



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - CEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

LETÍCIA HELENA GUEDES OLIVEIRA

**ANÁLISE DO POTENCIAL ENZIMÁTICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS VISANDO A
BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS TRATADOS COM GLIFOSATO E 2-4D**

**BRASÍLIA - DF
2022**



LETÍCIA HELENA GUEDES OLIVEIRA

**ANÁLISE DO POTENCIAL ENZIMÁTICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS VISANDO A
BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS TRATADOS COM GLIFOSATO E 2-4D**

**Relatório final de pesquisa de iniciação
científica apresentado a assessoria de
Pós-Graduação e Pesquisa**

**Orientador: Ms. Cláudio Henrique Cerri E
Silva**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, me ajudaram a concluir esse projeto, dando enfoque ao meu orientador, Cláudio Cerri, que exerceu seu papel com grande excelência, estando presente em todos os momentos e dividindo comigo sua grande sabedoria, tanto científica como de vida.

Agradeço ao corpo de Pós-Graduação do CEUB por me permitir colocar em prática esse projeto.

Agradeço à minha família que me proporcionou a oportunidade de estudar.

À Sonia Frantz, por todo seu apoio ao me acompanhar em longas jornadas de laboratório e por sua amizade sincera e acolhedora.

E agradeço, no mais, a todos aqueles que me ouviram, que se interessaram por meu trabalho, que me consolaram nos momentos de falha e comemoraram comigo nos momentos de vitória.

RESUMO

Herbicidas são produtos de defesa agrícola responsáveis por matar plantas consideradas daninhas e que podem atrapalhar o crescimento de culturas de interesse. Em vista do amplo uso de tais agroquímicos, eles podem se acumular no ambiente, causando impactos diversos, desde à saúde humana até à saúde do meio ambiente. Os fungos são conhecidos por sua alta capacidade de degradação de diversas moléculas, o que indica o alto potencial desses organismos de promoverem a biorremediação. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo testar a tolerância, por meio do cultivo dos microrganismos, em meio cultura CZAPECK contendo apenas os herbicidas como fonte de carbono, o potencial enzimático, por meio do método do açúcar redutor e a dosagem de proteínas, por meio do método de Peterson (1977), de fungos filamentosos do solo, tratados com dois dos herbicidas mais utilizados no mundo, o glifosato e o ácido 2,4-Diclorofenoxiacético. Foram encontrados um total de 20 fungos, isolados a partir das amostras de solo. Não foi evidenciada tolerância ao glifosato, visto que praticamente não houve variação no halo de crescimento das morfologias na concentração de 1% do produto. Por outro lado, a tolerância ao aminol foi mais pronunciada, tendo em vista que houve crescimento fúngico em placas contendo aminol até a concentração de 7%. Várias amostras apresentaram resultado positivo para atividade de xilanase, amilase e celulase, porém as três atividades não foram evidenciadas em todas as morfologias isoladas. Apesar do maior crescimento dos fungos ser encontrado nos meios contendo aminol, os resultados maiores para atividade de celulase foram obtidos a partir do crescimento fúngico no meio contendo o glifosato. Os resultados encontrados sugerem que os fungos filamentosos isolados neste trabalho, apresentam potencial para uso em processos de biorremediação que visam descontaminar áreas contendo glifosato ou 2,4-D.

Palavras-chave: biorremediação de herbicidas; celulase; xilanase; glifosato; aminol.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 OBJETIVO	7
2.1 Objetivo geral	7
2.2 Objetivos específicos	7
3 REFERENCIAL TEÓRICO	8
3.1 Os Herbicidas	8
3.2 Comportamento dos herbicidas no ambiente e Bioacumulação	9
3.3 Impactos ambientais causados pela bioacumulação de herbicidas	10
3.4 Biorremediação	11
3.5 Potencial fúngico na Biorremediação	12
4 MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1 Delimitação da pesquisa:	13
4.2 Coleta das amostras	13
4.3 Processamento das amostras	13
4.4 Isolamento	14
4.5 Manutenção das culturas	14
4.6 Screening preliminar	14
4.7 Ensaio enzimático	15
4.8 Extração enzimática	15
4.9 Análise da atividade enzimática	15
4.10 Determinação de proteínas (Pettersen, 1977)	16
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5.1 Coleta das amostras	16
5.2 Isolamento	17
5.3 Screening preliminar	18
5.3.1 Análise da tolerância	18
5.4 Análise da atividade enzimática	21
CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
REFERÊNCIAS	23

1 INTRODUÇÃO

Herbicidas são produtos de defesa agrícola responsáveis por matar plantas consideradas daninhas que podem atrapalhar o crescimento das culturas de interesse (Correia, 2018). Segundo dados do Ibama, em 2019, os agroquímicos dessa classe foram os mais comercializados no Brasil, sendo o Glifosato o primeiro no ranking e o 2,4-D o segundo. O glifosato é o herbicida mais utilizado no mundo, estando presente em mais de 750 defensivos de uso agrícola, urbano e até mesmo residencial (Chang; Delzell, 2016).

O Brasil está em quinto lugar no ranking mundial de produção agrícola (FAO, 2018). Segundo a Food and Agricultural Organization (FAO), em 2015, 28% do território brasileiro era dedicado ao plantio de cultivares. Devido às características ambientais do país e ao presente desequilíbrio ecossistêmico, o aparecimento de pestes é favorecido, exigindo o uso de defensivos agrícolas para atingir melhores níveis de produção (Jakubaszko, 2016). Sendo assim, a agricultura brasileira tem se baseado no uso de agrotóxicos de forma extensiva partindo de premissas que, em teoria, indicam o baixo custo, a diminuição de mão de obra, eficiência do método, segurança, etc. (Karam et al., 2020).

Apesar dos benefícios gerados pelo uso de agro defensivos, já que pode haver uma perda de 50% na produção mundial de trigo por exemplo (Oerke, 2006), existe o potencial de acontecer a bioacumulação, mesmo eles sendo muitas vezes naturalmente degradados, o que pode afetar a qualidade do solo, da água e da atmosfera, causando diversos impactos negativos ao meio ambiente (Brady; Weil, 2013) como a perda de biodiversidade (Okieimen; Ogeleka; Peretiemo-Clarke, 2020).

