UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ-UTFPR

Campus Ponta Grossa/Campus Dois Vizinhos

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

PAULA JULIANE BARBOSA DE OLIVEIRA

BIOPROSPECÇÃODE FUNGOS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO NA DEGRADAÇÃO DOS HERBICIDAS 2,4-D E IMAZAPYR®

DISSERTAÇÃO

DOIS VIZINHOS/PR

2019

PAULA JULIANE BARBOSA DE OLIVEIRA

BIOPROSPECÇÃODE FUNGOS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO NA DEGRADAÇÃO DOS HERBICIDAS 2,4-D E IMAZAPYR®

Dissertação de mestrado do programa de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná- UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Orientador: Professor Dr. Cleverson Busso

Co-orientadores: Professora Dra. Nédia de Castilhos Ghisi

Professora. Dra. Maristela dos Santos Rey Borin

DOIS VIZINHOS/PR

2019

O48b Oliveira, Paula Juliane Barbosa de.
Bioprospecção de fungos de interesses biotecnológico na degradação dos herbicidas 2,4-D e Imazapyr®. / Paula Juliane Barbosa de Oliveira – Dois Vizinhos, 2019.
76 f.: il.

Orientador: Profº Dr. Cleverson Busso.
Coorientadora: Profª Drª Nédia de Castilho Ghisi
Coorientadora: Profª Drª Maristela dos Santos Rey Borin
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Dois Vizinhos, 2019.
Bibliografia p.57-76.

1. Solos - Movimento de herbicidas. 2.Biologia molecular.3.Fungos do solo. I. Busso, Cleverson, orient. II. Ghisi, Nédia de Castilho, coorient. III. Borin, Maristela dos Santos Rey, coorient. IV. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos. V. Título

CDD:660.6

Ficha catalográfica elaborada por Keli Rodrigues do Amaral Benin CRB: 9/1559

Biblioteca da UTFPR-Dois Vizinhos

Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Ponta Grossa

TERMO DE APROVAÇÃO

BIOPROSPECÇÃODE FUNGOS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO NA DEGRADAÇÃO DOS HERBICIDAS 2,4-D E IMAZAPYR®

por

Paula Juliane Barbosa de Oliveira

Este (a) Dissertação foi apresentado (a) em 29 de março de 2019 como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia a candidato (a) foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Cleverson Busso
Orientador(a)

Prof.(a) Dr. (a) Caroline Lermen Munhoz
Membro titular

Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha
Membro titular

Prof. Dr. Pedro Valério Dutra de Moraes
Membro titular

Dedico esta dissertação de mestrado aos meus amados pais, Iara Catarina Barbosa de Oliveira e Paulo Roberto de Oliveira, sendo estes os maiores incentivadores e fontes inesgotáveis de apoio, amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor, orientador e amigo Dr. Cleverson Busso agradeço pela amizade, apoio, paciência e dedicação em aceitar me orientar ao longo destes dois anos de curso de pós-graduação em Biotecnologia. Para que eu realizasse e prosseguisse nesta caminhada de construção de conhecimentos e aprendizagem. E por fim finaliza-se mais uma importante etapa acadêmica na busca pelo saber.

A co-orientadora professora Dra. Maristela dos Santos Rey pela orientação, amizade, paciência e ensinamentos passados para que eu realizasse e prossegui-se e por fim finaliza-se este trabalho.

A co-orientadora professora Dra. Nédia de Castilhos Ghisi pela orientação e ensinamentos passados para que eu realizasse e prossegui-se e por fim finaliza-se este trabalho.

Ao professor Américo Wagner Júnior, professora Paula Montanher e Pedro Valério Dutra de Moraes pelo uso dos equipamentos e laboratório, uma grande contribuição para este trabalho.

Aos professores do curso do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e demais professores da UNIVERSIDADE TECNOLOGICA FEDERAL DO PARANÁ-UTFPR, minha gratidão. Agradeço pela amizade e pelo conhecimento passado.

A todos os colegas de laboratório de microbiologia pelo convívio e pelos momentos de amizade.

As minhas amigas e colegas de laboratório Lorena Cruz, Luana Luchesi, Isadora Bischoff, Sheila Mara Maraschini e em especial a Caliandra Bernardi pelo companheirismo, apoio, trabalho, amizade e boas risadas.

Aos colegas de curso de pós-graduação pelos momentos de convívio.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste mestrado.

RESUMO

OLIVEIRA, Paula Juliane Barbosa de. Bioprospecção de fungos de interesse biotecnológico na degradação dos herbicidas 2,4-D e Imazapyr®. 81f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia (Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Agropecuária e Agroindústria), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2019.

A contaminação do solo tem aumentado em decorrência da adição descontrolada de substâncias químicas, dentre estas pode-se destacar os herbicidas. A aplicação de herbicidas em culturas agrícolas é uma prática realizada durante anos e essa atividade, além de causar problemas ambientais, como contaminação da água, do solo e do ar também pode provocar danos a saúde humana e animal estando associada a algumas doenças devido a toxicidade destes compostos. Este trabalho teve como objetivo obter isolados microbianos com atividade degradadora dos herbicidas Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4- D) e 2-4,5-di-hidro-4-metil-4-1-metiletil-5-oxo-1H-imidazol-2-il-3-piridinacarboxílico (Imazapyr®) a partir de uma amostra de solo coletada de uma área com histórico de aplicação de agrotóxicos. Dois isolados de fungos foram obtidos e caracterizados macromorfologicamente e micromorfologicamete e por fim identificados por biologia molecular. Os isolados foram avaliados quanto ao seu crescimento frente aos herbicidas, a produção de enzimas e a degradação dos herbicidas pelos isolados. Os fungos foram identificados como *Fusarium oxysporum* (isolado do 2,4-D) e *Fusarium solani* (isolado do Imazapy®). Um terceiro isolado, uma levedura, foi isolada a partir de uma placa de petri contendo o herbicida Imazapyr® como única fonte de carbono. Os herbicidas não afetaram o crescimento micelial e as características morfológicas, porém, alteraram a produção de amilase, protease e celulase em *F. solani* e aumentou a síntese de esterase em *F. oxysporum*. Houve uma redução de número de macroconídeos no fungo *F. oxysporum* na presença do 2,4-D. Análises de HPLC mostraram que o fungo *F. oxysporum* foi capaz de reduzir em 11 e 18% a concentração de 2,4-D quando cultivado em meio MSM e Czapeck-Dox respectivamente, sugerindo que o meio de cultura interfere no processo de degradação. A levedura L-1 induziu uma elevação do pico no cromatograma de ambos os herbicidas sugerindo que este isolado possa estar promovendo modificações nestas substâncias. Os isolados *F. oxysporum* e a levedura L-1 podem ser promissores degradadores de herbicidas.

Palavras-chave: Bioinoculantes. recuperação de áreas contaminadas. ecologia microbiana. degradação de compostos químicos.

ABSTRAT

OLIVEIRA, Paula Juliane Barbosa de. Bioprospecting of fungi of biotechnological interest in the degradation of herbicides 2,4-D and Imazapyr®. 81f. Dissertation (Masters in Biotechnology) - Graduate Program in Biotechnology (Concentration Area: Biotechnology Applied to Farming and Agroindustry), Federal University of Technology Paraná. Dois Vizinhos, 2019.

Environmental pollution has increased due to the uncontrolled addition of chemical substances in the soil, among these herbicides can be highlighted. The application of herbicides in agricultural crops has been a practice for years and this activity, besides causing environmental problems such as contamination of water, soil and air can also cause damage to human and animal health and is associated with some diseases due to toxicity of these compounds. This work aimed to isolate microbial strains with degrading activity of the herbicides 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2-4,5-dihydro-4-methyl-4-1-methylethyl-5-oxo-1H-imidazol-2-yl-3-pyridinecarboxylic acid (Imazapyr®) from a soil sample collected from an area with a history of application of pesticides. Two fungal isolates were obtained and characterized macromorphologically and micromorphologically and finally identified by molecular biology. The isolates were evaluated for herbicide growth, herbicide production and herbicide degradation by isolates. The fungi were identified as *Fusarium oxysporum* (2,4-D isolate) and *Fusarium solani* (isolated from Imazapyr®). A third strain, a yeast, was isolated from a petri dish containing the herbicide Imazapyr® as the carbon source. The herbicides did not affect mycelial growth and morphological characteristics, however, altered amylase, protease and cellulase production in *F. solani* and increased esterase synthesis in *F. oxysporum*. There was a reduction in the number of macroconides in the fungus *F. oxysporum* in the presence of 2,4-D. High performance liquid chromatographyshowed that the fungus *F. oxysporum* was able to reduce the concentration of 2,4-D in 11 and 18% when grown in MSM and Czapeck-Dox medium respectively, suggesting that the culture medium interferes with the process of degradation. L-1 yeast induced a peak elevation in the chromatogram of both herbicides suggesting that this isolate may be promoting modifications in these substances. *F. oxysporum* isolates and L-1 yeast may be promising herbicide degrading agents.

Keywords: Bioinoculants. recovery of contaminated areas. microbial ecology. degradation of chemical compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Uso de pesticidas por hectare de terra cultivada, 2014. Média de pesticida por unidade de terra cultivável, medida em quilogramas por hectare..... 16

Figura 2: Representação do percurso dos defensivos agrícolas no solo. 17

Figura 3: Estrutura química do 2,4D..... 19

Figura 4: Estrutura química do Imazapyr® 21

Figura 5: Diagrama representando a correlação entre a biorremediação, herbicida e solo. 25

Figura 6: Degradação de 2,4 D por micróbios. 2,4-Dcp, (2,4-Diclorofenol), 3,5-Dcc (3,5-Diclorocatecol) Tca, Ciclo do ácido tricarboxílico..... 27

Figura 7: Localização das regiões gênicas usadas para a amplificação do gene ITS (A), β-Tubulina (B) E Ef (C) em *Fusarium*..... 29

Figura 8: Ciclo de vida do fungo do gênero *Fusarium*..... 32

Figura 9: Representação esquemática do isolamento da cepa Microbiana 33

Figura 10: Esquematização do processo de extração de DNA, PCR e sequenciamento. 36

Figura 11: (A) Meio MSM contendo 50 mg/L^{-1} do herbicida 2,4D com desenvolvimento de estruturas similares a hifas fúngicas. Abaixo o isolado (I-1) em placa com o herbicida. (B) presença de estruturas similares a hifas em meio contendo 50mg/L^{-1}de Imazapyr® em meio msm (isolado I-2). (C) colônia fúngica com cremoso obtida a partir de uma contaminação em meio com Imazapyr® (l-1). todas as colônias foram semeadas em placas de meio de cultura B.D.A. Dois Vizinhos/PR, 2019..... 39

