & CARVALHO, 2006; GONÇALVES et al., 2013). Além disso, existe a perspectiva de empregar resíduos de origem vegetal da agroindústria como adubos orgânicos capazes de estimularem as populações microbianas envolvidas na degradação de pesticidas, a exemplo do que vem sendo realizado com o extrato pirolenhoso (MENEGAL et al., 2012). Essa forma de emprego poderia adicionar valor a resíduos de origem vegetal e tornar o seu descarte uma prática promissora na proteção dos recursos naturais, principalmente da água, frente à aplicação dos pesticidas.

O metabolismo secundário vegetal, também denominado de metabolismo especial, é a forma de resposta do vegetal frente às variáveis ambientais. Dentre as moléculas isoladas de vegetais, oriundas do metabolismo secundário, as que se destacam são do grupo dos flavonóides pela diversidade de funções em plantas e pela sinalização planta-microrganismos (TAIZ & ZEIGER, 2006; CAPRA et al., 2014).

A quercetina é o flavonóide mais comum e possui relatada diferentes atividades biológicas (KOKUBO et al., 2001; SOUZA, 2009; CAPRA et al., 2014), além de existir uma grande variabilidade de derivados metoxilados da quercetina (HARBORNE, 1965). A distribuição da quercetina não é restrita a um gênero ou a uma família botânica (AMARAL et al., 2001; SANTOS et al., 2005), apresentando uma ampla ocorrência dessa molécula no reino vegetal (SIMÕES et al., 2013). Devido à sua abundância no reino vegetal, presença em processos de sinalização planta-microrganismo e por fazer parte da regulação de auxinas, foram escolhidos o flavonóide quercetina e seu raminoglicosídeo rutina para serem usados como modelo neste estudo.

Outra forma de interação entre planta e microrganismos é o uso de flavonóides exsudados como fontes de carbono. Segundo HARBORNE (1965), grande número de fungos e bactérias são conhecidos pela capacidade de degradarem flavonóides, como a rutina, até fenol e monóxido de carbono. A degradação de flavonóides pode acontecer através de mais de um caminho e, em rizóbios que colonizam espécies do gênero *Lotus*, a degradação de quercetina gera como produtos floroglucinol e ácido protocatecóico (RAO et al., 1991). O ácido protocatecóico está presente como um intermediário na rota de degradação de ácidos húmicos e de pesticidas aromáticos, como o ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D), um dos herbicidas mais comercializados no mundo (AGUIAR et al., 2007; EPA, 2014).

Esse elo entre a degradação de moléculas vegetais aromáticas e pesticidas deve ser investigada. Neste sentido, o presente estudo teve por objetivo verificar a influência da matéria orgânica na biodegradação do 2,4-D, sendo realizada primeiramente a verificação da capacidade de crescimento de isolados bacterianos capazes de empregar 2,4-D como única fonte de carbono na presença de biopiról, quercetina e rutina; e, em seguida, a influência destas moléculas sobre a comunidade microbiana de um solo e a biodegradação do 2,4-D em um solo com histórico de aplicação deste herbicida.

MATERIAL E MÉTODOS

HERBICIDA 2,4-D, BIOPIROL, RUTINA E QUERCETINA UTILIZADOS NO ESTUDO

O presente estudo foi realizado utilizando o herbicida 2,4-D obtidos da Sigma-Aldrich com pureza > 98% (código do produto). O extrato pirolenhoso é uma fração da sua versão comercial denominada Biopiról®, que é obtido a partir da condensação da fumaça de eucalipto. As moléculas quercetina (Merck) e rutina (Merck) foram empregadas como exemplos padrões dos flavonóides mais abundantes em vegetais.

EXPERIMENTO PARA VERIFICAÇÃO DA CAPACIDADE DE CRESCIMENTO BACTERIANO EMPREGANDO HERBICIDA 2,4-D, BIOPIROL, RUTINA OU QUERCETINA COMO ÚNICA FONTE DE CARBONO

ESTIRPES BACTERIANAS UTILIZADAS NO EXPERIMENTO: Foi utilizado como controle deste experimento a estirpe padrão *Ralstonia eutropha* JMP134, que é reconhecidamente descrita como uma bactéria degradadora do 2,4-D e apresenta toda a rota de degradação deste herbicida elucidada

(HOFFMANN et al., 2003). Também foram usados nesse ensaio os isolados bacterianos MF13 (*Bacillus firmus*), MF14 (*Ochrobactrum* sp.), DC12 (*Ochrobactrum intermedium*) e MG08 (*Bacillus simplex*) obtidos pela bipspecção de solos agrícolas realizada por DIREITO (2009) por apresentarem capacidade de crescimento na presença de 2,4-D como única fonte de carbono.

MONTAGEM E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO: As estirpes foram submetidas a um experimento “in vitro” em tubos de ensaio com meio de cultura no intuito de verificarmos a capacidade de utilização de modelos de matéria orgânica como única fonte de carbono. O meio de cultura descrito por FÜCHSLIN et al. (2003) foi utilizado tanto como o que apresentava o 2,4-D como única fonte de carbono, assim como base para a adição das diferentes fontes de carbono, sendo retirado o 2,4-D da sua formulação e inserido o biopiról, a rutina ou a quercetina na mesma quantidade do herbicida, ou seja, 500mg.L⁻¹. Todo o experimento foi realizado em triplicata (n = 3). Como controles foram empregados um meio sem fonte de carbono e outro contendo uma fonte de carbono de fácil uso pelo microrganismo, a glicose (500mg.L⁻¹). A água foi utilizada para fornecer informações do efeito do resíduo de meio usado no inóculo no crescimento do isolado. A glicose foi utilizada para verificar a capacidade de crescimento do inóculo sob condições de disponibilidade de carbono. O 2,4-D foi usado para demonstrar a capacidade de degradação do herbicida. Todos os resíduos testados foram adicionadas ao meio por filtração usando filtro com porosidade de 0,22 µm. O inóculo inicial de cada cultura foi preparado em erlenmeyer com capacidade para 250 mL com 100 mL de meio LB inoculado com uma colônia do cultivo em placa de petri. As culturas foram incubadas a 180 rpm e 30°C por 48h. A inoculação dos tubos foi realizada com 50 µL do inóculo

preparado. O experimento foi conduzido durante 21 dias a 30°C. O resultado deste experimento foi analisado por turbidimetria do meio de cultura utilizando espectrofotômetro para tubos (Spectronic 20D, Milton Roy) na faixa da luz visível (540 nm), aos 0, 1, 2, 3, 7, 14 e 21 dias após a inoculação. A cada meio de cultura testado o aparelho foi zerado com tubo do respectivo meio sem adição de inóculo.