Já existem métodos convencionais diversos para a limpeza do solo contaminado, porém, eles podem ser muito caros e apresentar o potencial de causar outros impactos ao meio ambiente, levantando assim, uma necessidade de criação e testagem de métodos mais acessíveis e menos agressivos como os modelos de biorremediação que são mais baratos, mais práticos e apresentam menos efeitos negativos (Rangel; Nowacki, 2014).

A biorremediação se baseia no uso de microrganismos (fungos e bactérias), locais ou não, a fim de remediar o meio ambiente contaminado com óleo, produtos químicos tóxicos e outros poluentes que são definidos como xenobióticos (Madigan et al., 2016). Sendo assim, o

objetivo deste trabalho é testar a tolerância e o potencial enzimático de fungos extraídos de solos do Distrito Federal a partir do cultivo dos mesmos em meio sólido contendo Glifosato e 2,4-D como única fonte de carbono.

Segundo a lei de no 6.938 de 31 de agosto de 1981 que positivou a Política Nacional do Meio Ambiente, existem algumas obrigações legais como as de proteger o meio ambiente e sua qualidade, recuperar áreas degradadas e despoluir locais contaminados (Brasil, 1981).

Além dos impactos negativos que influenciam na qualidade ambiental e na saúde humana, ainda existem implicações econômicas pela falta de políticas ambientais mais robustas. Recentemente, segundo matéria da Folha, investidores criticaram o Brasil e ameaçaram não mais comprar insumos do país devido a normalização da displicência ambiental.

É importantíssimo cuidarmos dos recursos naturais existentes em nosso território não apenas para evitar punições econômicas, mas para que também seja cumprida até mesmo a constituição, deixando para as gerações futuras a possibilidade de existir com qualidade e, para alcançarmos isso, é necessária a criação de novas perspectivas de produção e de correção de áreas já degradadas.

Sendo assim, testar métodos que permitam a conservação e despoluição de forma ecológica, barata e simples além de corroborar com a política nacional do meio ambiente, também permite a criação de novas biotecnologias mais práticas e de mais fácil aplicação, demonstrando assim o porquê se torna necessária a produção de conhecimento científico na área.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a tolerância e o padrão enzimático de fungos coletados de diferentes regiões do Distrito Federal, quando expostos a presença dos herbicidas glifosato e 2-4D.

2.2 Objetivos específicos

Isolar fungos presentes em solos de diferentes regiões do DF

Avaliar a tolerância dos fungos ao glifosato e 2-4D, escolhendo os com maior capacidade de crescimento para análise do potencial enzimático na hidrólise de componentes de células vegetais, como celulose, hemicelulose e amido.

Realizar ensaios quanto ao potencial enzimático dos fungos que apresentarem tolerância aos herbicidas glifosato e 2-4D.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Os Herbicidas

Herbicida é uma classe de agrotóxicos utilizado no manejo de plantas indesejáveis que podem chegar a se espalhar em sistemas de cultivo agrícola. Seu uso objetiva diminuir a população dessas plantas a fim de evitar o dano causado por elas à cultura de interesse (Borella et al., 2019). Eles são classificados de acordo com seus grupos químicos e mecanismos de ação, pois, geralmente, quando apresentam os mesmos mecanismos de ação e causam os mesmos sintomas nas plantas, são também aplicados pelos mesmos métodos, apresentando outras semelhanças, como toxicologia e limitações de uso (Roman et al., 2005).

Existem trinta e quatro diferentes mecanismos de ação pelos quais os herbicidas são classificados, envolvendo desde inibidores de fotossistemas, inibidores de biossíntese de várias moléculas como a celulose, os carotenóides e ácidos graxos, inibidores de enzimas, químicos que funcionam como auxinas sintéticas, inibidores de montagem e organização de microtúbulos, até químicos que apresentam o potencial de serem genotóxicos ou outros que ainda não apresentam mecanismos de ação elucidados (WSSA, 2020).

Já os modos de aplicação são divididos em pré ou pós emergentes, levando em conta o ciclo de crescimento das plantas. Quanto à seletividade, se são seletivos (atingem apenas as plantas-alvo e são metabolizados pelas culturas de interesse que teoricamente não sofrem o efeito) ou não seletivos, que podem atacar todas as plantas presentes na região onde será aplicado. As classificações de acordo com a translocação são relacionadas a ação de contato (depende da superfície de aplicação, ou seja, necessita de uma boa cobertura foliar) ou ação sistêmica atingida via vasos condutores das plantas (Santos; Ribeiro, 2019).

O glifosato é classificado como um herbicida não seletivo, de ação sistêmica e do grupo químico glicina substituída e apresenta fórmula química $C_3H_8NO_5P$. Ele é o princípio ativo do Roundup produzido pela empresa Monsanto (e está também presente em outros agroquímicos) e é vendido geralmente como um concentrado solúvel. É indicado para uso pós-emergente e segundo a bula pode ser usado para as culturas de ameixa, banana, cacau, café, cana-de-açúcar,

citros, maçã, nectarina, pêra, pêssego, pastagem, pinus, eucalipto, uva, arroz, soja, milho e trigo. O Roundup é constituído de sal de isopropilamina de N-(fosfometi) glicina (GLIFOSATO) e outros ingredientes não descritos. Ele é um inibidor de Enoil Piruvil Shiquimato Fosfato Sintase (EPSPS), pertence ao grupo G e pode ser aplicado tanto de forma aérea como de forma terrestre. Sua classificação toxicológica é a de nível 4, ou seja, pouco tóxico (ADAPAR, sem data).

Já o 2-4D é um herbicida seletivo, de ação sistêmica e do grupo químico ácido ariloxialcanoico e apresenta fórmula química $C_8H_6Cl_2O_3$. O agroquímico 2,4-D Tecnomyl, cujo princípio ativo é o 2-4D, é também vendido como um concentrado solúvel. Seu uso é indicado para as culturas de arroz, arroz-irrigado, cana-de-açúcar, milho, soja e trigo. Ele é constituído de Sal Dimetilamina de (2,4-diclorofenoxi) ácido acético, um ácido equivalente e outros ingredientes não descritos na bula. Diferentemente do glifosato, ele é um mimetizador de auxina, pertence ao grupo O e deve ser aplicado por meio de equipamentos tratorizados. Sua classificação toxicológica é a de nível 1, ou seja, ele é extremamente tóxico (ADAPAR, sem data).