Figura 12: (A) Microcultivo do isolado compatível com *F. oxysporum* indicando apresença de hifas com desenvolvimento de clamidósporos aos pares; (B) esporodóquio; (C) macroconídeo e microconídio com aspecto ovobóide; (D) medida do comprimento em µm do microconídeo e macroconídeo com aumento total de 400x. Todas as colônias foram semeadas em placas de meio de cultura B.D.A e fotografadas após 21 dias de incubação a 25ºC com fotoperíodo. Dois Vizinhos, 2019..... 41

Figura 13: (A) *F. solani* indicando a presença de hifas com desenvolvimento de clamidósporos terminal e individual; (B) presença de macroconídeo e microconídeos; (C) microconídeos agrupados em uma cabeça falsa; (D) medida do comprimento em µm do macroconídeo. Todas as colônias foram semeadas em placas de meio de cultura B.D.A e fotografadas após 21 dias de incubação a 25ºC com fotoperíodo. Dois Vizinhos, 2019. 42

Figura 14:(A) colônia com aparência cremosa de coloração creme-salmão característico de grupos lededuriformes; (B) células ovóides com características leveduriformes. A placa foi cultivada em meio B.D.A e fotografada 5 dias de incubação a 25ºC com fotoperíodo. Dois Vizinhos, 2019..... 43

Figura 15: Alinhamento e índice de similaridade das sequências nucleotídicas obtidas a partir de iniciadores das regiões ITS e do gene codificante para A β-Tubulina. (A) Região ITS de *F. Oxysporum*; (B) β-Tubulina de *F. oxysporum*; (C) Região ITS de *F. Solani* E (B) β-Tubulina de *F. Solani*. Alinhamento obtido através da Ferrament Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*) https://Blast.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/Blast.Cgi 44

Figura 16: Crescimento micelial de *F. oxysporum* em diferentes meios de cultura na ausência e presença do herbicida 2,4D. Dois Vizinhos, 2019..... 46

Figura 17: Crescimento micelial de *F. solani* em diferentes meios de cultura na ausência e presença do herbicida Imazapyr®. Dois Vizinhos, 2019..... 48

Figura 18: Cromatograma dos padrões químicos dos herbicidas utilizados neste trabalho 2,4-D e Imazapyr® na concentração de 0,05mg/ml. 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Compostos ativos mais vendidos no Brasil em 2017. 14

Tabela 2: Vendas mundiais por classe de produtos 15

Tabela 3: Nível de toxicidade dos defensivos agrícolas. 16

Tabela 4: Propriedades físico-químicas do herbicida 2,4D.....20

Tabela 5: Características químicas-físicas do Imazapyr® 22

Tabela 6: Classificação dos microrganismos empregados nos processos de biorremediação do solo, via metabólica e dados recentes da literatura sobre sua aplicação. PAHs = Aromático Policíclico e Hidrocarbonetos, PCBs = Bifenilospoliclorados. 25

Tabela 7- Características morfológicas das colônias dos isolados. Dois Vizinhos, 2019. 40

Tabela 8: Média e desvio padrão do crescimento micelial do fungo *F. oxysporum* na presença do herbicida 2,4D. Dois Vizinhos, 2019. 45

Figura 16: Crescimento micelial de *F. oxysporum* em diferentes meios de cultura na ausência e presença do herbicida 2,4D. Dois Vizinhos, 2019. 46

Tabela 9: Média e desvio padrão do crescimento micelial. Dois Vizinhos, 2019.....47

Tabela 10: Índice de Velocidade de Crescimento Médio (IVCM) dos isolados *F. oxysporum* e *F. solani* na presença e ausência dos herbicidas 2,4-D e IMAZAPYR® em diferentes meios de cultura. Dois Vizinhos, 2019. 49

Tabela 11: Caracterização da Colônia de isolados fúngicos por microcultivo na presença e ausência do herbicida. Dois Vizinhos, 2019. 50

Tabela 12: Número de septos em macroconídeos na presença e ausência dos herbicidas 2,4D e Imazapyr®. Dois Vizinhos, 2019. 51

Tabela 13: Média da atividade enzimática de F. oxysporum em meio MSM contendo ou não o herbicida 2,4-D. Dois Vizinhos, 2019..... 53

Tabela 14: Média da atividade enzimática de *F. solani* em meio MSM contendo ou não o herbicida Imazapyr®. Dois Vizinhos, 2019. 53

Tabela 15: Resultados da degradação dos herbicidas em mg/mL. Dois Vizinhos, 2019. 54

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO 11
2-REVISÃO BIBLIOGRAFICA 13
2.1-A produção de defensivos agrícolas e o impacto na economia mundial 13
2.2- Os efeitos do consumo de herbicida no ambiente 16
2.3-Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4- D) 18
2.4- Imazapyr® 21
2.5-Remoção de resíduos contaminantes no solo através da Biorremediação 23
2.6-Microrganismos usados na biorremediação de defensivos agrícolas 26
2.7- O fungo *Fusarium* como degradador de herbicidas 28
3-OBJETIVO 31
3.1-OBJETIVOS ESPECÍFICOS 31
4-HIPÓTESE 31
5-MATERIAL E MÉTODO 32
Produtos químicos 32
5.2-Isolamento e identificação de microrganismos degradadores de herbicida 32
5.2.1- Coleta de solo e Isolamento de fungos 32
5.2.2-Caracterização morfológica dos isolados fúngicos 33
5.3- Extração do DNA genômico, amplificação e sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) que separa os genes 18S e 28S do rDNA 34
5.3.1- Extração de DNA da levedura e dos isolados fúngicos 34
5.3.2- Amplificação da região genômica ITS e β-tubulina da levedura e dos isolados fúngicos 35
5.3.3- Sequenciamento do produto do PCR amplificado 35
5.4-Teste de atividade enzimática dos fungos 36
5.5 -Preparações das amostras para análise de degradação dos herbicidas 2,4D e Imazapyr® por meio da cepa microbiana isolada 37
5.6-Análise estatística 38
6-RESULTADOS E DISCUSSÃO 39
6.1- Bioprospecção das espécies fúngicas 39
6.2- Caracterização macro e micromorfológica dos Isolados I-1, I-2 e L-1 39
– Confirmação das espécies de *F. oxysporum* e *F. solani* por técnicas de biologia molecular 43
– Avaliação do crescimento micelial e alterações morfológicas dos isolados expostos aos herbicidas 45
6.5-Atividade enzimática de *F. oxysporum* e *F. solani* 52

6.6- Avaliação da degradação dos herbicidas 2,4-D e Imazapyr® pelos fungos *F. oxysporum*, *F. solani* e a levedura L-1 utilizando a técnica de HPLC..... 54

7- CONCLUSÃO 56

8- REFERENCIAS 57

1-INTRODUÇÃO

Os herbicidas são mundialmente empregados em plantações para o controle de plantas daninhas. No entanto, o uso excessivo destas substâncias, tais como o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4- D) e o ácido 2-4,5-di-hidro-4-metil-4-1-metiletil-5-oxo-1H-imidazol-2-il-3-piridinacarboxílico (Imazapyr®) tem promovido a contaminação do solo, água e ar (LIAN et al., 2014; GLEICH et al., 2011; SMITH et al., 2011). As consequências do uso indiscriminado dessas substâncias tem sido diversos (SALMAN e AL-SAAD, 2012), a acarretando desde processos de lixiviação (CHEN et al., 2014; HSIAO et al., 2013; MARINOZZI et al., 2013) com contaminação de águas superficiais e subterrâneas até a ocorrência de erosão e desertificação no solo.

O próprio solo pode oferecer alternativas no sentido de remediar os efeitos nocivos promovidos pela contaminação por herbicidas, (ROGER-ESTRADE et al., 2010). A biodiversidade de espécies que habitam o solo pode auxiliar na remoção desses contaminantes, sobretudo, espécies microbianas que desempenham papel importante na degradação de compostos xenobióticos (SU et al., 2013). A presença destes microganismos neste habitat pode proporcionar uma nova possibilidade de estudos voltados para práticas de biorremediação em solos contaminados por herbicidas (BERNOTH et al., 2000).

A biorremediação microbiana é uma alternativa que trás benefícios tanto para o agricultor como para o ambiente, pois faz uso de microrganismos que naturalmente residem nestes ambientes e muitos deles adaptados à essas condições. Assim, o processo de degradação torna-se mais fácil e rápido. Dentre as espécies de microganismos que podem ser usadas neste processo, os fungos merecem destaque, pois devido a versatilidade, diversidade e resistência são descritos na literatura como excelentes degradadores de herbicidas (CHANRA e RUSTGI., 1998).

A degradação de herbicidas pelos fungos é realizada através de sistemas enzimáticos, que transformam bioquimicamente as substâncias em fontes de energia usadas para seu crescimento (BOLLAG, 1974). As enzimas que estão envolvidas nesses processos são divididas em extracelulares e intracelulares. As intracelulares tem como necessidade a absorção do produto, enquanto que as extracelulares ocorrem a partir da secreção de enzimas pelo fungo reagindo com a molécula da substância (BOLLAG, 1974) sendo estas as encarregadas na degradação dos herbicidas.

Desta forma, a bioprospecção de fungos isolados em culturas específicas onde há grande incidência de uso de herbicidas (XIE et al., 2013; YANG et al., 2014) poderá ser uma ferramenta bastante promissora para uso, bem como a compreensão dos mecanismos de biorremediação de solos contaminados promovidos por estes microrganismos. Diante desta problematização, o objetivo deste trabalho foi isolar espécies fúngicas presentes no solo com capacidade de degradação dos herbicidas 2,4- D e o Imazapyr®.

2-REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1-A produção de defensivos agrícolas e o impacto na economia mundial

O primeiro registro de uso de um produto químico para controlar plantas daninhas na agricultura foi do povo grego e egípcio há mais de três mil anos utilizando o arsênico (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000). Com os anos o controle de plantas daninhas, antes realizado a base de metais pesados, passou a ser substituído por novos produtos marcando assim um novo ciclo na história da agricultura que ficou conhecido como “movimento verde” (DAMS, 2006).

A revolução verde iniciou-se na metade do século XX durante o período de pós-guerra e baseava-se na aplicação intensiva de defensivos agrícolas no plantio (ZAMBERLAM e FRONCHET, 2001). O intuito deste processo visava o melhoramento da produção agrícola (ALMEIDA e LAMOUNIER, 2005) principalmente de grãos, pois o rendimento era baixo e não supria o crescimento populacional na época (CONWAY, 2003). A solução encontrada pelos governantes foi criar produtos que visavam o melhoramento da produção agrícola para obter maior produtividade (PERES et al., 2003) e assim desenvolver uma nova prática na agricultura por meio do incentivo ao consumo de produtos químicos. Porém, à medida que os anos se passavam e o consumo dos produtos químicos no campo aumentava, o setor agrícola tornava-se cada vez mais dependente deste processo (LONDRES 2011). Os resultados dessa ação transformaram essa prática numa das principais atividades adotadas como padrão na agricultura nos dias atuais (ANDRADES e GANIMI, 2007).