EXPERIMENTO PARA VERIFICAÇÃO DE INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DO BIOPIROL E QUERCETINA SOBRE A COMUNIDADE BACTERIANA DO SOLO E A BIODEGRADAÇÃO DO HERBICIDA 2,4-D

SOLO: O solo empregado no experimento é oriundo de um sistema de plantio direto com histórico de aplicação do herbicida 2,4-D, sendo proveniente da Fazenda Cruzeiro, localizada no município de Castelhândia/GO e situada a 50°10'59"WGr. e 18°04'49"S. Nos últimos três anos a propriedade realizou o plantio de soja no verão seguido de sorgo safrinha e pousio em sistema de plantio direto. A quantidade empregada do herbicida 2,4-D foi 0,6L do produto comercial por hectare em uma única aplicação antes do plantio da soja. As amostras de solo foram coletadas na profundidade de 0 – 20 cm, sendo acondicionado em sacos plásticos e armazenado a temperatura ambiente até o momento de realização do experimento. O solo é um Latossolo Vermelho Distroférico com textura muito argilosa na profundidade amostrada. As características químicas do solo foram determinadas de acordo com EMBRAPA (1979). Características químicas do solo: pH (H₂O) 6.5; Na (cmolc.dm⁻³) 0.03; Ca (cmolc.dm⁻³) 4.2; Mg (cmolc.dm⁻³) 2.1; Al (cmolc.dm⁻³) 0.0; H+Al (cmolc.dm⁻³) 4.0; K (mg.Kg⁻¹) 281; P (mg.Kg⁻¹) 33,9; C (%) 2,0.

MONTAGEM DO EXPERIMENTO: O experimento foi montado na Casa de

Vegetação Aparecida Esquibel do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal da UFRJ. O objetivo foi submeter a comunidade microbiana nativa do solo com histórico de aplicação do herbicida 2,4-D à pressão seletiva gerada pela adição do 2,4-D padrão, biopiról e quercetina. Foram usadas 4 repetições em cada tratamento. Os tratamentos foram: solo sem adição do herbicida ou resíduo (testemunha) (T1); solo com uma aplicação de 2,4-D (T2); solo com duas aplicações de 2,4-D com intervalo de 7 dias entre elas (T3); solo com adição de biopiról (T4); solo com adição simultânea de biopiról e 2,4-D (T5); solo com pré-tratamento com biopiról e posterior adição de 2,4-D, 7 dias após aplicação do resíduo (T6); solo com adição de quercetina (T7); solo com adição simultânea de quercetina e 2,4-D (T8); solo com pré-tratamento com quercetina e posterior adição de 2,4-D aos 7 dias após aplicação do resíduo (T9). O solo sem adição de herbicida ou matéria orgânica foi empregado como controle. O experimento foi montado em potes plásticos (aproximadamente 1200cm³). A quantidade de 2,4-D aplicada foi correspondente a recomendação de 3,5 L por hectare do produto comercial, ou seja, 2,35 Kg de 2,4-D por hectare. A quantidade de biopiról e quercetina foi a mesma que a utilizada de 2,4-D. A aplicação foi através de pulverização na superfície dos potes após diluição em água destilada e pulverizados na superfície dos potes. Para o biopiról foi considerado seu peso para efeitos de quantidade a ser aplicada. A distribuição dos potes no interior da Casa de Vegetação foi inteiramente casualizada.

CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO: A irrigação foi realizada semanalmente no dia seguinte à coleta com a aspersão de 50 mL de água destilada por pote. Essa quantidade de água foi capaz de manter a umidade na superfície do solo sem gerar acúmulo de água e lixiviação. A variação da temperatura e umidade do ar durante o experimento foi

registrada pela Estação Meteorológica Data Logger/ Clima Logger modelo 3030.15 (Incoterm) com intervalos de 1 h entre os registros, sendo observada que a Umidade Relativa oscilou entre 55% e 70%; enquanto a temperatura média se manteve entre 20°C e 30°C.

MONITORAMENTO DO EXPERIMENTO: O monitoramento do experimento foi realizado pela determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC) em meio MEMB (CHONG, 2005) e detecção do herbicida 2,4-D no solo por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A extração do herbicida do solo foi realizada através do método TCA (DIREITO et al., 2009). O método e condições cromatográficas são referentes ao método de Direito (2009) descrito por SBANO et al. (2013). O cromatógrafo utilizado foi o WatersTM 600 Controller com Degasser, contador automático WatersTM 717 plus Autosampler e detector WatersTM 486 Tunable Absorbance Detector acoplado ao integrador WatersTM 746 Data Module. Foram injetados 100 L de amostra.

ANÁLISE DOS RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS

A análise de variância (ANOVA) foi empregada com nível de 5% de significância para comparação entre métodos de extração do 2,4-D do solo e avaliação dos tratamentos dos experimentos “in vitro” e em casa de vegetação. O teste de Tukey foi empregado para a comparação entre médias ao nível de 5% de significância.

RESULTADOS

CAPACIDADE DE CRESCIMENTO BACTERIANO EMPREGANDO HERBICIDA 2,4-D, BIOPIROL, RUTINA OU QUERCETINA COMO FONTE DE CARBONO

O experimento “in vitro” para avaliação da capacidade de utilização de biopiról, quercetina e rutina utilizou como controles o meio sem adição de fonte de carbono (identificado como água), o meio com adição de glicose e com 2,4-D. Os tratamentos que consistiram em modelos de matéria orgânica foram biopiról, quercetina e rutina. O meio com quercetina apresentou um nível de turbidez muito alto que impediu o monitoramento do crescimento por turbidimetria. A avaliação do tratamento quercetina foi realizado ao final dos 21 dias através da diluição necessária para que os valores de absorbância ficassem na faixa de leitura do espectrofotômetro.

Ralstonia eutropha JMP134 apresentou crescimento significativo nos meios com glicose, 2,4-D e rutina (Figura 1). O crescimento ocorreu a partir dos 7 dias de incubação para glicose e 2,4-D, sendo após os 14 dias no caso da rutina. Foi verificado o crescimento da bactéria no meio com quercetina.

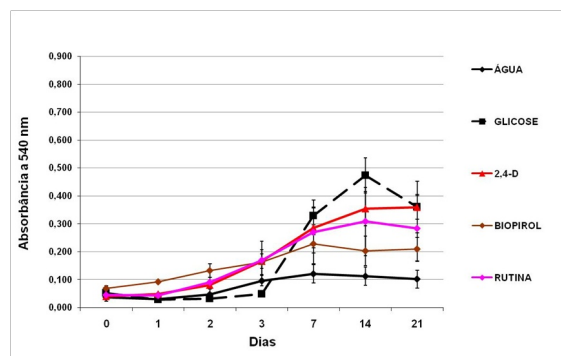


Figura 1. Crescimento de *Ralstonia eutropha* JMP134 sob diferentes resíduos avaliados por turbidimetria*. *O experimento foi realizado em triplicata (n = 3). ANOVA foi usada para análise da variância entre resíduos e Teste de Tukey para comparação de médias ao nível de 5% de significância. Barras de erros indicam desvio padrão.

O isolado MF13 (*Bacillus firmus*) do solo mostrou crescimento significativo nos meios contendo como fonte de carbono 2,4-D, biopirrol, rutina e glicose (Figura 2). Com dois dias de incubação os meios com 2,4-D, biopirrol e rutina já apresentavam crescimento. O crescimento com biopirrol foi observado a partir do segundo dia, enquanto que com a glicose aconteceu a partir de 14 dias de incubação. MF13 (*Bacillus firmus*) não cresceu em meio com quercetina.