Essas características e formas de aplicação são o ponto de partida para entender como os herbicidas se acumulam no ambiente. O glifosato, por exemplo, tem sua bioacumulação influenciada pela temperatura e pela mistura de solo, que combinados, modificam sua persistência, sendo essa 30 vezes maior em condições secas e frias (Bento et al., 2016).

3.2 Comportamento dos herbicidas no ambiente e Bioacumulação

Apesar de os herbicidas serem amplamente utilizados no Brasil e no mundo, eles podem se tornar agentes poluentes presentes no solo, na água ou na atmosfera e são considerados como químicos-orgânicos. Uma das principais formas de contaminação é o contato entre componentes ambientais e resíduos agrícolas, sendo a degradação do solo diretamente ligada ao uso de produtos químicos tóxicos, substâncias que podem causar doenças ou ainda, matéria radioativa, podendo afetar a vida de plantas e animais (Rangel; Nowacki, 2014).

Existem alguns processos que influenciam na permanência e degradação de químicos-orgânicos no ambiente: associação a partículas do solo (adsorção), volatilização sem mudanças químicas, lixiviação dos poluentes solubilizados na água, decomposição microbiana, decomposição química na superfície ou dentro do solo, a absorção feita pelas plantas e animais

(que pode levar o poluente a ser incluso nas teias tróficas) e o escoamento superficial que leva parte dos poluentes a corpos hídricos (Brady; Weil, 2013).

Esses processos são modulados pelas características do solo e composição química dos herbicidas e são levados em conta, inclusive, na tomada de decisão sobre a dose que deverá ser aplicada. Um exemplo de influência da estrutura desse componente ambiental na acumulação dos agroquímicos é a presença de argila, um constituinte de sua fase coloidal. Caso o solo seja muito argiloso, sua capacidade de adsorção se torna maior, exigindo uma dose alta do defensivo para que esse, mesmo adsorvido no solo, ainda esteja disponível para realizar seu efeito herbicida em sementes de daninhas (Embrapa, 2005).

Uma pesquisa demonstrou que a presença do glifosato e de um de seus metabólitos (AMPA) varia de acordo com as estações do ano e com a quantidade de aplicações do químico na região (Fernandes et al., 2019). Em um outro estudo, realizado na Argentina, foi concluído que partículas de solo com glifosato adsorvido, podem acabar chegando nas águas superficiais próximas, onde potencialmente será dessorvido, biodegradado e acumulado no sedimento do fundo (Aparicio, 2020) e esse processo apresenta grande potencial de gerar danos diversos ao meio ambiente.

3.3 Impactos ambientais causados pela bioacumulação de herbicidas

Quando ocorre o processo de bioacumulação desse tipo de poluente nos componentes ambientais, alguns impactos negativos são observados, como a contaminação de águas superficiais e subterrâneas, morte e contaminação de animais domésticos, perda de biodiversidade de modo geral, que, por si só, representa a perda de polinizadores, de inimigos naturais, da estrutura microbológica, entre outros organismos importantes para a manutenção do equilíbrio ecológico (Brady; Weil, 2013).

Como citado anteriormente, a bioacumulação pode acontecer a partir da absorção dos pesticidas por animais ou plantas. Em um estudo feito na França, 92% das minhocas amostradas apresentaram uma mistura de pesticidas, comumente usados, acumulados em seus corpos e, em algumas vezes, em altas concentrações. Em determinadas amostragens, todos os indivíduos apresentaram algum tipo de contaminante (Pelosi et al., 2021)

Em diversos estudos foi demonstrado que herbicidas podem ser tóxicos a diferentes organismos não-alvos apesar de terem seus mecanismos de ação relacionados a plantas. Foi encontrado, por exemplo, que formulações comerciais que utilizam o glifosato como ingrediente ativo, são tóxicas a larvas do peixe zebra, a raízes de plantas e ao microcrustáceo *Artemia salina*, atrapalhando seu desenvolvimento (Rodrigues et al. 2016).

Um outro estudo publicado na revista Nature que objetivou avaliar os efeitos de herbicidas em plantas não-alvo no norte da China, demonstrou haver um efeito negativo na biodiversidade dessas plantas. As amostras tratadas com esse tipo de pesticida demonstraram menor quantidade de indivíduos quando comparadas ao grupo controle (Qi et al., 2020).

Em estudos feitos na Amazônia por pesquisadores do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), foram observadas malformações em três espécies de *Leptodactylus* e extinção local de *Scinax ruber* e *Rhinella marina* em parcelas próximas a áreas onde o herbicida foi aplicado. Ainda, foi concluído que os resultados observados na Amazônia são semelhantes aos observados na Mata Atlântica, apresentando alterações morfológicas e mortalidade em anfíbios expostos a herbicidas (Ferrante; Fearnside, 2020).

Levando em consideração o amplo uso desse tipo de agroquímicos, sua bioacumulação no ambiente e os impactos negativos que podem surgir, é necessário o monitoramento e a remediação de locais já contaminados, o que levanta a necessidade de métodos acessíveis e práticos.

3.4 Biorremediação

A biorremediação consiste no processo de utilizar organismos para retirar agentes poluentes do ambiente ou transformá-los em compostos menos tóxicos (Tortora, Funke, Case, 2017). Geralmente o processo se baseia no uso de bactérias, fungos ou plantas que bioacumulam ou metabolizam esses xenobióticos (Rangel; Nowacki, 2014).

É um método que pode ser dividido em três classes gerais: Bioestimulação, em que nutrientes são adicionados à área contaminada a fim de melhorar as condições ambientais e obter uma população grande de microrganismos; Bioaumento, em que são adicionados microrganismos com potencial biorremediador já conhecido à área contaminada ou feita *ex situ* pela utilização de biorreatores; E por fim, a biorremediação natural, que se baseia em atenuar

processos que já ocorrem naturalmente fazendo o monitoramento das características geoquímicas como disponibilidade de oxigênio e pH (Rangel; Nowacki, 2014).

Um dos agentes biológicos utilizados nesse processo, são os fungos. Eles são constituintes do solo e podem ser usados de várias formas. Esses microrganismos apresentam diversos mecanismos pelos quais xenobióticos podem ser degradados como a digestão externa em que enzimas como lacases e xylanases são excretadas ao meio ambiente, iniciando o processo de oxidação externa quebrando os poluentes em compostos menores e os tornando disponíveis para a absorção. Assim, os fungos podem absorver esses químicos e seus metabólitos secundários são então conjugados na maquinaria celular e podem então sofrer ação catabólica, ser adicionados ao vacúolo ou excretados no ambiente em uma forma menos tóxica (Deshmukh; Khardenavis; Purohit, 2016).