Os defensivos agrícolas ou chamados de defensivos fitossanitários são um dos produtos mais consumidos no mundo (ARAÚJO, 2002). São classificados de acordo com seu modo de ação como fungicida, pesticida, algicida e herbicida (USEPA, 2009). Anualmente são usados cerca de 2.9 milhões de toneladas de defensivos agrícolas na agricultura distribuídas entre inseticidas com 60%, fungicidas com 85% e os herbicidas com 90%, produzidos por 20 principais companhias de agroquímicos: Syngenta, Bayer, Monsanto, BASF, Dow AgroSciences, Du Pont, MAI e Nufarm entre outras (EPA, 2017).

Os mais requisitados entre os agricultores são os herbicidas usados na agricultura no controle de gramíneas e folhas largas. A distribuição destes produtos pela indústria no

mundo é de aproximadamente 120 milhões de toneladas do composto ativo (PERFIL TÉCNICO 2,4-D, 2016), dos quais 540 mil toneladas do produto são usadas conforme os dados divulgados pelo IBAMA (VASCONCELOS, 2018). De acordo com o Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas (SINDAG, 2001) os países que mais fazem uso de herbicidas são a Itália, Grécia, Holanda, Alemanha, Bélgica, Reino Unido, França, Japão, China, EUA e o Brasil (FELICONIO, 2006). O Brasil é líder no ranking mundial desde 2008 no uso e, sobretudo, na venda de herbicidas (PELAEZ, 2011) o qual tem obtido cada vez mais espaço no mercado mundial (CARNEIRO et. al., 2015).

Nos últimos 40 anos, o consumo anual de herbicidas tem sido superior a 300 mil toneladas com um aumento de 700% no consumo (EMBRAPA, 2013). Segundo o relatório de comercialização de defensivos agrícolas divulgado pelo IBAMA em 2012, foram comercializados cerca de 425.778 toneladas de herbicidas e em 2013 o número aumentou em relação ao ano anterior chegando a um total de 56.993,88 toneladas (IBAMA, 2013). Já em 2014 as vendas dos herbicidas atingiram 508,6 mil toneladas enquanto que 2015 e 2016 foram distribuídas no mercado o total respectivamente de 521.525,40 e 487.117,53 toneladas do composto ativo (IBMA, 2017). Em 2017 as vendas mantiveram-se idênticas em relação ao ano anterior totalizando 487,5 mil toneladas o 2,4D e GLIFOSATO os herbicidas mais comercializados (Tabela 1). Atualmente o número de produtos formulados foi 1.854 toneladas do composto ativo (AGROFIT, 2018).

Tabela 1: Compostos ativos mais vendidos no Brasil em 2017.

Composto Ativo	Vendas (ton. IA)	Ranking
Glifosato e seus sais	173,150.75	1º
2,4-D	57,389.35	2º
Mancozebe	30,815.09	3º
Acefato	27,057.66	4º
Óleo mineral	26,777.62	5º
Atrazina	24,730.90	6º
Óleo vegetal	13,479.17	7º
Dicloreto de paraquate	11,756.39	8º
Imidacloprido	9,364.57	9º
Oxicloreto de cobre	7,443.62	10º

Fonte: IBAMA / Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto n° 4.074/2002. Dados atualizados: 25/06/2018.
Unidade de medida: toneladas de IA (Ingrediente Ativo)

Os estados que mais consumiram herbicidas foram São Paulo com 25%, Paraná com 16%, Minas Gerais com 12%, Rio Grande do Sul com 12%, Mato Grosso com 9%, Goiás com 8% e Mato Grosso do Sul com 5% (EMBRAPA, 2013). Conforme dados disponibilizados em 2017 pela Universidade de São Paulo (USP) foi possível determinar a quantidade de herbicidas utilizados por regiões brasileiras em relação à área agrícola. A região Centro-Oeste foi a que teve maior media no uso de herbicidas entre os anos de 2012 e 2014 (BOMBARDI, 2017).

Em termos financeiros o mercado de defensivos agrícolas no Brasil atingiu entre os anos de 2000 e 2010 um crescimento de 190% superando até mesmo o mercado mundial (DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE AMBIENTAL E SAÚDE DO TRABALHADOR, 2016). Entre os anos de 1997 e 2009 foram contabilizados um total de U$$ 47,6 bilhões de vendas de herbicidas (AGROW, 2011) (Tabela 2). Somente em 2015 os números atingiram U$$ 9,6 bilhões (SINDIVEG, 2017) tornando este um dos produtos mais comercializados (NARRA, 2016).

Tabela 2: Vendas mundiais por classe de produtos
Fontes: MCDOUGALL (2010) e CROPLIFE (2010).

	2009		1997	
Produtos	Vendas (US$ bilhões)	%	Vendas (US$ bilhões)	%
Herbicida	17.527	46,3	13.320	47,6
Fungicida	9.726	25,7	4.893	17,5
Inseticida	9.411	24,9	8.246	29,4
Outros	1.196	30,2	1.540	5,5
Total	37.860	100	28.000	100

As culturas agrícolas que mais fazem uso de herbicidas são arroz, aveia, cevada, trigo, milho, soja, sorgo, café e cana-de-açúcar. Desde 1971 as áreas agrícolas sob cultivo destas plantas vêm sendo tratadas com herbicidas (WANG, 1971) sendo que a média geral de consumo por área cultivada no Brasil passou de 0,8 kg i.a. ha, em 1970, para 7,0 kg i.a. ha, em 1998 (EMBRAPA, 2013). Entre os anos de 1990 a 2014 observou-se uma escala temporal (Figura 1) (FAO 2017). Conforme os dados disponibilizados pelo Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE) a quantidade de composto ativo aplicado em culturas agrícolas em 2011 foi de 35,3% para soja, 20% para o milho, 14% para a cana-de-açúcar, 6% para o feijão, 4,2% para o arroz, 3,2% para o trigo e café, 2,6% para a mandioca e 2,1% para o algodão (IBGE, 2012).

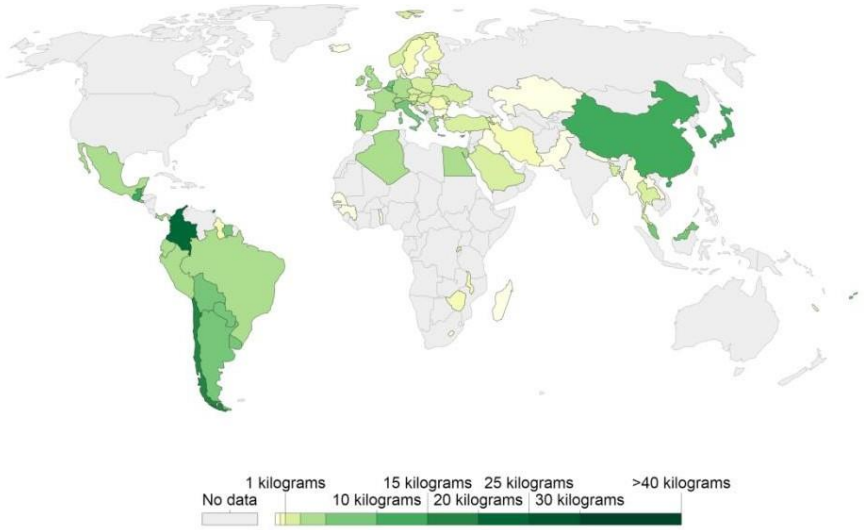

Figura 1: Uso de pesticidas por hectare de terra cultivada, 2014. Média de pesticida por unidade de terra cultivável, medida em quilogramas por hectare.
Fonte: un food agricultural organization FAO. https://ourworldindata.org/fertilizer-and-pesticides#pesticide-application-rates. (2017).

2.2- Os efeitos do consumo de herbicida no ambiente

Os herbicidas são divididos em pré-emergente (usado antes da germinação da planta daninha no solo) e pós-emergente (utilizado após o crescimento de plantas daninhas) (PROCÓPIO et al., 2004). Segundo Oliveira e Brighenti (2011) podem ser classificados segundo a capacidade de ionização em herbicidas ácidos (moléculas que tem a capacidade para doar próton e formar ânions [-]) e em herbicidas básicos (moléculas que tem a capacidade de receber prótons para formar cátions [+]). Além disso, são definidos com o nível de toxicidade em quatro classes representados na (Tabela 3).

Tabela 3: Nível de toxicidade dos defensivos agrícolas.

Classe	Nível de toxicidade	Cor no rótulo
I	Extremamente Tóxicos	Faixa Vermelha
II	Altamente Tóxicos	Faixa Amarela
III	Medianamente Tóxicos	Faixa Azul
Iv	Pouco Tóxicos	Faixa Verde

Fonte: OPAS, 1997.

Existe no mercado mundial ± 1.500 ingredientes ativos (MAPA, 2004) destes, 434 são ingredientes ativos elaborados no Brasil sendo registrados cerca de 2 produtos comerciais (ANVISA, 2010). O consumo de herbicida tem aumentado nas áreas agrícolas em 78% nos últimos 40 anos (EMBRAPA, 2013), principalmente em culturas como arroz

irrigado, milho e cana-de-açúcar (COLLA et al., 2008). Tem-se observado uma maior incidência de herbicidas lançadas nestas áreas de cultivo, aumentando cada vez mais os níveis de defensivos agrícolas no solo (PRIMEL et al., 2005). Estima-se que cerca de 60 a 70% dos defensivos agrícolas usados no campo não estejam atingindo os devidos sítios alvos (LAW, 2001) e sim áreas vizinhas, florestas ou zonas urbanas. Muitas vezes levado através do vento ou por processos de lixiviação (LONDRES, 2011).

O comportamento do composto no solo vai de acordo com o declive da área e o acúmulo de resíduo que é depositado (RAMALHO, et al., 2000). Quando em contato com o solo, essa molécula pode passar por processos de transformação, interação com outras moléculas, ser transportada ou mesmo permanecer nestes locais (SPADOTTO, 2002). O transporte dessa molécula no solo pode-se dar por meio da lixiviação, volatização e escoamento superficial (MONQUERO, 2014) e em períodos chuvosos o risco da disseminação dos contaminantes é ainda maior (LIMA; GURGEL, 2018) acarretando contaminação de superfícies aquáticas, rios, lagoas, açudes e até mesmo sistemas de abastecimento às comunidades (Figura 2). Além disso, estas substâncias podem afetar o funcionamento do solo quando o composto ativo torna-se persistente, como por exemplo, na ciclagem de nutrientes, interferindo na ação de bactérias fixadoras de nitrogênio (EDWARDS, 1989) ou diminuindo a fertilidade do solo (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007).