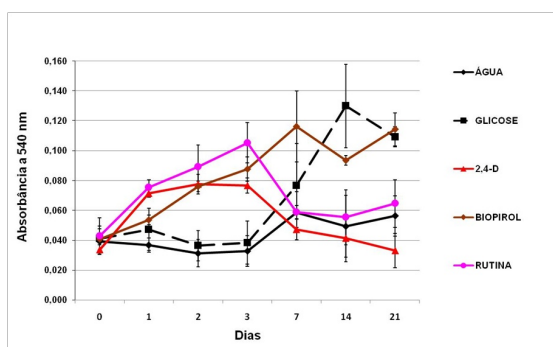


Figura 2. Crescimento do isolado MF13 (*Bacillus firmus*) sob diferentes resíduos avaliados por turbidimetria*. *O experimento foi realizado em triplicata (n = 3). ANOVA foi usada para análise da variância entre resíduos e Teste de Tukey para comparação de médias ao nível de 5% de significância. Barras de erros indicam desvio padrão.

O isolado MF14 (*Ochrobactrum* sp.) teve crescimento significativo com os meios com glicose, 2,4-D e rutina (Figura 3). No meio com glicose o crescimento ocorreu dos 2 aos 21 dias, enquanto que nos meios com 2,4-D e rutina foi verificado dos 7 aos 21 dias. Foi observado crescimento em meio com quercetina.

O isolado DC12 (*Ochrobactrum intermedium*) cresceu significativamente nos meios com glicose, 2,4-D e rutina (Figura 4). O crescimento em meio com glicose ocorreu a partir do terceiro dia. No meio com 2,4-D o crescimento foi verificado no período de 7 a 21 dias, enquanto que no que apresentava a rutina como fonte de carbono foi de 14 a 21 dias. Foi

verificado o crescimento em meio com quercetina.

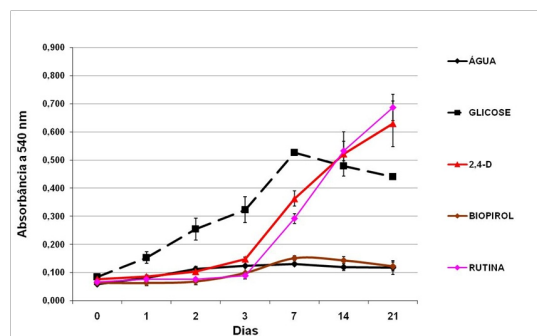


Figura 3. Crescimento do isolado MF14 (*Ochrobactrum* sp.) sob diferentes resíduos avaliados por turbidimetria*. *O experimento foi realizado em triplicata (n = 3). ANOVA foi usada para análise da variância entre resíduos e Teste de Tukey para comparação de médias ao nível de 5% de significância. Barras de erros indicam desvio padrão.

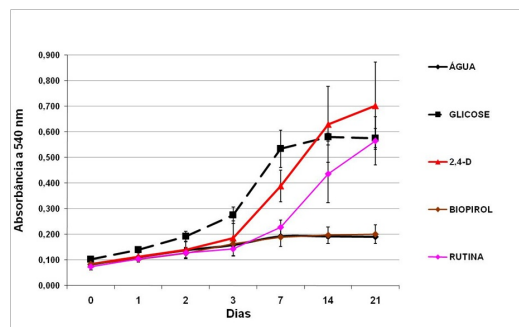


Figura 4. Crescimento do isolado DC12 (*Ochrobactrum intermedium*) sob diferentes resíduos avaliados por turbidimetria*. *O experimento foi realizado em triplicata (n = 3). ANOVA foi usada para análise da variância entre resíduos e Teste de Tukey para comparação de médias ao nível de 5% de significância. Barras de erros indicam desvio padrão.

O isolado MG08 (*Bacillus simplex*) obteve crescimento significativo nos meios com glicose, 2,4-D, biopirrol e rutina (Figura 5). O crescimento no meio com glicose ocorreu a partir do segundo dia. O crescimento no meio com 2,4-D foi observado a partir do terceiro dia. O crescimento em meio com biopirrol foi observado aos 7 dias. O isolado também cresceu em meio rutina dos 14 aos 21

dias. Foi observado o crescimento do isolado no meio com quercetina.

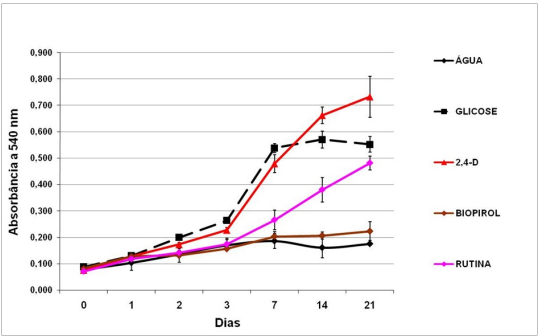


Figura 5. Crescimento do isolado MG08 (*Bacillus simplex*) sob diferentes resíduos avaliado por turbidimetria*. *O experimento foi realizado em triplicata (n = 3). ANOVA foi usada para análise da variância entre resíduos e Teste de Tukey para comparação de médias ao nível de 5% de significância. Barras de erros indicam desvio padrão.

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DO BIOPIROL E QUERCETINA SOBRE A COMUNIDADE BACTERIANA DO SOLO E A BIODEGRADAÇÃO DO HERBICIDA 2,4-D

Foi observado o efeito da adição de 2,4-D ao solo em uma e duas aplicações sobre a microbiota do solo (Figura 6, Tabela 1). Os números de UFC dos solos tratados com o herbicida foram significativamente inferiores ao solo sem adição de 2,4-D e resíduo no 14º dia de condução do experimento (Figura 7). Aos 21 dias após o início do experimento, a UFC do tratamento com duas aplicações de 2,4-D foi significativamente inferior ao controle. Não ocorreu variação significativa da UFC dentro do tratamento com duas aplicações de 2,4-D durante o experimento. O controle e o tratamento com uma aplicação de 2,4-D apresentaram UFC significativamente superior à inicial aos 21 dias do experimento.

A análise cromatográfica apresentou a persistência do 2,4-D no solo após a sua aplicação. Não foi detectado 2,4-D ou qualquer substância que apresentasse o mesmo tempo de retenção que o herbicida no solo sem adição de

2,4-D (Tabela 1). No tratamento com uma aplicação de 2,4-D, a detecção do herbicida ocorreu principalmente até os 14 dias, enquanto que aos 21 dias o herbicida foi detectado em uma das quatro repetições (Tabela 1). No tratamento com duas aplicações de 2,4-D o herbicida foi detectado em todas as coletas. Este resultado pode ser entendido como um controle para a comparação com o efeito dos tratamentos empregando biopiról e quercetina.

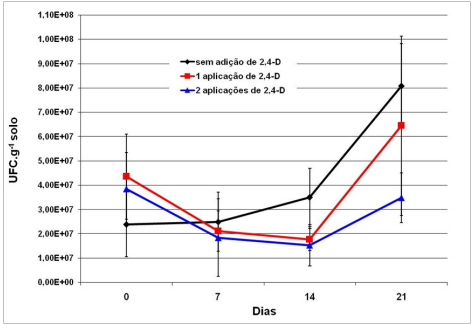


Figura 6. Contagem de heterotróficos totais no solo após enriquecimento com 2,4-D. O experimento foi realizado em quadruplicata (n = 4). ANOVA foi usada para análise da variância entre tratamentos e Teste de Tukey para comparação de médias ao nível de 5% de significância. Barras de erros indicam desvio padrão. A aplicação de 2,4-D no tratamento com uma aplicação de 2,4-D foi realizado no início do experimento. A adição de 2,4-D ao solo no tratamento com duas aplicações de 2,4-D foi realizado no início do experimento e aos sete dias.