3.5 Potencial fúngico na Biorremediação

Vários trabalhos foram feitos com o objetivo de testar a capacidade de fungos e bactérias em utilizar herbicidas como fonte de carbono.

Os fungos *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus niger* apresentaram resultados positivos em um estudo recente. Foram utilizados tratamentos com glifosato, atrazine, xtravest e gramoxone, além do grupo controle. Os pesquisadores fizeram as medidas de densidade de colônias, peso seco e monitoramento de crescimento, demonstrando o potencial desses fungos de se manterem produtivos mesmo na presença dos agrodefensivos. Isolamentos enzimáticos não foram feitos (Sebiomo; Banjo, 2020).

Já em um estudo feito pela Embrapa, foi avaliada a resistência de fungos e a produção de lacase quando cultivados em placas de petri contendo 2-4D. Essas características foram analisadas a partir da medição do crescimento de micélio e da presença de oxidação do substrato. Foi observado que vários fungos como *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus djamor*, *Agaricus* sp. apresentaram resistência e crescimento. O estudo focou no fungo *Lentinus crinitus* que demonstrou resistência ao herbicida e ainda foi possível avaliar que não existem efeitos fisiológicos e estruturais significativos devido a presença do 2-4D, demonstrando o potencial desse fungo como biorremediador (Serbent et al., 2020).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delimitação da pesquisa:

Neste trabalho foi feita uma pesquisa experimental a fim de testar a tolerância de fungos coletados do solo no Distrito Federal (DF) a dois herbicidas, além de analisar a atividade enzimática e produção de proteínas dos organismos, para que obter dados sobre o potencial uso desses microrganismos em processos de biorremediação.

Todos os experimentos foram feitos utilizando-se a estrutura dos laboratórios do Labocien, presentes no CEUB, unidade da Asa Norte.

4.2 Coleta das amostras

Foram feitas duas coletas em duas áreas do Distrito Federal: Sobradinho II (RA XXVI) na área rural, priorizando-se o solo próximo a chácaras que contenham cultivares de plantas não nativas; Granja do Torto (Plano Piloto - RA I), priorizando-se a área de borda do Parque Nacional de Brasília. Foram coletadas duas amostras de solo em cada área, na profundidade de 10 centímetros, com o auxílio de uma sonda feita de cano de PVC. As amostras foram então armazenadas em saco plástico e levadas até os laboratórios do Labocien, para seu devido processamento.

4.3 Processamento das amostras

Após peneirar o solo, ele foi diluído e suspenso em solução salina preparada a uma proporção de 0,85%. A solução foi adicionada a frascos cônicos, que posteriormente foram autoclavados a 120 °C por 20 minutos. Nesses frascos cônicos foram adicionados 10 gramas de solo para 90 mL de solução salina. Após cinco dias os frascos foram submetidos a agitação por uma hora. O conteúdo suspenso foi, então, diluído em 10⁻² e 10⁻³ em solução salina (0,85%) (Araújo e Lemos, sem data).

Placas descartáveis estéreis de acrílico contendo 8 cm de diâmetro foram utilizadas para o cultivo dos microrganismos. Elas foram preenchidas com aproximadamente 30 mL do meio de cultura Sabouraud (Pep C 5,0 g/L; Hidrolisado péptico de tecido animal 5,0 g/L; Dextrose 40 g/L; ágar base 16,0 g/L; água purificada 1L, pH 5,6 a 25°C) autoclavado, no qual foi adicionado 200 uL de ampicilina 10mg/mL. Sendo assim, 0,2 mL da diluição de cada amostra foi semeado em cada placa a partir da técnica de espalhamento, pelo uso da alça de Drigalski estéril. As placas já

semeadas foram então armazenadas em estufa a 30 °C por dez dias para garantir um bom crescimento e diferenciação das colônias (Araújo; Lemos, sem data; Serbent et al., 2020).

4.4 Isolamento

Após o plaqueamento das diluições feitas com o solo e o crescimento das culturas, foi feito o isolamento dos fungos.

Com uma alça descartável foram coletados os centros de cada colônia formando um disco de micélio. Placas de acrílico contendo 30 mL do meio de cultura Sabouraud autoclavado, permaneceram expostas a luz UV até a solidificação do meio, sem adição de qualquer pesticida. Os discos micelares coletados anteriormente foram colocados então no centro das placas, com a face contendo o micélio voltada para baixo. As placas foram armazenadas à temperatura de 30 °C por 14 dias. Após esse período, foi avaliado se houve o desenvolvimento de apenas um tipo de fungo, tendo como referência o aspecto morfológico da cultura desenvolvida.

Confirmado o aparente isolamento morfológico, será repetido o procedimento de crescimento dos isolados, dessa vez em meio de cultura tratado com 100 µL de glifosato (Roundup - original), ou 100 µL de 2,4-D + Picloram (Aminol - Quallis). As placas foram armazenadas à temperatura de 30 °C por 14 dias. Dessa forma, foi criada uma pressão seletiva e apenas os fungos que sobreviveram a este teste preliminar foram utilizados no estudo.

4.5 Manutenção das culturas

A manutenção das culturas foi feita por meio de repiques periódicos. Os inóculos foram armazenados em placas contendo meio Sabouraud e após o crescimento, foram reservadas em geladeira a 4 °C.

4.6 Screening preliminar

O screening preliminar foi feito com o objetivo de avaliar a tolerância dos fungos aos herbicidas. Esse teste foi conduzido em meio de cultura CZAPEK (NaNO₃ 2,0 g, K₂HPO₄ 1,0 g, MgSO₄ 0,5 g, KCl 0,5 g, FeSO₄(NH₄)₂SO₄ 0,01 g, ágar 15,0 g para 1000 mL de água destilada), contendo concentrações crescentes dos herbicidas, iniciando com 1% e intervalo constante de 2%. O diâmetro central do disco micelial foi medido com paquímetro, diariamente, no decorrer dos quatorze dias de incubação. O crescimento diário das culturas (DGRab) foi calculado pela equação abaixo (Serbent et al., 2020).

$$DGRab = (Db - Da) / (tb-ta) \text{ (Fonte: Serbent et al. 2020)}$$

Em que Db é o diâmetro final calculado, Da é o diâmetro inicial do disco e $tb-ta$ representa o intervalo de tempo de exposição.