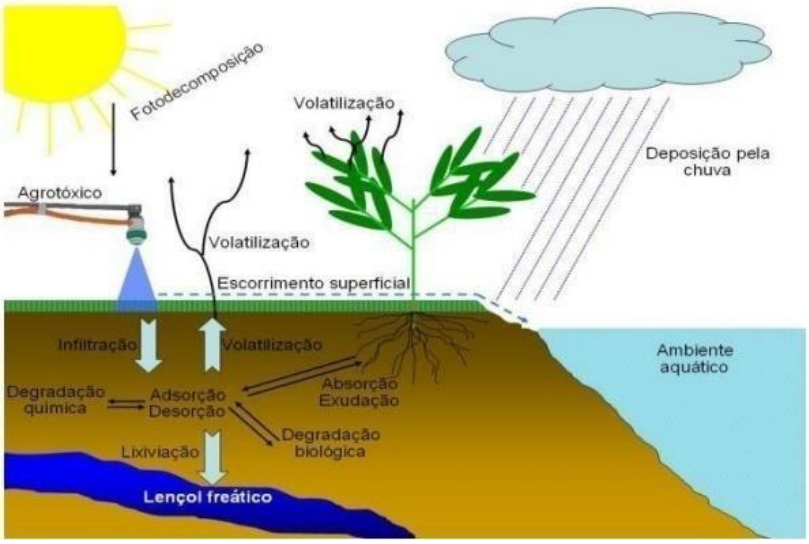

Figura 2: Representação do percurso dos defensivos agrícolas no solo.
Fonte: STEFFEN; ANTONIOLLI, (2011).

Alguns defensivos agrícolas já foram encontrados no solo e na água, sendo na maioria das vezes inseticidas, herbicidas e fungicidas (GUIMARÃES, 2011) produtos

como clorpirifós etil, lamda cialotrina, metomil, mancozeb, triadimefon, atrazina, metribuzina, simazina, flumetsulan, fomesafen, glifosato, imazetapir, imazoquin, metolaclor, clorimuron etil e o 2,4D. Porém, a contaminação nestas áreas por defensivos agrícolas pode não indicar a presença de apenas o composto ativo do produto, pois muitos deles além do princípio ativo, contém outros compostos em sua composição como metais pesados, surfactantes, emulsificantes, entre outros (COSTA et al., 2004).

De uma forma geral, observa-se um aumento ainda maior da contaminação no ambiente. Somente em 2001 foi estimada uma contaminação ambiental de aproximadamente 2,27 milhões de toneladas de produtos químicos, dos quais 35% dos resíduos lançados no ambiente eram herbicidas. Alguns ambientes já requerem um processo de remediação, especialmente na Europa que possui cerca de 2,5 milhões de locais contaminados (VAN LIEDEKERKE; PROKOP; RABL-BERGER et al., 2014).

A contaminação na água e no solo tem favorecido o risco de exposição humana aos defensivos agrícolas (LIMA; GURGEL, 2018). Esta exposição pode ocorrer por via oral ou dérmica. Conforme divulgado pelo Comitê Científico de Toxicidade, Ecotoxicidade e Ambiente (CSTEE), a exposição de humanos em contato com defensivos agrícolas pode gerar diversos tipos de problemas na saúde, como por exemplo, alterações na fertilidade reprodutiva reduzindo o número de espermatozóides ou causando até mesmo deformações físicas (CTEE, 1999). Há vários relatos associando o uso de defensivos agrícolas com o surgimento de vários tipos de cânceres tais como de testículos, mamas e próstata entre outros (FRIEDRICH, 2013).

Os níveis de intoxicação de humanos por herbicidas podem ser classificado em agudo (leve, moderada e grave) e crônico (exposição ocupacional ou ambiental) (CAMPANHA PERMANENTE CONTRA OS AGROTÓXICOS E PELA VIDA, 2017). Dependendo de fatores relacionados ao tipo de produto, a via de contato, a quantidade de composto absorvido e o tempo de exposição, a intoxicação pode evoluir de um quadro clinico para outro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; PERES e MOREIRA, 2007; PERES et al., 2014).

2.3-Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4- D)

O Ácido 2,4-diclorofenoxiacético, também denominado 2,4D é um herbicida pós emergente (ROBINSON et al., 2012), com peso molecular baixo e contém em sua estrutura duas moléculas de cloro ligadas a um grupo fenóxi e a um grupo carboxílico

(GEORGE et al., 1963) (Figura 3). Pertence à família dos herbicidas clorofenoxiacético (ANVISA, 2001) e de acordo com a (Tabela 4) de toxicidade é classificado como extremamente tóxico (classe 1). É encontrado no comércio na forma líquida, pó solúvel, grânulos ou "*pellets*" e em formulações ácidas, sal e ésteres (TU et al., 2001). Apesar de ser um ácido fraco, a alta polaridade deste composto pode se apresentar na forma salina (BRITISH CROP PROTECTION COUNCIL, 1994).

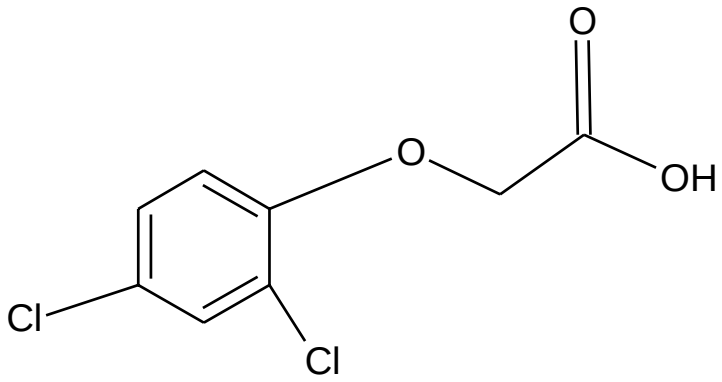

Figura 3: Estrutura química do 2,4D.
Fonte: o autor adaptado.

O 2,4D foi o primeiro composto orgânico com características de amplo espectro seletivo, com ação sistêmica e de baixo custo (MITHILA et al., 2011) comercializado pela indústria durante a segunda guerra mundial. Esta substância é utilizada há mais de 60 anos em diferentes formulações no intuito de controlar plantas anuais indesejáveis nos cultivares de trigo, arroz, aveia, cevada, milho, soja, sorgo café, cana-de-açúcar, e pastagens (GREEN, 2014; RODRIGUES; ALMEIDA, 2011). Nos últimos anos tem ganhado destaque na indústria de defensivos agrícolas por causa de suas propriedades físico-químicas (Tabela 4) (LEMUS, 2008).

Apesar do 2,4D auxiliar no pré-preparo das culturas, as constantes aplicações em doses altas deste composto no solo tem acarretado inúmeros problemas ambientais (ZHOU, et al., 2016; LAURENT, et al., 2000) afetando anualmente no mundo ± 1.100 milhões de hectares causando nesses ambientes processos de desertificação, erosão e a lixiviação, que muitas vezes ocorre em locais próximos a superfícies aquáticas e zonas urbanas (LAL, 2008). Além disso, este processo pode aumentar o risco de contaminação da água e consequentemente ser consumido pela população devido ao deslocamento do resíduo (BORGGAARD e GIMSING, 2008; LANE et al., 2012) afetando a saúde de humanos e animais (LIAN et al., 2014; GLEICH et al., 2011; SMITH et al., 2011).

Além dos problemas mencionados anteriormente, a presença de 2,4D no solo pode provocar uma diminuição na população microbiana (ISLAM et al., 2004) alterando a diversidade e atividade de algumas espécies (MONKIEDJE et al., 2002; GIRVAN et al., 2004) envolvidas em processos de oxidação do metano (CH^{+4}) (HUTSCH, 2001), nas atividades metabólicas (OLIVEIRA e PAMPULHA, 2006), ciclagem de nutrientes e outras atividades essenciais para funcionamento do solo.

Tabela 4: Propriedades físico-químicas do herbicida 2,4D.

PROPRIEDADES	
Massa molar (g/mol)	221,03744
Fórmula molecular	$C_8H_6C_{l2}O_3$
Solubilidade em água a 25ºC (mg /L)	900
Solubilidade em metanol 19,7 a 20,3ºC (g/L)	392,8
Volume molar (cm3)	148,2
Ponto de fusão (ºC)	162,8
Ponto de ebulição (ºC)	345,6
Cor	Branco
Textura	Cristalino
Refratividade molar (cm^3)	48,91
Área superficial polar (A)	35,53
Densidade absoluta (g/cm^3)	1,488
Pressão de vapor (mmHg a 25ºC)	2,31.10-5
PKa	2,8
CAS	95-75-7

Fonte: CASTRO, 2010.

Por isso, são necessários estudos em relação a persistência no solo do 2,4D, pois ela é relativa e há uma variação de ambiente para ambiente (SALMAN e AL-SAAD, 2012) onde ocorre a contaminação. Devido a molécula do 2,4D ser resistente a degradação biológica e química esta se mantém tóxica no solo por extensos períodos de tempo (ATAMANIUK et al., 2013; FIGGS et al., 2000; BRILLAS, CALPE, CABOT, 1986; HOOVER, BORGONOV, JONES, ALEXANDER, 1986; RAJESWAI, KANMANI, IRAN, 2009 e SATO, MATSUDA et al., 2009). Os fatores que tem influenciado nessa persistência variam de acordo com o tipo e o pH do solo, consequentemente observa-se um aumento no período de permanência do herbicida no solo em torno de 5 a 17 dias (PINHEIRO; MORA; SILVA, 2011). Alguns trabalhos já evidenciaram a ação recalcitrante desta substância encontrando resquícios de 2,4D em quantidades variadas no solo e na água (FELIX-CARIEDO et al., 2013; KUSTER et al., 2008).

2.4- Imazapyr®

O herbicida ácido 2-4,5-di-hidro-4-metil-4-1-metiletil-5-oxo-1H-imidazol-2-il-3-piridinacarboxílico (Imazapyr®) como é conhecido popularmente (Figura 4), é um herbicida de amplo espectro não seletivo (LEE et al., 1991) que pertence ao grupo químico das imidazolinonas. É classificado como um herbicida altamente toxicológico de nível II e III para o ambiente com suas características químicas e físicas representadas na Tabela 5. É um composto solúvel em água (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011) e bastante usado em culturas pré e pós-emergentes desde 1984, quando foi registrado pela primeira vez pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA, 2006) no controle de monocotiledôneas e dicotiledôneas anuais e perenes (TU, et al., 2001). Além dos cultivares esse composto é aplicado em ambientes como áreas de recreação, campos de atletismo e campos de golfe (EPA, 2006).