Tabela 1. Detecção e quantificação do herbicida 2,4-D no solo após enriquecimento com 2,4-D.

Tratamento	Repetição	Detecção e quantificação do 2,4-D durante o experimento			
		0 dia	7 dias	14 dias	21 dias
Sem adição de 2,4-D	1	N	N	N	N
	2	N	N	N	N
	3	N	N	N	N
	4	N	N	N	N
1 aplicação de 2,4-D	1	D	N	D	N
	2	D	D	(1,06 µg.g⁻¹ solo)	N
	3	D	D	N	D
	4	(1,15 µg.g⁻¹ solo)	D	D	N
2 aplicações de 2,4-D	1	D	N	D	D
	2	(2,06 µg.g⁻¹ solo)	(10,11 µg.g⁻¹ solo)	(7,94 µg.g⁻¹ solo)	(1,13 µg.g⁻¹ solo)
	3	D	D	D	(1,46 µg.g⁻¹ solo)
	4	(1,02 µg.g⁻¹ solo)	(1,54 µg.g⁻¹ solo)	D	(0,68 µg.g⁻¹ solo)
		ND	D	D	D
		(4,60 µg.g⁻¹ solo)			

D: 2,4-D detectado; N: 2,4-D não detectado; ND: Não determinado. Limite de quantificação = 0,01 µg.g⁻¹ solo. Valores entre parênteses indicam a quantidade de 2,4-D mensurado quando superior ao limite de quantificação.

O efeito do biopiról nas contagens de colônias não foi significativo. Os tratamentos biopiról sem adição de 2,4-D, adição simultânea de biopiról e 2,4-D e pré-tratamento com biopiról não diferiram significativamente quanto aos valores de UFC (Figura 7). Isso aponta uma estabilidade na flutuação da microbiota do solo durante o experimento. Os tratamentos com enriquecimento do solo com biopiról apresentaram valores de UFC significativamente inferiores à UFC do controle aos 21 dias do experimento (Figura 7), mas as contagens são de mesma magnitude. Avaliando cada tratamento, não observamos diferença significativa entre as coletas.

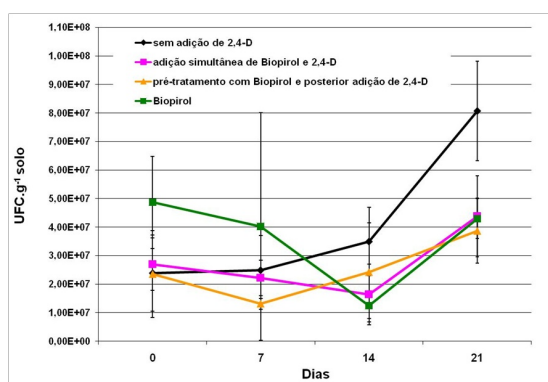


Figura 7. Contagem de heterotróficos totais no solo após enriquecimento com 2,4-D e Biopiról. O experimento foi realizado em quadruplicata ($n = 4$). ANOVA foi usada para análise da variância entre tratamentos e Teste de Tukey para comparação de médias ao nível de 5% de significância. Barras de erros indicam desvio padrão. A aplicação de 2,4-D no tratamento com adição simultânea de biopiról foi realizado no início do experimento. A adição de 2,4-D ao solo no tratamento com pré-tratamento de biopiról foi realizado no início do experimento e aos sete dias.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados de detecção do herbicida 2,4-D no solo para os tratamentos com biopiról. Foi verificada a ocorrência de uma ou mais substâncias com o mesmo tempo de retenção do 2,4-D na segunda coleta do tratamento com biopiról e na primeira coleta do pré-tratamento

com biopiról (Tabela 2). No tratamento com adição simultânea de biopiról e 2,4-D também ocorreu um pico com mesmo tempo de retenção do 2,4-D nas quatro repetições da primeira e segunda coleta. Aos 14 dias metade das repetições tinham 2,4-D detectável e, ao final do experimento, apenas uma delas apresentavam um pico com mesmo tempo de retenção do 2,4-D (Tabela 2).

Tabela 2. Detecção e quantificação do herbicida 2,4-D no solo após enriquecimento com 2,4-D e Biopiról.

Tratamento	Repetição	Detecção e quantificação de 2,4-D durante o experimento			
		0 dias	7 dias	14 dias	21 dias
Sem adição de 2,4-D	1	N	N	N	N
	2	N	N	N	N
	3	N	N	N	N
	4	N	N	N	N
Adição simultânea de Biopiról e 2,4-D	1	D	D	N	N
	2	D	D	N	N
	3	D	D	D	N
	4	(1,50 $\mu\text{g.g}^{-1}$ solo)	(0,25 $\mu\text{g.g}^{-1}$ solo)	D	D
Pré-tratamento com Biopiról e posterior adição de 2,4-D	1	(2,45 $\mu\text{g.g}^{-1}$ solo)	D	D	D
	2	D	D	(0,01 $\mu\text{g.g}^{-1}$ solo)	D
	3	(1,91 $\mu\text{g.g}^{-1}$ solo)	D	N	N
	4	N	D	D	D
Biopiról	1	N	N	N	N
	2	N	D	N	N
	3	N	N	N	ND
	4	N	N	N	N

D: 2,4-D detectado; N: 2,4-D não detectado; ND: Não determinado. Limite de quantificação = 0,01 $\mu\text{g.g}^{-1}$ solo. Valores entre parênteses indicam a quantidade de 2,4-D mensurado quando superior ao limite de quantificação.

Os tratamentos com quercetina sem adição de 2,4-D, adição simultânea de quercetina e 2,4-D e pré-tratamento com quercetina não apresentaram diferença significativa nos valores de UFC quando analisados entre si (Figura 8). Por esta razão, temos que a metodologia empregada não foi sensível o suficiente para mostrar a resposta da microbiota do solo aos tratamentos aplicados. Os valores de UFC entre as coletas não apresentaram diferenças significativas entre elas (Figura 8). Neste sentido, o comportamento da microbiota do solo foi semelhante ao observado nos tratamentos com biopiról. Foi verificado que o tratamento com adição simultânea de quercetina e 2,4-D diferiu significativamente do controle aos 7 e 21 dias do experimento, sem que fosse alterada

a ordem de grandeza nas contagens de colônias. Aos 7 dias o valor de UFC do tratamento foi superior ao do controle e aos 21 dias foi inferior. Não foram observadas outras variações inerentes aos tratamentos em relação ao controle.