4.7 Ensaio enzimático

Após a caracterização da tolerância, os fungos que apresentaram melhores resultados foram cultivados em meio de cultura CZAPEK (NaNO₃ 2,0 g, K₂HPO₄ 1,0 g, MgSO₄ 0,5 g, KCl 0,5 g, FeSO₄(NH₄)₂SO₄ 0,01 g, ágar 15,0 g para 1000 mL de água destilada) por um período de sete dias à temperatura ambiente. A fonte de carbono foi o glifosato e o 2-4D, em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 20 mL de meio, em triplicatas, sendo que a concentração de aminol foi 5% e glifosato 1%.

4.8 Extração enzimática

Após o intervalo de tempo dado para o crescimento, foi adicionado 20 mL de tampão acetato de sódio (25 mM pH 5,0) aos Erlenmeyers que posteriormente foram submetidos a agitação por duas horas em mesa oscilatória, em temperatura ambiente em torno de 21 °C. O conteúdo dos frascos foi filtrado a vácuo com um filtro de papel Whatman número 1. O filtrado foi armazenado em frascos âmbar esterilizados que foram identificados como extratos enzimáticos, e armazenados a 4 °C (Silva, 1999).

4.9 Análise da atividade enzimática

A determinação das atividades de alfa-amilase das amostras provenientes do extrato bruto, foi feita pela adição de 200 µL da amostra enzimática, a 400 µL de solução de amido a 1%, em tampão acetato de sódio 25 mM, pH 5,0. A reação foi conduzida em banho-maria a 30 °C, durante 30 minutos (Silva et al, 1999). A reação foi interrompida pela adição de 600 µL de ácido dinitrosalicílico (DNS) e imersão dos tubos de ensaio em banho de água fervente por 10 minutos, seguido da adição de 1200 µL de água destilada. A quantidade de açúcar redutor liberada foi medida espectrofotometricamente a 540 nm utilizando-se glicose como padrão (Miller, 1969). A atividade enzimática foi expressa em µmol de açúcar redutor formado por minuto e por mL de solução enzimática (U/mL) nas condições descritas anteriormente. Para o ensaio com papel de filtro (Mandels, 1976), amostras enzimáticas de 200 µL foram adicionadas a tubos de ensaio

contendo uma tira de papel Whatman nº 1 (1 x 6 cm). A reação foi conduzida de acordo com as condições descritas para o ensaio de amilase.

4.10 Determinação de proteínas (Petterson, 1977)

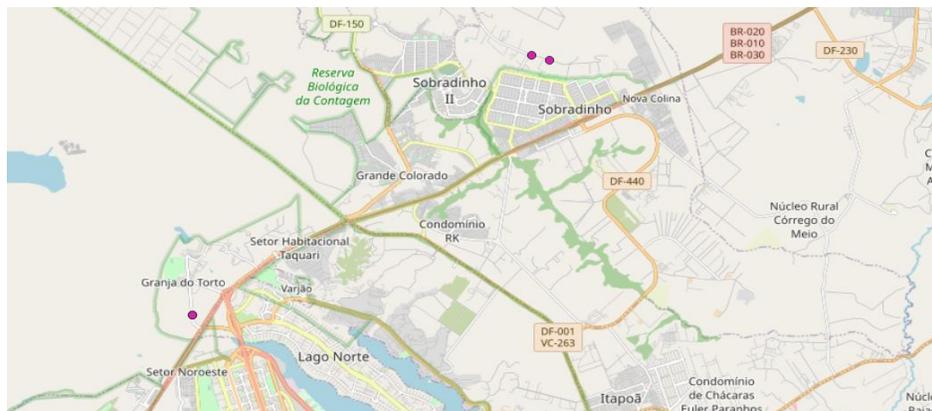
As concentrações de proteínas foram determinadas pela adição de 200 µL das amostras enzimáticas a 1,0 mL da solução A [volumes iguais dos reagentes: CTC (Na₂CO₃ 10%, KNaC₄H₄O₆ 0,2 % e CuSO₄ 0,1 %); NaOH (0,8 N); SDS 10 % e H₂O], seguido de 10 minutos de incubação a temperatura ambiente. Foram adicionados 0,5 mL da solução B [um volume do reagente de Folin (2N) em cinco volumes de H₂O], seguida de incubação por 30 minutos a temperatura ambiente. A quantidade de proteína foi medida espectrofotometricamente a 750 nm, utilizando-se albumina bovina sérica como padrão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coleta das amostras

A área de coleta foi dividida em duas áreas: áreas antropizadas (AA) e áreas não antropizadas (ANA), sendo que foram obtidas duas amostras de solo em cada local (amostra 1 e amostra 2). A figura 1 apresenta, em cor rosa, os pontos onde o solo foi coletado. As amostras referentes à área não antropizada foram coletadas na região da granja do torto, próximo ao parque nacional de Brasília, já as amostras referentes às áreas antropizadas, foram coletadas na região rural de Sobradinho, próximo a áreas de cultivo contendo plantações ativas.

Figura 1 - Pontos de coleta de solo



Fonte 1 - QGis

5.2 Isolamento

Após o crescimento dos fungos advindos das amostras de solo, foi possível isolar morfologias distintas, resultando em um total de 20 colônias, identificadas quanto ao local de coleta (áreas antropizadas - AA e áreas não antropizadas - ANA), bem como a identificação da amostra (1 ou 2). Desta forma, os isolados foram identificados quanto ao número da morfologia (M1, M2, M3, etc), da área de coleta AA, ou ANA, bem como quanto ao número da amostra do solo (1 ou 2). Essas amostras foram submetidas ao tratamento com os herbicidas, sendo que um total de 20 fungos sobreviveram ao glifosato e ao aminol. A tabela 1 demonstra esses resultados e a figura 1 ilustra as colônias isoladas das áreas antropizadas, estando cada morfologia em ordem (AA1 – M1, M2, M3, M4, M7 M8; AA2 – M1, M2, M3, M4) enquanto a figura 3 ilustra as colônias isoladas das áreas não antropizadas, estando cada morfologia em ordem (ANA1 – M1, M2, M4, M5, M6; ANA2 – M1, M3, M5).