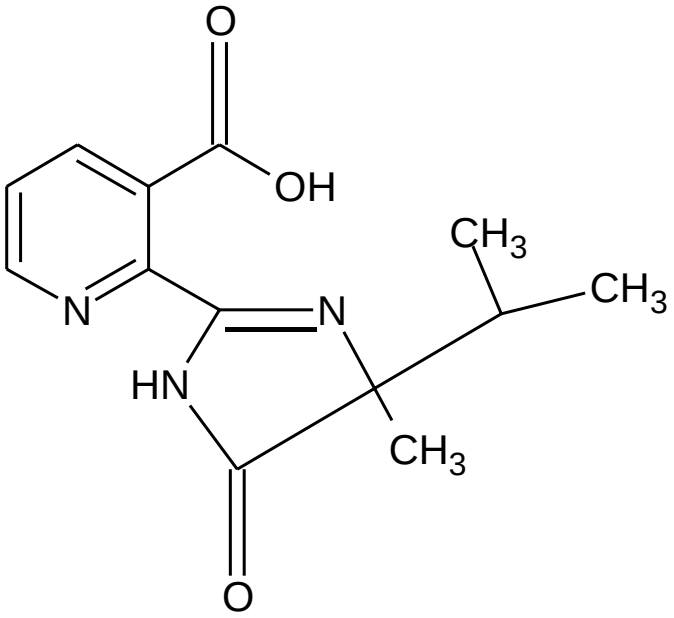

Figura 4: Estrutura química do Imazapyr®.
Fonte: o autor adaptado.

Embora esta substância tem sido utilizada no controle de plantas daninhas nestas áreas, os herbicidas do grupo químico das imidazolinonas, em especial o Imazapyr® tem sido relatado como um dos herbicidas que mais causam lixiviação no solo (ROTTERDAM CONVENTION 2001; SOUZA et al.; 2016). Este evento também depende das características físicas e químicas do solo tais como, umidade, pH e quantidade de matéria orgânica, além das precipitações de chuvas, irrigações em

plantações, fatores sazonais ou mesmo a composição molecular do herbicida (VENCILL, 2002; SILVA et al., 2007). Na maioria das vezes, a lixiviação deste composto ocorre em áreas que apresentam solos arenosos por causa da diminuição de umidade, do pH e da textura do substrato (SOUZA et al., 2000).

Tabela 5: Características químicas-físicas do Imazapyr®.

Propriedades físico-química do Imazapyr®	
Nome químico	ácido 2- 4,5-di-hidro-4-metil-4- 1-metiletil -5-oxo-1H-imidazol-2-il - 3-piridinacarboxílico
Fórmula molecular	$C_{13}H_{15}N_2O_3$
Massa molecular (g/mol)	261.28
Solubilidade em água a 25ºC (mg /L)	11.1
pKa	3.8
Pressão de vapor a 60°C	<7 x 10-17 atm x m3/mol

Fonte: Adaptado de Table IIS-2 (p. 12) in Level I Screening Risk Assessment (US EPA, 2005A).

O aumento da temperatura tem sido apontado por alguns autores como um facilitador da absorção do Imazapyr® no solo (WANG e WEIPING, 1999; JENKINS, et al., 2000), contrariando o observado em outros herbicidas normalmente onde a temperatura alta induz a uma diminuição na absorção do composto (BIGGAR e CHEUNG, 1973; FUSI et al., 1993). Consequentemente, com o aumento de temperatura e maior absorção no solo, o risco de erosão através da translocação do resíduo é maior podendo alcançar uma profundidade entre 1,5m a 3m abaixo da superfície (RAHMAN et al., 1993), maior persistência do resíduo nesses solos, e a contaminação na água (BUSH PB et al., 1995; B€ORJESSON, TORSTENSSON, STENSTR€OM, 2004).

O Imazapyr® no solo pode permanecer por mais tempo nesses locais variando entre ± 25 a 142 dias após aplicação (SENSEMAN, 2007; VIZANTINOPOULOS e LOLOS, 1994; NISSEN, SHER e NORTON, TAMARISK, 2010; VILLA et al., 2006). Em locais de clima temperado a persistência do composto pode chegar de três meses a dois anos no solo principalmente em solos contendo pH entre 5 e 9 (MALLIPUDI et al., 1991). A persistência desta substância pode acabar comprometendo futuramente o processo de desenvolvimentos de algumas culturas (HART et al., 1991) como por exemplo, o arroz convencional (PINTO et al., 2009).

De acordo com estudos de Vizantinopoulos e Lolos (1994) a presença deste resíduo já foi constatada em várias áreas de cultivo, onde 40% a 70% do composto do

herbicida foi identificado à uma profundidade de até 45cm. Por isso são necessários mais estudos sobre o comportamento deste herbicida no solo ao longo do tempo devido às poucas informações que estão disponíveis na literatura (MONTOYA, PORFIRI, ZELAYA, 2010; COSTA, APARICIO, ZELAYA, GIANELLI, BEDMAR, 2011).

2.5-Remoção de resíduos contaminantes no solo através da Biorremediação

A contaminação ambiental em 2001 foi estimada em mais ou menos 2,27 milhões de toneladas de produtos químicos, dos quais 35% dos resíduos lançados no ambiente eram herbicidas. Dessa forma, alguns ambientes já requerem um processo de remediação, especialmente na Europa que possui cerca de 2,5 milhões de locais contaminados (VAN LIEDEKERKE; PROKOP; RABL-BERGER et al., 2014).

A descontaminação de áreas contaminadas por produtos químicos é realizada através de um diagnóstico ou uma análise indicando a situação nesses ambientes para aplicação de técnicas mais adequadas para cada situação (FRUTOS et al., 2012; SMITH et al., 2015). Segundo DER (2014), o responsável por pedir a avaliação e realizar a ação de remediação nos locais contaminados é o proprietário do local. Em áreas agrícolas contaminadas por herbicidas, a responsabilidade é dos agricultores, porém isso nem sempre acontece devido aos métodos de descontaminação que existem hoje serem caros, inviabilizando este tipo de prática devido às restrições financeiras para executá-la. (PERELO, 2010).

Por isso, leis regulamentares começaram a ser criadas para o tratamento de resíduos no solo a partir de processos de remediação (BRITO et al., 2004) para melhorar a qualidade ambiental pensando na preservação dos recursos naturais (solo e água) (AVANZI et al., 2009). Alguns países desenvolvidos já fazem uso dessas leis (REMEDIATION PROCESS GUIDE, 2011) visando inovações tecnológicas em conjunto com sistemas ecológicos, mais acessíveis e de fácil manutenção.

A alternativa mais aplicável hoje é a biorremediação que é uma tecnologia antiga que teve início na década de 1940 (ZOBELL, 1946). Este processo emprega organismos vivos tais, como por exemplo, fungos e bactérias que possuem a capacidade de degradar, imobilizar ou reduzir compostos residuais (orgânicos e inorgânicos) adicionados no solo (MELO et al., 2008). De acordo com KIRCHHOFFM (2003), é considerada uma ferramenta, denominada ‘engenharia verde’ ou “*Green Engineering*” e a vantagem do uso

dessa prática é que ela possui um menor impacto ambiental (HINCHEE, et al., 1994; CHAUDHRY, 1994) e ainda recupera o solo com alta eliminação de compostos quando comparada com outras técnicas como incineração, lavagem e aterro (JIANG, YANG, FAN et al., 2012; P. ZHAO, WEN-JING, WANG et al., 2012). Além disso, a sua eficiência é considerada amais viável por possuir menor custo (BORÉM, 2005; ANDRADE, 2010).

A biorremediação por meio de microrganismos contribui para a redução residual presente no ambiente, principalmente os herbicidas (ARAÚJO, 2002) (Figura 5). De acordo com VIDALI (2001) os microrganismos foram distribuídos em grupos conforme o composto e o meio mais eficazes metabolicamente de degradação para se usar na biorremediação (Tabela 6). Com isso o processo de metabolização dessas substâncias envolve princípios baseados na disponibilidade dos resíduos e nas condições ambientais ideais para desenvolvimento de cada microrganismo (MILIC et al., 2009; HARA et al., 2013; SINGH e CHANDRA 2014; MENEGHETTI, 2007).

Certas condições como a da temperatura podem influenciar direta ou indiretamente na degradação de defensivos agrícolas por microrganismos, pois muitos deles em temperaturas baixas são menos eficientes levando mais tempo para degradar (LEAHY; COLWELL, 1990; BORÉM, 2005; ANDRADE et al., 2010). Por outro lado, em temperaturas mais altas (entre ±25ºC e 30°C) o composto é metabolizado mais rápido ocasionado uma maior eficiência (ANDRADE et al., 2010). Outro fator é o pH, em solos com pH ácido pode ocorrer redução na microbiota quando comparados com solos que apresentam pH entre 5,1 e 8,1 (TIAN e CHEN, 2012).

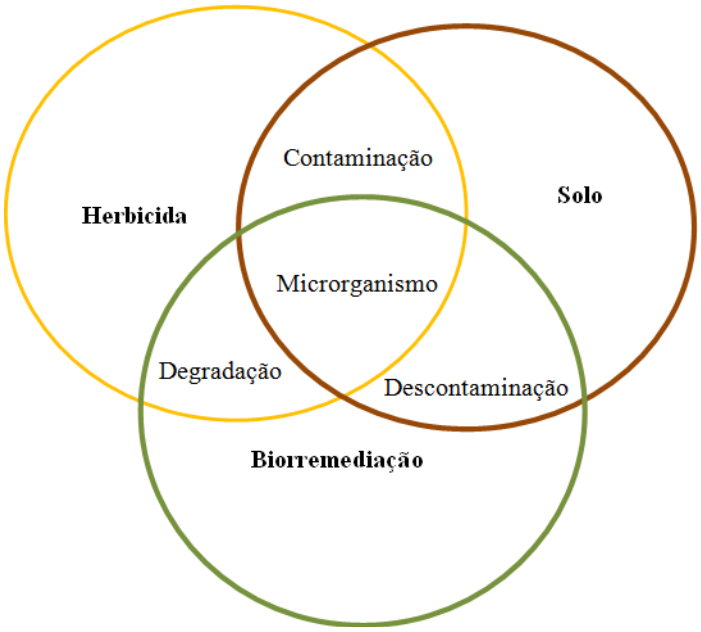

Figura 5: Diagrama representando a correlação entre a biorremediação, herbicida e solo. Fonte: o autor.