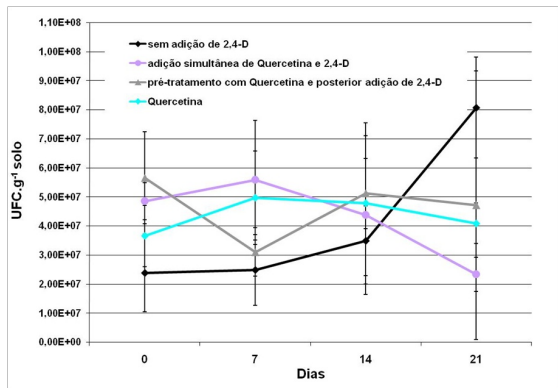


Figura 8. Contagem de heterotróficos totais no solo após enriquecimento com 2,4-D e Quercetina. O experimento foi realizado em quadruplicata (n = 4). ANOVA foi usada para análise da variância entre tratamentos e Teste de Tukey para comparação de médias ao nível de 5% de significância. Barras de erros indicam desvio padrão. A aplicação de 2,4-D no tratamento com adição simultânea de quercetina foi realizado no início do experimento. A adição de 2,4-D ao solo no tratamento com pré-tratamento de quercetina foi realizado no início do experimento e aos sete dias.

Na detecção do 2,4-D no solo foi verificada a ocorrência de picos com o mesmo tempo de retenção do herbicida 2,4-D no tratamento quercetina nas coletas aos 14 e aos 21 dias (Tabela 3). No tratamento com adição simultânea de quercetina e 2,4-D, o herbicida foi detectado em todas as coletas. Na coleta aos 7 dias foi observado que o herbicida estava presente em apenas uma das repetições. No pré-tratamento com quercetina foram detectados picos com o mesmo tempo de retenção do 2,4-D a partir da segunda coleta aos 7 dias.

Tabela 3. Detecção e quantificação do herbicida 2,4-D no solo após enriquecimento com 2,4-D e Quercetina.

Tratamento	Repetição	Detecção de 2,4-D durante o experimento			
		0 dia	7 dias	14 dias	21 dias
Sem adição de 2,4-D	1	N	N	N	N
	2	N	N	N	N
	3	N	N	N	N
	4	N	N	N	N
Adição simultânea de Quercetina e 2,4-D	1	N	N	D	N
	2	D	D	D	N
	3	(0,05 µg.g ⁻¹ solo)	N	D	D
	4	D	N	(1,21 µg.g ⁻¹ solo)	D
Pré-tratamento com Quercetina e posterior adição de 2,4-D	1	N	N	D	D
	2	N	D	N	N
	3	N	N	D	D
	4	N	D	(0,29 µg.g ⁻¹ solo)	ND
Quercetina	1	N	N	D	N
	2	N	N	N	N
	3	N	N	D	D
	4	N	N	N	ND

D: 2,4-D detectado; N: 2,4-D não detectado; ND: Não determinado. Limite de quantificação = 0,01 µg.g⁻¹ solo. Valores entre parênteses indicam a quantidade de 2,4-D mensurado quando superior ao limite de quantificação.

DISCUSSÃO

CAPACIDADE DE CRESCIMENTO BACTERIANO EMPREGANDO HERBICIDA 2,4-D, BIOPIROL, RUTINA OU QUERCETINA COMO FONTE DE CARBONO

O experimento “in vitro” foi realizado para verificar a capacidade de crescimento microbiano usando o herbicida 2,4-D, biopiról, rutina e quercetina como fontes de carbono. O crescimento dos microrganismos, em meios de cultura contendo estes modelos de matéria orgânica como única fonte de carbono, auxilia na elucidação de uma ligação entre populações degradadoras de matéria orgânica e as degradadoras de pesticidas. Os resultados obtidos através desse experimento permitiram a determinação dos tratamentos para o experimento em casa de vegetação.

A estirpe padrão degradadora do 2,4-D (*Ralstonia eutropha* JMP134) e os isolados bacterianos, como esperado, mantiveram a capacidade de utilizar 2,4-D como única fonte de carbono. Os modelos de matéria orgânica empregados nesse experimento (biopiról, quercetina e rutina) são moléculas frequentemente depositados em solos agrícolas. No caso da quercetina foi observado

que o meio ficou extremamente turvo, gerando um elevado valor de absorbância e inviabilizando a leitura da absorbância. Essa turbidez, provavelmente, ocorreu em função de a molécula ter tendência apolar e, em meio polar, essas moléculas tenderem a se agrupar dando o aspecto floculado quando da análise da turbidez (MORRISON & BOYD, 1987). A estirpe padrão *R. eutropha* JMP134 e os isolados MF14 (*Ochrobactrum* sp.), DC12 (*Ochrobactrum intermedium*) e MG08 (*Bacillus simplex*) cresceram em meio com quercetina. Não foi observado crescimento nos tubos com meio contendo quercetina do isolado MF13 (*Bacillus firmus*). Todos os isolados bacterianos foram capazes de utilizar rutina, o raminoglicosídeo da quercetina. Essa observação revela que o crescimento em MF13 (*Bacillus firmus*) está relacionado com o uso do açúcar raminose presente na molécula de rutina, enquanto que as demais bactérias podem fazer uso tanto deste açúcar quanto da estrutura da quercetina como fonte de carbono.

Outro aspecto a ser considerado é a toxicidade de flavonóides em alguns microrganismos (SHAW & HOOKER, 2008). Segundo WOENICKA et al. (2013) e SOUZA (2009), os flavonóides quercetina e rutina possuem atividade bactericida, evidenciando que a inibição do crescimento do isolado MF13 (*Bacillus firmus*) no meio contendo quercetina pode ter ocorrido pela ação antimicrobiana da quercetina. Como dito anteriormente, a degradação de quercetina apresenta moléculas intermediárias semelhantes às do 2,4-D (RAO et al., 1991). A presença de quercetina poderia ser responsável pela manutenção de rotas de degradação desse herbicida no solo. Esse pode ser um elo de grande interesse para os processos de biodegradação, pois sugere a aproximação entre as rotas de degradação de matéria orgânica e pesticidas como sugerido por SHAW & BURNS (2005a,b). Essa hipótese poderá ser verificada pelo isolamento de

enzimas ou estudando a expressão gênica durante o desenvolvimento microbiológico nesses meios.

Outro exemplo de matéria de orgânica que propiciou o crescimento microbiano foi o biopiról em MF13 (*Bacillus firmus*) e MG08 (*Bacillus simplex*). Vale ressaltar que a análise das fontes de carbono por cromatografia líquida apresentou para o biopiról uma grande quantidade de picos concentrados nos primeiros 15 min de corrida (dados não apresentados). Esses cromatogramas apontam para a existência de diferentes substâncias aromáticas polares nesses materiais, que podem conter também a quercetina e a rutina devido ao tempo de retenção apresentado por essas moléculas sob nossas condições experimentais (dados não apresentados). A sobreposição de picos dificultou a comparação entre os espectros ultravioletas das substâncias e os da quercetina e rutina.

Os resultados obtidos endossam a teoria que microrganismos degradadores de 2,4-D podem ser mantidos no meio ambiente utilizando moléculas presentes na matéria orgânica (LEIGH et al., 2002; SHAW & BURNS, 2005a,b). A similaridade entre as rotas de degradação do 2,4-D com a de substâncias presentes na constituição da matéria orgânica seria uma das possíveis respostas para isso. Se futuramente confirmada, essa similaridade poderá nos auxiliar no desenvolvimento de manejos agrícolas que, através da adubação orgânica ou manejo dos restos culturais, possam fazer a manutenção de populações e genes degradadores de pesticidas no solo visando menor impacto destes produtos ao meio ambiente.

INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DO BIOPIRÓL E QUERCETINA SOBRE A COMUNIDADE BACTERIANA DO SOLO E A BIODEGRADAÇÃO DO HERBICIDA 2,4-D

O monitoramento da microbiota do solo por contagem de UFC foi realizado em meio MEMB para que degradadores de 2,4-D fossem identificados visualmente. Foram observadas colônias azuladas, avermelhadas e amarelas em todos os tratamentos durante a condução do experimento (dados não apresentados). Não houve predomínio de nenhum padrão morfológico ou de coloração das colônias nos tratamentos (dados não apresentados).

O experimento foi montado no solo oriundo do sistema de plantio direto com histórico de aplicação do herbicida 2,4-D. Com textura muito argilosa e 2% de carbono orgânico, é possível identificar fatores que colaboram para a adsorção do pesticida ao solo e, conseqüentemente, baixa biodisponibilidade do 2,4-D para as populações microbianas (LIPTHAY et al., 2007). Essa condição determina maiores concentrações do pesticida no solo. Entretanto, em um solo com histórico de aplicação de 2,4-D como o usado nesse experimento, seria esperada uma rápida degradação do 2,4-D (ARBELI & FUENTES, 2007). A aplicação sucessiva de um composto ao meio ambiente promove o enriquecimento do meio e, conseqüentemente, a adaptação da microbiota do solo. Nessas condições, a fase de adaptação da microbiota do solo à presença do herbicida é reduzida, o que reflete na biodegradação mais rápida deste em função do histórico de aplicação (ARBELI & FUENTES, 2007).

Na primeira situação experimental, os tratamentos consistem na realização de uma ou duas aplicações de 2,4-D ao solo sem adição dos modelos de matéria orgânica (Figura 7). O tratamento com duas aplicações de 2,4-D, sendo a primeira aplicação sete dias antes da segunda, poderia estimular as populações degradadoras de 2,4-D do solo e realizar o fenômeno de degradação acelerada. O resultado obtido foi um número de UFC significativamente inferior nos tratamentos em

relação ao controle aos 14 dias do início do experimento. Isso sugere um período de adaptação de pelo menos 14 dias da comunidade microbiana à presença do 2,4-D no solo. Aos 21 dias o tratamento com uma aplicação de 2,4-D já não se diferenciava do controle, apontando para a biodegradação do 2,4-D e recuperação da microbiota do solo após a pressão seletiva. Era esperado que o tratamento com duas aplicações de 2,4-D apresentasse esse comportamento devido às duas aplicações de 2,4-D, ao contrário do observado. No experimento de MACUR et al. (2007) em solo com histórico de 2,4-D, o período de adaptação da microbiota do solo foi curto para a aplicação de 100 mg.Kg⁻¹ (100 ppm) de 2,4-D e correspondeu a mais de 20 dias para o tratamento com 500 mg.Kg⁻¹ (500 ppm) de 2,4-D. MACUR et al. (2007) explicaram a longa fase de adaptação no tratamento com a concentração mais elevada de 2,4-D ao efeito tóxico sobre alguns microrganismos. Em nossas condições experimentais, as duas situações podem ter acontecido. No tratamento com uma aplicação de 2,4-D pode ter ocorrido a degradação acelerada que proporcionou a igualdade entre este tratamento e o controle aos 21 dias. No com duas aplicações de 2,4-D, a quantidade de 2,4-D aplicada pode ter apresentado um efeito tóxico sobre a microbiota do solo. Os dados de detecção de 2,4-D no solo corroboram para essa explicação, uma vez que no tratamento com uma aplicação de 2,4-D o herbicida praticamente não está presente no solo aos 21 dias (Tabela 2). No tratamento com duas aplicações de 2,4-D o herbicida é detectável em todas as repetições (Tabela 2). Cabe comentar nesse momento que a resposta do solo frente às variáveis foi muito variável e influenciou diretamente a quantificação do 2,4-D que apresentou uma grande variabilidade nos experimentos. Essa complexidade está relacionada tanto à eventos de adsorção do herbicida como à

biodegradação deste.

Os tratamentos com aplicação do biopiról (Figura 8) e quercetina (Figura 9) apresentaram picos com o mesmo tempo de retenção do herbicida 2,4-D. A ausência de substâncias no controle com essa característica e o aparecimento destas nos tratamentos com biopiról e quercetina sem adição de 2,4-D sugerem que estas são moléculas da degradação do biopiról e da quercetina (Tabelas 3 e 4). Esses resultados sugerem a existência de moléculas intermediárias às rotas de degradação de matéria orgânica com propriedades químicas semelhantes às do 2,4-D, e indicam a necessidade da investigação da estrutura química dessas substâncias. O conhecimento mais detalhado dessas moléculas pode vir a definir a ligação entre a degradação de flavonóides e matéria orgânica com a de 2,4-D, conforme sugerido por RAO et al. (1991) e SHAW & BURNS (2005a,b).

Não houve efeito dos modelos de matéria orgânica testados sobre a microbiota do solo com a metodologia empregada no monitoramento. Os tratamentos com biopiról e quercetina sem adição de 2,4-D, com adição simultânea de matéria orgânica e 2,4-D e pré-tratamento com matéria orgânica não foram observadas diferenças significativas nos valores de contagem de UFC, tanto para biopiról como para quercetina. A uniformidade observada pelas UFC pode ser interpretada como a associação do 2,4-D à matéria orgânica prolongando sua manutenção no ambiente. Da mesma forma que também pode representar uma fase de adaptação da microbiota do solo, sendo necessário o prolongamento do experimento para a observação. A dinâmica da matéria orgânica é difícil de ser prevista em função da complexidade biológica, física e química dos mecanismos que controlam a transformação do carbono (GRANDY et al., 2009). Nesses processos, a fração da matéria orgânica associada à fração mineral representa um grande reservatório de carbono orgânico no

meio ambiente que ainda é muito pouco entendido (MIKUTTA et al., 2007).

Estudos que buscam a expansão do conhecimento da interação de pesticidas com matéria orgânica abordam o impacto da aplicação de esterco na biorremediação de pesticidas (OSMAN et al., 2009), o efeito da adição de nutrientes minerais na biodegradação (MCGHEE & BURNS, 1995; LI et al., 2005), a competição por sítios de adsorção entre pesticidas e matéria orgânica (SPARK & SWIFT, 2002) e o efeito de resíduos culturais em pesticidas (ZABLOTOWICZ et al., 1998). O trabalho de ZABLOTOWICZ et al. (1998) merece ser destacado por apresentar similaridades com o que desenvolvemos e ser de grande valia para a compreensão de nossos resultados. ZABLOTOWICZ et al. (1998) conduziram um experimento para verificar a interferência de resíduos das culturas de *Vicia villosa* Roth e *Secale cereale* Lineu na biodegradação de 2,4-D. O experimento foi conduzido em microcosmos com solo e resíduo para a determinação da mineralização do 2,4-D usando ¹⁴C. Foram feitas inferências sobre a adsorção do pesticida pelo solo e pelo resíduo através dos resultados de extração do 2,4-D com ¹⁴C desses materiais e mineralização total do herbicida. Esses autores observaram que as taxas de respiração microbiana foram 6 a 7 vezes maiores nos resíduos das culturas de *Vicia villosa* Roth e *Secale cereale* Lineu que os obtidos no solo durante a degradação do 2,4-D, mas essa atividade maior não se refletiu em maior degradação do 2,4-D. Maiores quantidades do herbicida foram extraídos dos resíduos que do solo, sugerindo que o pesticida fica adsorvido aos resíduos e que o processo de biodegradação é postergado. ZABLOTOWICZ et al. (1998) argumentam que a lignina pode ser o fator de maior adsorção de pesticidas ao resíduo e o responsável pela redução da biodisponibilidade e da degradação. Esses

autores também observaram que a maior parte do 2,4-D é mineralizado no solo, enquanto que nos resíduos a menor fração é mineralizada.