Figura 2 - Morfologias isoladas a partir das coletas feitas nas áreas antropizadas 1 e 2



Figura 3 - Morfologias isoladas a partir das coletas feitas nas áreas não antropizadas 1 e 2

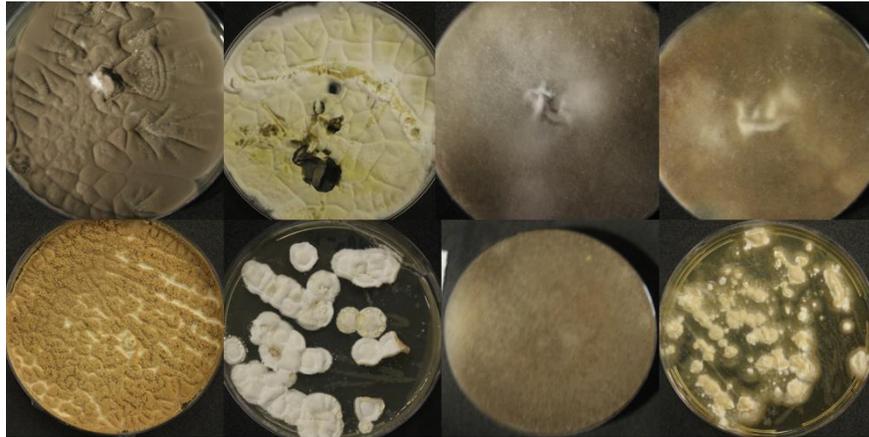


Tabela 1 - Contagem de morfotipos encontrados em cada área de coleta

Número de isolados por área		
Área de coleta	Região administrativa	Número de morfologias
ANA 1	Plano piloto (RA I)	4
ANA 2	Plano piloto (RA I)	3
AA 1	Sobradinho II (RA XXVI)	9
AA 2	Sobradinho II (RA XXVI)	4

5.3 Screening preliminar

5.3.1 Análise da tolerância

Após o Screening preliminar, os fungos foram submetidos a diferentes concentrações de aminol e glifosato, tendo seus halos de crescimento medidos com um paquímetro, diariamente, durante 14 dias. As medidas do tamanho inicial e do tamanho final do halo de crescimento foram utilizadas para o cálculo da tolerância, feito por meio da equação descrita nos métodos. A média do crescimento das amostras, em cada concentração de pesticida, está representada na tabela 2 e 3.

A concentração inibitória, no tratamento com o glifosato, ficou evidente a 1%, visto que, antes do 14º dia, os fungos já tinham seu crescimento cessado. No caso do aminol, não foi possível atingir a concentração inibitória devido a alterações que o herbicida causa ao meio de cultura, em que a 9% de concentração, o gel não chegou a solidificar, impossibilitando a continuidade dessa avaliação.

Tabela 2 - Média da tolerância dos fungos ao aminol, nas concentrações de 1%, 3%, 5% e 7% do produto

Média de tolerância - Aminol				
Amostra	1%	3%	5%	7%
Área antropizada 1				
M3	7.96	7.49	7.95	7.35
M4	7.95	0.31	6.85	2.82
M5	6.8	3.77	4.3	3.72
M7	6.66	4.96	5.54	3.76
M8	3.4	3.93	1.94	1.18
Área antropizada 2				
M1	6.74	7.1	4.75	3.79
M2	5.21	3.54	3.6	3.85
M3	7.97	4.62	4.28	1.22
M4	7.07	4.97	4.43	3.61
Área não antropizada 1				
M1	7.97	6.05	4.86	4.29
M2	7.45	6.54	6.34	6.89
M4	7.96	6.3	7.2	0.86
M5	7.94	6.39	7.14	3.4
M6	7.95	7.07	5.06	5.94
Área não antropizada 2				
M1	7.38	3.51	2.95	1.49
M3	7.95	5.05	3.91	0.62
M5	7.94	0.71	5.22	2.35

Tabela 3 - Média da tolerância dos fungos ao glifosato, na concentração de 1% do produto

Média de tolerância	
Glifosato	
Área antropizada 1	
1%	
Amostra	
M1	1
M2	3.18
M3	0.5
M4	0.43
M5	0.84
M7	0.43
M8	0.89
Área antropizada 2	
M1	0.87
M2	2.07
M3	1.11
M4	1.3

Área não antropizada 1	
M1	0.94
M2	0.89
M6	1.02
Área não antropizada 2	
M1	0.72
M3	1.95
M5	1.84

Esse estudo concluiu que os fungos utilizados obtiveram pouca tolerância ao glifosato, apresentando baixo crescimento e pouca atividade enzimática, visto que apenas duas amostras obtiveram resultado positivo para o ensaio de proteínas. O produto aqui utilizado foi a formulação do herbicida produzida pela Monsanto, o RoundUp, que quando testado para verificar sua toxicidade a fungos filamentosos de solo, demonstrou ser tóxico a concentrações mais baixas do que as encontradas em campo, causando mudanças metabólicas e morfológicas aos microrganismos (NICOLAS; OESTREICHER; VÉLOT, 2016). Se tratando da dinâmica populacional de fungos no solo, o herbicida pode estimular a produção de biomassa de forma transitória, porém, seu efeito negativo foi verificado, vide que posteriormente causa diminuição dessa biomassa, além de afetar a diversidade de fungos presentes onde foi aplicado (VÁZQUEZ et al., 2021). Contudo, algumas espécies de fungos filamentosos, como o *Aspergillus fumigatus*, são conhecidos por apresentar resistência ao produto (BRAVIM et al., 2020).

No caso dos testes feitos utilizando o Aminol, os microrganismos utilizados no presente estudo apresentaram considerável tolerância, sendo que alguns obtiveram crescimento até a saturação das placas, mesmo a concentração de 5%, sendo que só a 7% o crescimento se tornou mais lento. Fungos de solo tratados com o 2,4-D apresentaram alto crescimento e aumento do número de fungos cultiváveis, entretanto, esses resultados variam de acordo com a concentração do herbicida (ZHANG et al., 2010). Esses organismos aparecem em alguns estudos sendo utilizados para degradar herbicidas à base de 2,4-D, apresentando considerável eficiência nesse processo, o que pode estar associado à produção da enzima lacase (NGUYEN et al., 2022).