Tabela 6: Classificação dos microrganismos empregados nos processos de biorremediação do solo, via metabólica e dados recentes da literatura sobre sua aplicação. PAHs = Aromático Policíclico e Hidrocarbonetos, PCBs = Bifenilospoliclorados.

Microrganismo	Metabolismo	Efetivo para	Referências
Aeróbico	Metabólico	Pesticidas	*Krishna, K. R., and Philip, L. (2011).*
		Hidrocarbonetos	*Castelo-Grande, T. et al 2010; Rodrıguez-Meza, M. A., et al 2010*
		PAHs	*Biswas, S. S. K., et al 2005; Lei, L., Khodadoust, A. P., et al 2005; VenkataMohan, S., 2009.*
	Co-metabolismo	Herbicida	*Robles- Gonz´alez, I., 2006*
		PAHs	*Sayara, T., Sarr`a, M., andS´anchez, A. (2009).*
		Explosivos	*Clark, B., and Boopathy, R. (2007); Sheibani, G., Naeimpoor, F., and Hejazi, P. (2011).*
Anaeróbico	Metabólico	PCBs	*Vasilyeva, G. K., and Strijakova, E. R. (2007).*
		Solventes clorados	*Pavlostathis, S. G., Prytula, M. T., and Yeh, D. H. (2003).*
		Herbicidas	*Robles-Gonz´alez, I., et al 2006*
	Co-metabolismo	Pesticida	*Quintero, J. C., et al 2006;*
Biomassa fungos	Metabólico	PCBs	*Vasilyeva, G. K., and Strijakova, E. R. (2007).*
		PAHs	*Garon, D., Sage, L., and Seigle-Murandi, F. (2004); Garon, D., Sage, L., Wouessidjewe, D., and Seigle-Murandi, F. (2004).*
	Co-metabolismo	Pesticida	*Quintero, J. C., L´u-Chau, T. A., Moreira, M. T., Feijoo, G., and Lema, J. M. (2007)*
		Organoclorados	*Jiang, X., Zeng, G., et al 2006*
	Biosorção	Corantes	*Abd El Rahim, W. M., Moawad, H., and Khalafallah, M. (2003).*
Metilotróficos	Co-metabolico: o metano éa fonte de carbono e energia	Alifático clorado, tricloroetileno 1,3-dicloroetano	*Vidali, M. (2001).*

Fonte: Artigo-Ex Situ Bioremediation of Contaminated Soils: An Overview of Conventional and Innovative Technologies.

Contudo acredita-se que o sucesso da biorremediação de compostos em ambientes contaminados pode estar atrelado diretamente aos microrganismos isolados destes ambientes (VERMA e JAISWAL, 2016), pois apresentam maior taxa de degradação já que se encontram adaptados quando comparados a espécies que nunca foram expostas (LEAHY; COLWELL, 1990; ANDRADE et al., 2010). Esta característica possibilita estes microrganismos sobreviverem à ambientes inóspitos (CASTILLO et al., 2011) usando como única fonte de carbono compostos herbicidas (ALEXANDER, 1999; MASTER; MOHN, 1998). No entanto, apenas 10% das espécies bacterianas que vivem no solo conseguem ser cultivadas em laboratórios através de meios de cultivo (CYCON; PIOTROWSKA-SEGE, 2009). A única fonte para seu crescimento em meio seletivo é a própria molécula de carbono presente nestes pesticidas, assim os mesmos podem degradar estes compostos.

2.6-Microrganismos usados na biorremediação de defensivos agrícolas

Muitos microrganismos apresentam capacidade para serem utilizados na biorremediação de ambientes, pois apresentam enzimas capazes de metabolizar compostos como pesticidas, fungicidas e herbicidas em níveis diferentes de concentração (PATTANASUPONG, NAGASE, INOUE et al., 2004). Isso ocorre principalmente através de processos de respiração, fermentação ou por co-metabolismo (CETESB, 2004) realizado por bactérias e fungos.

A degradação do defensivo agrícola no solo através das bactérias é realizada a partir de dois processos: a atividade aeróbica (usado em descoloração) e anaeróbica (usado para compostos cíclicos, aromáticos ou alifáticos) (BARRAGÁN-HUERTA, et al., 2007; BACZYNSKI, PLEISSNER, GROTENHUIS 2009). Já os fungos utilizam sistemas enzimáticos para realizar a degradação dos compostos (PEPPER et al., 1996). A atividade enzimática é bastante eficiente quando comparado com às tradicionais catálises químicas e físicas, que geralmente são empregadas (RAO et al., 2014). As enzimas utilizadas na degradação são divididas em extracelulares, que ocorrem a partir da secreção de enzimas pelo fungo reagindo com a molécula da substância e intracelulares metabolizadas por meio da absorção do produto (BOLLAG, 1974).

A vantagem de usar fungos na biorremediação ao invés de bactérias, é que os fungos conseguem cobrir uma área contaminada maior devido às características

morfológicas. Isto se deve principalmente a sua estrutura micelial que promove a disseminação de suas hifas (DIX; WEBSTER 1995) e a capacidade de renovação das mesmas, além de possuir maior resistência a altas concentrações de toxinas (EVANS, HEDGER, 2001). Outro fator é a atividade enzimática dos fungos em relação às bactérias, no caso das bactérias, estas necessitam serem expostas aos compostos para induzir o sistema enzimático necessário para a degradação. Em concentrações baixas do composto não são capazes de expressar as enzimas (ADENIPEKUN e LAWAL, 2012).

Por outro lado, o processo de degradação dos herbicidas é bem descrito mais em espécies bacterianas do que em espécies fúngicas. Um exemplo é a metabolização dos herbicidas pertencentes à família das imidazolinonas por espécies bacterianas. Em condições aeróbicas de degradação, estes compostos formam no solo metabolitos menores mineralizados (MANGELS, SHANNER, CONNER, 1991) resultando em produtos como o 7-hidroxi-furo[3,4-b]piridin-5(7H)-ona; Ido2,3-piridinodicarboxico e dois compostos cíclicos, 2,3-piridinodicarboximida e furo [3,4-b]piridin-5(7H)–ona (MALLIPUDI et al.1991). Enquanto que 2,4D (Figura 6), o processo de metabolização ocorre na maior parte das células microbianas por meio da quebra de ligação oxidativa. Esta reação está vinculada a um éter seguido de uma hidroxialquilação da molécula de clorofenol através da via cloro orto-clivada consequentemente alterada para clorocatecóis (BALJINDER SINGH e KASHMIR SINGH, 2014).

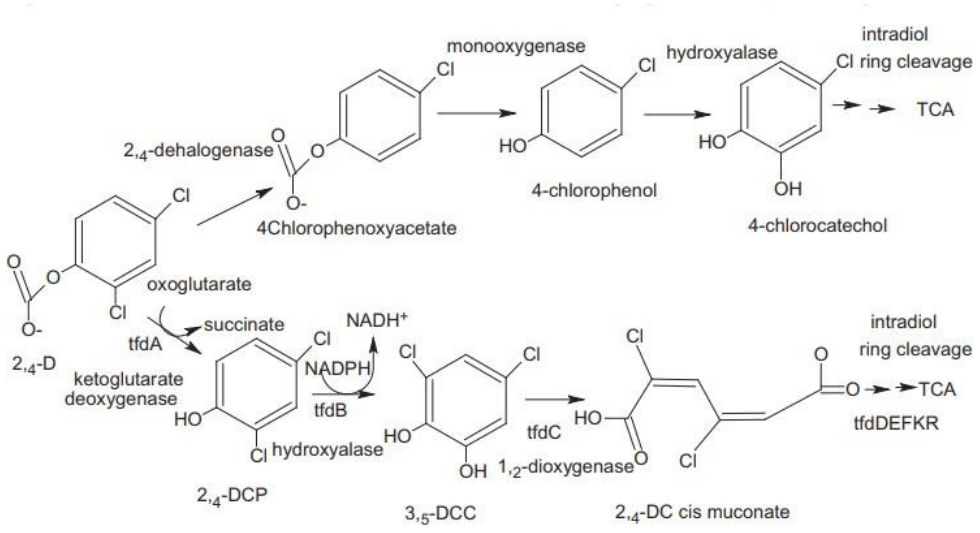

Figura 6: Degradação de 2,4 D por micróbios. 2,4-DCP,(2,4-diclorofenol),3,5-DCC (3,5-Diclorocatecol) TCA, Ciclo do Ácido Tricarboxílico.
Fonte: Artigo: Microbial degradation of herbicides.

Apesar do pouco conhecimento sobre o processo de degradação promovido pelos fungos, os mesmos vêm se destacando cada vez mais entre os grupos de microrganismos usados na biorremediação (GADD, 2001; GOLTAPEH; DANESH; VARMA., 2013). Segundo FAETH e FAGAN (2002) o número de fungos encontrados na natureza é estimado em torno de 1 milhão de espécies e geralmente, encontrados no solo ou mesmo em estruturas da planta como folha, caule, raízes e sistemas reprodutivos das flores (ARAÚJO et al., 2002). As espécies identificadas na literatura capazes de biodegradar compostos fenólicos e compostos aromáticos (SANTOS e LINARDI, 2004) são fungos de podridão branca (SINGH, 2006; ADENIPEKUN e LAWAL, 2012) e fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* entre outros. Dentre as espécies fúngicas as que mais se destacam com capacidade para degradação de herbicidas são os fungos filamentosos. Por apresentarem diversidade em oxidar substâncias (RADTKE, COOK , ANDERSON, 1994), ser tolerante ao estresse e substâncias químicas (FRAGOEIRO, 2005) e por possuir maior produção de enzimas (FRAGOEIRO, 2005; MAGAN, 2007).

2.7- O fungo *Fusarium* como degradador de herbicidas

O gênero *Fusarium* é representado por um grupo de fungos patógenos e filamentoso que pertencem ao filo Ascomycota (MACIEL, 2012). O microrganismo foi descrito pela primeira vez em 1809 e classificado como *formae speciales* ou raças (SNYDER e HANSEN, 1940). É considerada uma espécie cosmopolita, onde sua ocorrência é predominante mais em regiões de clima temperado, subtropical e tropical (FORTES, 2006). Apresenta diferenças em números de espécies nessas regiões (LESLIE; SUMMERELL, 2006) sendo identificadas mais de 1472 espécies deste gênero distribuídas em 348 variedades (SOUSA, 2010).