Em nossas condições experimentais, a manutenção do 2,4-D no solo também pode estar relacionada à adsorção do 2,4-D aos modelos de matéria orgânica empregados. A utilização de metodologias diferenciadas entre o experimento de ZABLOTOWICZ et al. (1998) e o nosso não permite maiores inferências. O emprego da mesma metodologia de monitoramento empregado em nossos experimentos foi observada em MERINI et al. (2007) em experimento em microcosmos em solo com histórico de 2,4-D. Estes autores observaram que com 24 h após a aplicação de 2,4-D a concentração deste no solo era quase nula, mas a UFC foi crescente até 5 dias. Esse relato aponta que, embora a associação dessas metodologias não possa abrir a “caixa preta” do solo no que se refere à biodegradação de 2,4-D, elas podem auxiliar na compreensão dos processos de biodegradação em nível de campo. Como menos de 1% dos microrganismos encontrados em solos agrícolas são cultivados, a interpretação de métodos dependentes de cultivo devem ser interpretadas cuidadosamente (ZABALOY et al., 2008). Como em toda metodologia é preciso saber trabalhar com as limitações e inferir da melhor forma possível as observações ambientais.

CONCLUSÃO

A grande diversidade de bactérias capazes de degradar 2,4-D corrobora para a existência de um elo entre a degradação de pesticidas e a degradação de matéria orgânica. A degradação/ciclagem de matéria orgânica é uma função microbiana antiga que co-evoluiu com os vegetais e a produção de metabólitos secundários, sendo esperado que as bactérias possuam as rotas necessárias à degradação desses compostos vegetais. Essa perspectiva

foca na funcionalidade do solo e apresenta preceitos fundamentais a serem considerados na realização de trabalhos futuros de bioprospecção e biorremediação. A questão sobre o efeito dos resíduos orgânicos sobre a biodegradação de 2,4-D ainda não foi respondida, mas os resultados obtidos em nossos experimentos sugerem que, embora complexa quando se pense em sua aplicação para manejo de funcionalidade do solo, a prática da adubação orgânica usando resíduos tem potencial biotecnológico para a remediação de poluentes como os herbicidas. Muitos estudos são necessários para que essa idéia seja consolidada, mas os resultados obtidos dão suporte para o desenvolvimento de novos estudos nessa temática.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ, CAPES e CNPq. À Dr.a Lotte H. E. Gabriel-Jürgens do German Research Centre for Biotechnology (GBF) pela doação da estirpe padrão utilizada neste trabalho. Ao Dr. Vinicius Benites pela doação do solo e realização das análises físico-químicas do mesmo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, A.; FERRAZ, A.; CONTRERAS, D.; RODRIGUEZ, J. 2007. Mecanismo e aplicações da reação de denton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. *Revista Nova Química*, v.30, n.3.
- ANDRIGHETTI, M. S.; NACHTIGALL, G. R.; QUEIROZ, S. C. N.; FERRACINI, V. L.; AYUB, M. A. Z. 2014. Biodegradação de glifosato pela microbiota de solos cultivados com macieira. *Revista Brasileira de Ciências do Solo* 38.
- ARBELI, Z.; FUENTES, C. L. 2007. Accelerated biodegradation of pesticides: An

overview of the phenomenon, its basis and possible solutions; and a discussion on the tropical dimension. *Crop Protection* 26: 1733-1746.

AMABILE, R. F.; CARVALHO, A. M. 2006. Histórico da adubação verde. In: CARVALHO, A.M.; AMABILE, R. F. *Cerrado – Adubação verde*. Planaltina: EMBRAPA Cerrados 1: 23-40.

AMARAL, A. C. F.; KUSTER, R. M.; BESSA, W. S.; BARNES, R. A.; KAPLAN, M. A. C.; WESSJOHANN, L. A. 2001. Flavonoids and other phenolics from leaves of two *Marlierea* species (Myrtaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 653-654.

BURNS, R. G. 1975 Factors affecting pesticide loss from soil. In: PAUL, E. A.; McLAREN, A. D. *Soil biochemistry*. New York: Marcel Dekker 4:103-141.

CAPRA, R.S.; GRATÃO, A.S.; FREITAS, G.B.; LEITE, M.N. 2014. Preparados homeopáticos e ambiente de cultivo na produção e rendimento de quercetina em carqueja [*Baccharis trimera* (Less) DC.]. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 3: 566-573.

CHONG, N. M. 2005. Development of a tool for measuring the degradation capacity of microorganisms for a xenobiotic. *Enzyme and Microbial Technology* 37: 467-471.

DIREITO, I. C. N. 2009. Bioprospeção e interações de populações bacterianas degradadoras do herbicida 2,4-D em solos grícolos. Tese de doutorado em Ciências Biológicas - Biotecnologia vegetal. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

EMBRAPA. 1979. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos (Rio de Janeiro, RJ). Manual de métodos de análise de solo. Rio de Janeiro: EMBRAPA.

EPA - United States Environmental Protection Agency. *Ingredients Used in Pesticide Products*. Disponível em: <<http://www2.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/24-d>> Acesso em: 11 dez. 2014

FEST, C.; SCHMIDT, K. J. 1973. *Biochemistry: Metabolism. The chemistry of organophosphorus pesticides*. New York: Springer p.164-269.

FÜSCHSLIN, H. P.; RÜEGG, I.; VAN DER MEER, J. R.; EGLI, T. 2003. Effect of integration of a GFP reporter gene on fitness of *Ralstonia eutropha* during growth with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Environmental Microbiology* 5: 878-887.

GONÇALVES, E. O.; PETRI, G. M.; CAÇADOR, D. A.; CALDEIRA, V. W.; DELARMELINA, W. M. 2013. Crescimento de mudas de *Acaria farnesiana* (L.)Willd em substrato contendo diferentes materiais orgânicos. *Ecologia e Nutrição Florestal* 3: 111-116.

GRANDY, A. S.; STRICKLAND, M. S.; LAUBER, C. L.; BRADFORD, M. A.; FIERER, N. 2009. The influence of microbial communities, management, and soil texture on soil organic matter chemistry. *Geoderma* 150:278-286. doi:10.1016/j.

HARBORNE, J. B. 1965. Flavonoid pigments. In: BONNER, J.; VARNER, J. E. *Plant biochemistry*. New York: Academic Press 24: 618-640.