Existem diversos estudos os quais investigam a resistência e o potencial de degradar 2,4-D de fungos filamentosos, sendo que os resultados são comumente positivos, porém, os experimentos são feitos com espécies limitadas de fungos e, quando há maior diversidade, os

M2	0.024	1.823	0	0	0	0	0.013
M6	0	0	0	0	0	0	0.023
Área não antropizada 2							
M1	0	0	0	0	0	0	0.03
M3	0	0	0	0	0	0	0.03
M5	0	0	0	0	0	0	0.03

Segundo o que foi apresentado na tabela 3, as amostras que demonstraram resultado positivo foram: para o tratamento com aminol, da área não antropizada 1, M3 e M4 apenas para amido, M5 para todos os substratos usados; da área antropizada 2, M1 apenas para xilana e M4 para todos os polissacarídeos; da área não antropizada 1, apenas M4, para todos os polissacarídeos. Já para o tratamento com o glifosato, da área antropizada 1, M2, M5 e M8 apenas para celulose; da área antropizada 2, M1 e M2 para todos os polissacarídeos; da área não antropizada 1, M2 apenas para o amido.

Apesar de vários microrganismos terem se mostrado relativamente tolerantes aos herbicidas, se tratando da atividade enzimática, apenas algumas amostras demonstraram resultado positivo, sendo que M5 da área antropizada 1, M4 da área antropizada 2, M4 da área não antropizada 1, obtiveram atividade na presença todos os polissacarídeos quando cultivados junto ao aminol e as amostras M1 e M2, da área antropizada 2, quando cultivados com o glifosato, sendo esses os fungos de maior potencial enzimático. Esse resultado pode ser devido a diversas variáveis, como as características fisiológicas e genéticas dos fungos além da forma de cultivo e componentes do meio de cultura (DESHMUKH; KHARDENAVIS; PUROHIT, 2016).

O fungo filamentoso *Fusarium oxysporum*, quando exposto ao 2,4-D, apresentou atividade enzimática significativa, com evidências de que o herbicida promove um aumento da produção de esterases (OLIVEIRA, 2019). Já no caso do glifosato, mesmo em concentrações abaixo das indicadas para uso em campo, ele causou modificações importantes ao *Aspergillus nidulans*, visto que houve a inibição de síntese proteica, aminoácidos e metabólitos secundários, causando impacto também aos processos celulares de desintoxicação (MESNAGE et al., 2020), o que está de acordo com o funcionamento do herbicida, já que ele é essencialmente um inibidor de enzima (ADAPAR).

De acordo com os resultados alcançados neste trabalho, fica evidente que fungos filamentosos podem ser utilizados em processos de biorremediação de áreas contaminadas com glifosato ou 2,4-D, sendo que esses microrganismos demonstram, inclusive, eficácia na degradação de outros herbicidas, como o Paraquat (WONGPUTTISIN et al., 2020).

Em vista de que os ensaios foram feitos a partir do método do açúcar redutor, encontrando atividade enzimática usando xilana, amido e celulose como substrato, há o indicativo de que esses microrganismos isolados funcionam como bons agentes a serem aplicados mesmo em solo contendo massa vegetal, já que a celulose, a xilana e o amido são componentes de células de grande diversidade de vegetais (FERNANDES, 2009).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Fica evidente que fungos filamentosos apresentam potencial para serem utilizados como ferramentas de biorremediação.

REFERÊNCIAS

ADAPAR ±Bula do 2-4D Tecnomyl ±Disponível em: http://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2021-01/24dtecnomyl.pdf, acesso em: Abril de 2021.

ADAPAR ±Bula do Roundup original ±Disponível em: http://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2020-11/rounduporiginal1020.pdf, acesso em: Abril de 2021.

ARAÚJO, F. S. M.; LEMOS, J. L. S. ±Isolamento e identificação de fungos degradadores de petróleo ±Sem data.

BENTO, C. P. M.; YANG, X.; GORT, G. et al - Persistence of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in loess soil under different combinations of temperature, soil moisture and light/darkness - **Elsevier**, 2016.

BRADY, N. C.; WEIL, R. R. - **Elementos da natureza e propriedades dos solos** – ed. 3, editora Bookman, Porto Alegre, 2013

BRASIL - Lei no 6.938, de 31 de agosto de 1981 - **Política Nacional do Meio Ambiente**.

BRAVIM, N. P.; ALVES, A. F.; ORLANDA, J. F. F.; SILVA, P. B. R. - Selection of filamentous fungi that are resistant to the herbicides atrazine, glyphosate and pendimethalin – **Acta Scientiarum**, v. 43, n.?, 2020.

CHANG, E. T.; DELZELL, E. - Systematic review and meta-analysis of glyphosate exposure and risk of lymphohematopoietic cancers - **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, 2016

CORREIA, N. M. - Comportamento dos herbicidas no ambiente - Embrapa Hortaliças, Brasília (DF), 2018. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/185779/1/DOC-160.pdf>

DESHMUKH, R.; KHARDENAVIS, A. A.; PUROHIT, H. J. - Diverse Metabolic Capacities of Fungi for Bioremediation - **Indian Journal of Microbiology**, 2016.

DESHMUKH, R; KHARDENAVIS, A. A.; PUROHIT, H. – D Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation – **Indian J Microbiol**, v. 56, n.3, 2016

FERNANDES, G. et al. - Indiscriminate use of glyphosate impregnates river epilithic biofilms - **Science of total environment**, 2019.

FERNANDEZ, A. P. – Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes – Dissertação de mestrado, UFLA, Lavras, 2009.

FERRANTE, L.; FEARNSIDE, P. M. - Evidence of mutagenic and lethal effects of herbicides on Amazonian frogs - **Scielo**, 2020.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO) - FAOStat, Land Use data ±Atualizado em 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RL/visualize.>, acesso em: Abril de 2020

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO) ±Eletronic files and web site, Agricultural land (% land area) - Atualizado em 2018. Disponível em: <https://data.worldbank.org/indicator/AG.LND.AGRI.ZS?end=2018&locations=BR&start=1961&view=chart>, acesso em: Abril de 2020

JAKUBASZKO, R. - A natureza venceu: pragas e doenças podem provocar o caos no agrossistema tropical brasileiro se não houver mudanças urgentes no manejo - Agro DBO, 2016. Disponível em: https://issuu.com/portaldbo/docs/agro_ed_73, acesso em: Abril de 2021.