A identificação das espécies é baseada em três conceitos básicos: biológico, morfológico e o filogenético (LESLIE et al., 2001). O biológico é definido por meio da compatibilidade sexual de reprodução de indivíduos da mesma espécie (MACIEL, 2012). Já o morfológico é baseado nas características físicas e fisiológicas apresentadas pela espécie como a presença e ausência de clamidósporos, macroconídeos e microconídios, tipo de conidióforos, aspecto da colônia, cor e o crescimento em meio sólido (GERLACH; NIRENBERG, 1982; NELSON et al., 1981; LESLIE; SUMMERELL, 2006).

O filogenético é realizado através de análises de sequências gênicas gerando dados para a construção de informações que visem maior compreensão dessa espécie. Com o

uso de pequenas sequencias nucleotidicas denominadas *primers* é possível amplificar regiões gênicas altamente conservadas, como por exemplo, regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer Regions*), β-tubulina e fator de elongação 1-α (EF-1α) (LAURENCE et al., 2014; O'DONNELL et al., 2010; SCHROERS et al., 2004; SOUTHWOOD et al., 2012) entre outras (Figura 7). Assim as técnicas moleculares como a PCR e o sequenciamento de DNA tem sido apontadas como ferramentas essenciais para auxiliar na identificação de espécies (SILVA et al., 2013).

O *Fusarium* pode ser encontrado no solo, (MICHEREFF et al., 2005; LAZAROTTO, 2013) em tecidos vegetais, nos alimentos e até mesmo no ar (URBEN et al., 2009). Dentre as espécies que destacam-se mais abundante no solo estão *Fusarium. solani* e o *Fusarium oxysporum* (NELSON et al., 1981; SUMMERELL e LESLIE, 2011).

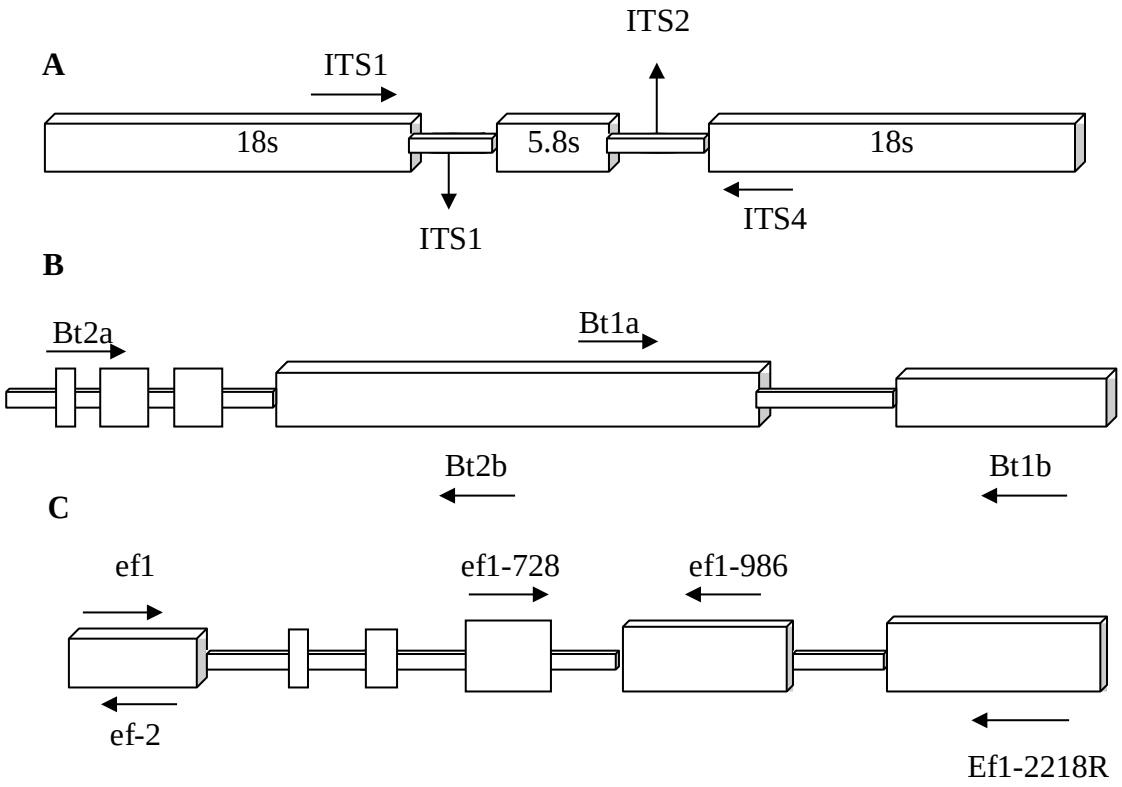

Figura 7: Localização das regiões gênicas usadas para a amplificação do gene ITS (A), β-tubulina (B) e EF (C) em *Fusarium*.
Fonte: o autor. (adaptado do artigo: A universal DNA extraction and PCR amplification method for fungal rDNA sequence-based identification).

O ciclo reprodutivo do *Fusarium* varia de espécie para espécie podendo ocorrer de forma assexuada através da formação de hifas (septadas/ramificadas) ou germinação de esporos (VERMELHO et al., 2006) e na forma sexual por meio de auto fecundação ou

cruzamento entre as espécies (RANA et al., 2017) (Figura 8). No caso das espécies *F. oxysporum* e o *F. solani* a reprodução ocorre de forma assexuada (BOOTH, 1971), produzindo estruturas reprodutivas como macroconídeos, microconídios e clamidósporos (NELSON et al., 1983).

As espécies saprófitas são de extrema importância para a descontaminação de ambientes, pois este grupo apresenta uma alta capacidade de degradar compostos no solo (CHRISTAKOPOULOS et al., 1996). Além disso, alguns estudos indicam que essa espécie é considerada um bom bioindicador em ambientes contaminados (solos e água), pois possuem a capacidade de biorremediar esses locais degradando os compostos presentes neles (SOARES et al., 2011). De acordo com os estudos de Mendonça et al., (2004) o gênero *Fusarium* tem capacidade para degradar compostos aromáticos de moléculas de resíduos agroindustriais. Esta característica se deve ao fato desse microrganismo produzir enzimas que são secretadas para degradar polímeros de origem vegetal e outras moléculas orgânicas (SILVA, 2012).

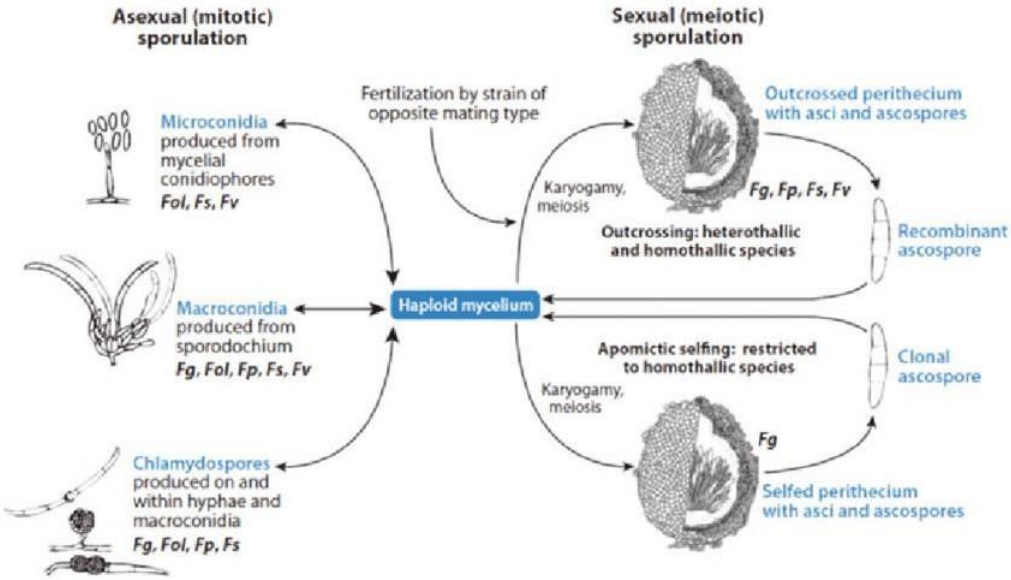

Figura 8: Ciclo de vida do *Fusarium*.
Fonte: (Ma et al. 2013).

3-OBJETIVO

Isolar espécies de fungos presentes no solo com capacidade para degradar herbicidas a partir de uma área com histórico de uso de defensivos agrícolas.

3.1-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Isolar fungos filamentosos e leveduras do solo com capacidade para degradar os herbicidas 2,4D e Imazapyr®.
2. Avaliar as características morfológicas e moleculares através da identificação dos isolados microbianos por meio do sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e β-tubulina que separa os genes 18S e 28S do rDNA.
3. Avaliar a atividade enzimática dos isolados microbianos.
4. Analisar o potencial de degradação dos herbicidas pelos isolados microbianos do solo.

4-HIPÓTESE

Os microrganismos possuem a capacidade de degradar compostos químicos aplicados no solo e entre estas substâncias estão os herbicidas.

5-MATERIAL E MÉTODO

Os experimentos deste trabalho foram realizados na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) nos campus: Dois vizinhos –PR (Laboratório de microbiologia, fitossanidade e Biologia Molecular) e Toledo/PR (Laboratório Central analítica).

5.1 Produtos químicos

Os herbicidas comerciais 2,4D e Imazapyr® foram empregados nos testes de avaliação de degradabilidade por fungos isolados. Os padrões 2,4-D (pureza, 99,9%) e Imazapyr® (pureza, 99,9%) usados na análise de HPLC foram adquiridos através da Sigma-Aldrich.

5.2-Isolamento e identificação de microrganismos degradadores de herbicida

5.2.1- Coleta de solo e Isolamento de fungos

Para o isolamento dos fungos e da levedura uma amostra de solo foi coletada de uma área com histórico de aplicação de herbicida localizada na fazenda experimental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – campus Dois vizinhos –PR (25º41´56.7”S53º05´42.3”W).

Amostras de 10g de solo foram transferidas para frascos erlenmeyers de 250mL contendo 90 mL de água destilada estéril e submetido a agitação orbital a 120 r.p.m por 30 mim na temperatura de 25±1 ºC. Posteriormente 1mL desta solução, foi retirado e inoculado em frasco de erlenmeyer de 250mL contendo 100mL de meio de mineral (MSM) conforme proposto por LIU et al., (2014). O pH do meio de cultura foi ajustado para 7.0 e complementado como única fonte de carbono os herbicidas 2,4D e Imazapyr® na concentração de 50 $mg.L^{-1}$.