- HIRATA, C. A.; ANDRADE FILHO, G. 2011. Abordagem teórica das interações ambientais entre nutrição de plantas e microrganismos. *Revista Geografia* 3: 191-216.
- HOFFMANN, D.; KLEINSTEUBER, S.; MÜLLER, R. H.; BABEL, W. A. 2003. transposonencoding the complete 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation pathway in the alkalitolerant strain Delftia acidovorans P4a. *Microbiology* 149: 2545-2556.
- KOKUBO, T.; AMBE-ONO, Y.; NAKAMURA, M.; ISHIDA, H.; YAMAKAWA, T.; KODAMA, T. 2001. Promotive effect of auxins on UDP-glucose: Flavonol glucosyltransferase activity in Vitis sp. cell cultures. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 6: 564-569.
- LANGENBACH, T.; SCHROLL, R.; PAIM, S. 2000. Fate and distribution of ¹⁴C-atrazine in a tropical oxisol. *Chemosphere* 40: 449-455.
- LEIGH, M. B.; FLETCHER, J. S.; FU, X.; SCHMITZ, F. J. 2002. Root turnover: an importante source of microbial substrates in rhizosphere remediation of recalcitrant contaminants. *Environmental Science & Technology* 7: 1579-1583.
- LI, K.; XING, B.; TORELLO, W. A. 2005. Effect of organic fertilizers derived dissolved organic matter on pesticide sorption and leaching. *Environmental Pollution* 134: 187-194.
- LIPTHAY, J. R.; SORENSEN, S. R.; AAMAND, J. 2007. Effect of herbicide concentration and organic and inorganic nutrient amendment on the mineralization of mecoprop, 2,4-D and 2,4,5-T in soil and aquifer samples. *Environmental Pollution* 148: 83-93.
- MACUR, R. E.; WHEELER, J. T.; BURR, M. D.; INSKEEP, W. P. 2007. Impacts of 2,4-D application on soil microbial community structure and on populations associated with 2,4-D degradation. *Microbiological Research* 162: 37-45.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. 2004a. Habitats microbianos, ciclos de nutrientes e interações com plantas e animais. *Microbiologia de Brock*. Trad. C.M. Kyan. 10 ed. United States of America: Prentice Hall (Tradução de: Brock biology of microorganisms) Cap. 20.
- MCGHEE, I.; BURNS, R. G. 1995. Biodegradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid (MCPA) in contaminated soil. *Applied Soil Ecology* 2:143-154.
- MENEGALE, V. L.C; LEÃO, A. L.; GRASSI FILHO, H ; MENEGALE, M. L. C. 2012. Resíduos agroindustriais para enriquecimento de fertilizantes orgânicos. *Revista Energia na Agricultura* 2: 113-123.
- MERINI, L. J.; CUADRADO, V.; FLOCCO, C. G.; GIULIETTI, A. M. 2007. Dissipation of 2,4-D in soils of the Humid Pampa region, Argentina: a microcosm study. *Chemosphere* 68: 259-265.
- MESARCH, M. B.; NAKATSU, C. H.; NIES. 2004. Bench-scale evaluation of catechol 2,3-dioxygenase specific primers for monitoring BTX bioremediation. *Water Research* 38:1281-1288.
- MIKUTTA, R.; MIKUTTA, C.; KALBITZ, K.; SCHEEL, T.; KAISER, K.; JAHN, R. 2007. Biodegradation of forest floor organic matter

- bound to minerals via different binding mechanisms. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71: 2569-2590.
- MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. 1987. Structure and properties. In: _____. *Organic chemistry*. 5 ed. United States of America: Allyn and Bacon 1: 1-38.
- O'DONNELL, A. G.; SEASMAN, M.; MACRAE, A.; WAITE, I.; DAVIES, J. T. 2001. Plants and fertilisers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. *Plant and Soil* 78: 135-145.
- OSMAN, K. A.; AL-REHIAYANI, S. M.; AL-DEGHAIRI, M. A.; SALAMA, A. K. 2009. Bioremediation of oxamyl in sandy soil using animal manures. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63: 341-346.
- RAO, J. R.; SHARMA, N. D.; HAMILTON, J. T. G.; BOYD, D. R.; COOPER, J. E. 1991. Biotransformation of the pentahydroxy flavone quercetin by *Rhizobium loti* and *Bradyrhizobium* strains (Lotus). *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1563-1565.
- SANTOS, P. M. L.; SCHRIPSEMA, J.; KUSTER, R. M. 2005. Flavonóides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 15: 321-325.
- SIMÕES, V. N.; FAVARIN, L. R. V.; CABEZA, N. A.; OLIVEIRA, D.; FIORUCCI, A. R.; STROPA, J. M.; RODRIGUES, D. C. M.; CAVALHEIRO, A.; ANJOS, A. 2013. Síntese, caracterização e estudo das propriedades de um novo complexo mononuclear contendo quercetina e íon Ga (III). *Revista Nova Química* 4: 495-501.
- SINGER, A. C.; CROWLEY, D. E.; THOMPSON, I. P. 2003. Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *TRENDS in Biotechnology* 3: 123-130.
- SBANO, A.; FERREIRA, J.V.R.; PECKLE, B. A.; MACRAE, A.; DIREITO, I.C.N. 2013. Otimização do método cromatográfico para quantificação do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). *AS&T ACTA SCIENTIAE E TECHNICA* 1: 37-46.
- SOUZA, A. J. F. 2009. Avaliação dos efeitos antimicrobianos de rutina e quercetina in vivo. Dissertação para obtenção de crédito em mestre . Universidade Estadual de Campinas, Campinas –SP.
- SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. 1988. Microbiota do solo. *Biotechnology do solo – Fundamentos e Perspectivas*. Lavras: ESAL, FAEPE 2: 23-46.
- SHAW, L. J.; BURNS, R. G. 2005a. Rhizodeposits of *Trifolium pretense* and *Lolium perenne*: their comparative effects on 2,4-D mineralization in two contrasting soils. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 995-1002.
- SHAW, L. J.; BURNS, R. G. 2005b. Rhizodeposition and the enhanced mineralization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soil from the *Trifolium pretense* rhizosphere. *Environmental Microbiology* 7:191-202.
- SHAW, L. J.; HOOKER, J. E. 2008. The fate and toxicity of the flavonoids naringenin and formononetin in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 528-536.
- SPARK, K. M.; SWIFT, R. S. 2002. Effect of soil composition and dissolved organic matter on pesticide sorption. *The Science of the Total*

Environment 298: 147-161.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. 2006. Fisiologia vegetal. SP: Artmed, 13: 309-334.

WOENICKA, E.; KUENIAR, A.; NOWAK, D.; NYKIEL, E.; KOPACZ, M.; GRUSZECKA, J.; GOLEC, K. 2013. Comparative study on the antibacterial activity of some flavonoids and their sulfonic derivatives. Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research 3: 567-571.

ZABALOY, M. C.; GARLAND, J. L.; GÓMEZ, M. A. 2008. An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2,4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. Applied Soil Ecology 40: 1-12.

ZABLOTOWICZ, R. M.; LOCKE, M. A.; SMEDA, R. J. 1998. Degradation of 2,4-D and fluometuron in cover crop residues. Chemosphere 37: 87-101.