JESSOP, S; SPRING, J. - Varejistas europeus ameaçam deixar de comprar commodities do Brasil: Empresas e investidores pedem que país barre projeto de regularização fundiária - Folha de São Paulo, 2021. Disponível em: <https://www1.folha.uol.com.br/mercado/2021/05/varejistas-europeias-ameacam-deixar-de-comprar-commodities-do-brasil.shtml>. Acesso em: Maio de 2021.

KARAM, D.; CUSTÓDIO, I. G.; SILVA, A.F.; LALAU, V. A. S. - A prática do uso e do manuseio de herbicidas no estado de Minas Gerais - Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas ±MG, 2020. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1126617/1/Doc-256.pdf>

MADINGAN, M. T. et al - **Microbiologia de Brock** - 14a edição, editada ArtMed, 2016.

MANDELS, M., ANDREOTTI, R. & ROCHE, C. (1976). Measurement of saccharifying cellulase - **Biotech. Bioeng. Symp.**, 16: 21-33.

MESNAGE, R.; OESTREICHER, N.; POIRIER, F.; NICOLAS, V.; BOURSIER, C.; VÉLOT, C. - Transcriptome profiling of the fungus *Aspergillus nidulans* exposed to a commercial glyphosate-based herbicide under conditions of apparent herbicide tolerance - **Environmental Research**, v. 182, 2020.

MILLER, G. L. - Use of dinitrossalicylic acid reagent determination of reducing sugars - **Anal. Chem.**, 31: 426- 428, 1969

NGUYEN, T. L. A.; DAO, A. T. N.; DANG, H. T. C. *et al.* - Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) by fungi originating from Vietnam - **Biodegradation** v. 33, p. 301–316, 2022.

NICOLAS, V.; OESTREICHER, N.; VÉLOT, C. - Multiple effects of a commercial Roundup® formulation on the soil filamentous fungus *Aspergillus nidulans* at low doses: evidence of an unexpected impact on energetic metabolism. - **Environ Sci Pollut Res**, v. 23, p. 14393–14404, 2016.

OERKE, E. C. - Crop losses due pests - **Journal of Agricultural Science**, 2006.

OKIEMEN, F. E.; OGELEKA, D. F.; PERETIEMO-CLARKE, B. O. ±Ecotoxicological risk evaluation of herbicides on non-target environmental receptors - **Environment & Ecosystem Science**, 2020.

OLIVEIRA, P. J. B. - Bioprospecção de fungos de interesse biotecnológico na degradação dos herbicidas 2,4-d e imazapyr® - **Dissertação de mestrado**, departamento de Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná- UTFPR 79p.

P. BHOSLE, N. P.; THORE, A. S. - Biodegradation of the Herbicide 2,4-D by Some Fungi - **American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.**, v. 16, n. 10, p. 1666-1671, 2016.

P. WONGPUTTISIN, C. SUPO, N. SUWANNARACH, Y. HONDA, T. NAKAZAWA, J. KUMLA, S. LUMYONG, C. KHANONGNUCH - Filamentous fungi with high paraquat-degrading activity isolated from contaminated agricultural soils in northern Thailand - **Applied microbiology**, v. 72, n.4, 2020.

PELOSI, C. et al - Residues of currently used pesticides in soils and earthworms: A silent threat? - **Elsevier**, 2021.

PETTERSON, G. L. - A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable - **Anal. Biochem.**, v. 83, p.243-249, 1977

QUI, Y. et al. - Effects of herbicides on non-target plant species diversity and the community composition of fallow fields in northern China - **Nature**, 2020.

RANGEL, M. B. A.; NOWACKI, C. C. de B. - **Química ambiental: Conceitos, processos e estudo dos impactos ao meio ambiente** - 1a edição, editora Érica, São paulo, 2014.

RODRIGUEZ, L. B. et al - Ecotoxicological assessment of glyphosate-based herbicides: Effects on different organisms - **Environmental Toxicology and Chemistry**, 2016.

ROMAN, E. S. et al - **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação** - Gráfica Editora Berthier, 2005.

SANTOS, C. A.; RIBEIRO, J. C. - **Desafios e sustentabilidade no manejo de plantas** - Antena Editora, Ponta Grossa (PR), 2019.

SEBIOMO, A.; BANJO, F.M. - The utilisation of herbicides by indigenous microorganisms obtained from Ago-Iwoye, Nigeria, for enhanced growth rates and as carbon source in-vitro - **Cumhuriyet Science Journal**, 2020.

SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA, ABASTECIMENTO E DESENVOLVIMENTO RURAL (SEAGRI-GDF) ±Locais autorizados para venda de agrotóxicos ±Disponível em:

<http://www.seagri.df.gov.br/locais-autorizados-para-venda-de-agrotoxicos/>, acesso em: Abril de 2021.

SERBENT, M. P. et al - Growth, enzymatic production and morphology of the white-rot fungi *Lentinus crinitus* (L.) Fr. upon 2,4-D herbicide exposition - **International Journal of Environmental Science and Technology**, 2020.

SILVA, C. H. C. et al. - Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* fresenius - **Revista de Microbiología**, Brasília (DF), 1999.

SILVA, T. M.; PILEGGI, M. – Degradation of 2,4-D herbicide by microorganisms isolated from Brazilian contaminated soil – **Environmental Microbiology**, v. 38, n. 3, 2007.

T. VROUMSIA; R. STEIMAN; F. SEIGLE-MURANDI; J.-L. BENOIT-GUYOD; GROUPE POUR L'ÉTUDE DU DEVENIR DES XÉNOBIOTIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT (GEDEXE) - Fungal bioconversion of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) - **Chemosphere**, v. 60, n. 10, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. - Microbiologia - 12a edição, editora ArtMed, 2016.

VÁZQUEZ, M. B.; MORENO, M. V.; AMODEO, M. R.; BIANCHINOTTI, M. V. - Effects of glyphosate on soil fungal communities: A field study - **Revista Argentina de Microbiología**, v. 53, n. 4, 2021.

VIRGINIA, C. et al - Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins - **Elsevier**, 2013.

WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA (WSSA) ±Herbicidas±Disponível em: <https://wssa.net/wssa/weed/herbicidas/>, acesso em: Abril de 2021.

ZHANG, C.; LIU, X.; DONG, F.; XU, J.; ZHENG, Y.; LI, J. - Soil microbial communities response to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid butyl ester - **European Journal of Soil Biology**, v. 46, n. 2, 2010.