Os frascos foram novamente submetidos em agitação orbital a 160 r.p.m na temperatura de 25°C por 5 dias com sucessivas adições de culturas de enriquecimento com os herbicidas. Ao Finalizar esse processo, os frascos foram cobertos com papel

alumínio e então armazenados por um período de 15 dias em temperatura ambiente sem agitação (Figura 9). Posteriormente alíquotas de 0,1 ml foram espalhadas em placas de petri contendo o meio de cultura Batata –Dextrose -Agar (BDA) e incubadas em estufa B.O.D com fotoperíodo à 25°C para o isolamento das colônias obtidas no meio de cultura e subcultivada para posterior análise.

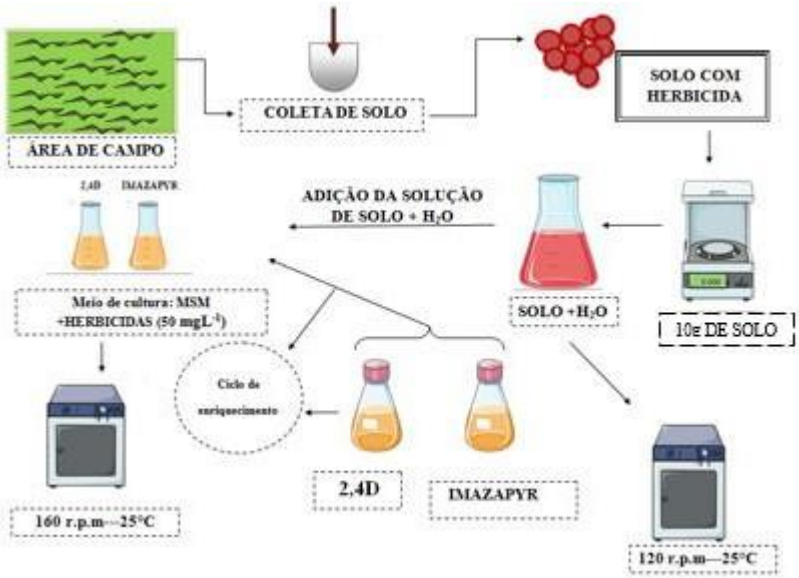

Figura 9: Representação esquemática do isolamento da cepa microbiana.
Fonte: o autor.

5.2.2-Caracterização morfológica dos isolados fúngicos

Os isolados fúngicos foram caracterizados quanto as suas características macromorfológicas e micromorfológicas.

A caracterização macromorfológica da colônia foi realizada de acordo com a coloração, forma, elevação, margem e o crescimento. Com isso foram preparadas placas de petri com os meios de cultura Meio de Sais Mínimos (MSM), Czapek-Dox, Batata Dextrose Ágar (B.D.A) e Ágar Sabouraud, suplementado com/sem os herbicidas 2,4-D e Imazapyr® na concentração de 10mg/mL. Um disco de micélio do fungo com 5mm de diâmetro de cada isolado foi inserido no centro da placa e cada tratamento foi realizado em triplicata. Em seguida as placas foram incubadas em estufa B.O.D. a 25 °C com foto período. Após 24 horas de crescimento foram realizadas as primeiras medições do diâmetro da colônia em posição ortogonal com auxilio de um paquímetro digital. A

medida da colônia foi usada para calcular o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) conforme a fórmula da equação (1) proposta por Oliveira (1991).

Eq(1).

$$IVCM = \Sigma \frac{(D-Da)}{N}$$

IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial

D= diâmetro médio atual da colônia

Da= diâmetro médio da colônia do dia anterior

N= número de dias após a inoculação

Para identificar as características como macroconídeos (o número e o tamanho dos septos), microconídeos e esporodóquio na presença ou ausência do herbicida, foram realizados análises micromorfológicas através da técnica de microcultivo. Com isso, foram preparadas duas placas de petri, com/sem a presença do herbicida 2,4 D e Imazapyr® 10mg/ml no meio de cultura ágar B.D.A. Um quadrado de $1cm^3$ do meio de cultura foi recortado e sobreposto em uma lâmina. Posteriormente com o auxílio de uma alça de platina o microrganismo foi semeado em todos os lados do cubo e uma lamínula adicionada sobre a superfície do cubo. As placas foram armazenadas em fotoperíodo em estufa B.O.D na temperatura de 25°C durante 7 dias para obtenção hifas e esporos.

5.3- Extração do DNA genômico, amplificação e sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) que separa os genes 18S e 28S do rDNA.

5.3.1- Extração de DNA da levedura e dos isolados fúngicos

O delineamento experimental das etapas do experimento está representado na forma esquemática na (Figura 10). A cultura fúngica e a levedura obtida em meio líquido foi transferida para meio sólido de ágar BDA. A partir desses isolados microbianos foi realizada a extração do DNA genômico por meio do método CTAB de Doyle e Doyle (1990). Após finalizar a extração, foi realizada uma quantificação através de um

transluminador UV avaliando a presença e intensidade do DNA genômico em gel de agarose 1%.

5.3.2- Amplificação da região genômica ITS e β-tubulina dos isolados fúngicos

A região correspondente aos genes 18S – 28S do rDNA foi amplificada com os *primers* ITS1/ITS4 descrito por White et al. (1990). Já as regiões correspondentes a β-tubulina e o fator de elongação TEF (*partial translation elongation fator 1-alpha gene*) foram amplificados com os *primers* TUB2Fd/TUB4Rde EF1-728F/EF1-986R respectivamente (GROENEWALD et al., 2013; WOUDENBERG et al., 2009; CARBONE e KOHN, 1999). As amostras foram preparadas utilizando-se um mix para as reações de PCR contendo1µl do DNA dos isolados microbianos, tampão buffer PCR 10x (5µl) Mg^+ (3 µl), dNTPs (2 µl), Taq DNA Polimerase (0,4µl), primers (2µl) e H_2O miliQ completada para um volume final de 50ul.

As reações foram realizadas em termociclador com as seguintes condições: 94ºC por 3 minutos; 39 ciclos de 94ºC por 30 segundos; 55ºC por 1 mim; 72ºC por 3 minutos e extensão final de 72ºC por 10 minutos. Para os *primers* da β-tubulina as condições foram: 94ºC por 5 minutos; 40 ciclos de 94ºC por 30 segundos; 59ºC por 30 segundos; 72ºC por 30 segundos e extensão final de 72ºC por 7 minutos.

Com o intuito de obter um produto livre de quaisquer contaminantes, as amostras da reação de PCR final foram purificadas utilizando o polietilenoglicol (PEG) segundo o protocolo de Dunn e Blattner (1987). O produto purificado da reação de PCR foi quantificado em gel de agarose a 1% e revelado por meio do transiluminador UV.

5.3.3- Sequenciamento do produto do PCR amplificado

O amplicon da região ITS e β-tubulina obtido por PCR foi sequenciado por meio da eletroforese capilar no aparelho ABI3730, utilizando o polímero POP7 e BigDye v3.1. O método consistiu no sequenciamento bidirecional do Produto final do PCR, utilizando iniciadores oligonucleotideos, sendo estes os mesmos usados na reação de PCR. A reação foi completada adicionando-se os desoxiribonucleotídeos dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, e

dCTP) marcados com corante fosforescente. Os resultados foram convertidos em eletroferograma no qual foram visualizados e interpretados através do software Bioedit. Os pares de bases obtidos após o sequenciamento foram depositadas no banco de dados do *GenBank* no site do NCBI (*www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank*). Subsequentemente as sequencias foram comparadas com outras do banco de dados *GenBank* através da ferramenta BLAST, que consiste na análise de similaridade entre sequencias por meio de um percentual (100%).

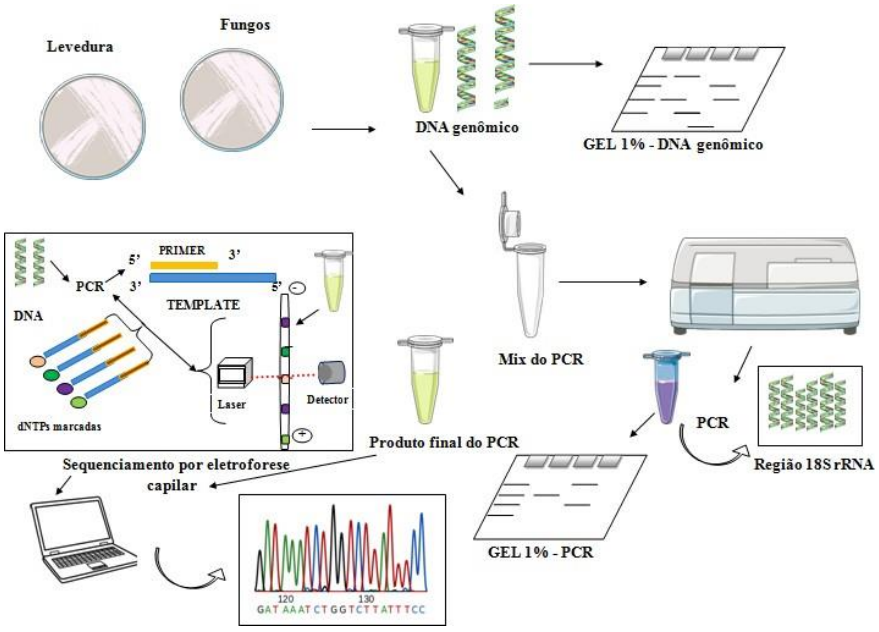

Figura 10: Esquematização do processo de extração de DNA, PCR e sequenciamento.
Fonte: o autor.

5.4-Teste de atividade enzimática dos fungos

Para verificar a produção de enzimas extracelulares dos fungos frente à presença e ausência dos herbicidas foi realizado um teste enzimático em meio sólido a partir da adição de indutoress em meio de cultura mineral (MSM).

As enzimas avaliadas foram amilase, protease, celulase e esterase aos quais foram adicionados respectivamente 1% de amido solúvel, 4% de gelatina, 1% de carboximetilcelulose (CMC) e 1% de Polissorbato 20 como substratos para enzimas

respectivamente. Com isso foram preparadas placas de meio de cultura mineral com/sem a presença dos herbicidas mais os indutores presente no meio de cultura.

Para verificar a atividade de produção enzimática pelos fungos foram inseridos no centro de cada placa petri um disco de micélio de 5mm de cada isolado microbiano. Posteriormente as placas foram armazenadas a 25°C em estufa B.O.D em fotoperíodo durante 4 dias. Para cada tratamento enzimático os testes foram realizados em triplicada.

Subsequente após o crescimento do fungo foi preparado uma solução de revelação para as placas com intuito de verificar a presença do halo de degradação. Cada placa de petri recebeu um volume de 10ml de solução de lugol a 1% no teste de amilase, de solução saturada de sulfato de amônio $(NH_4)_2SO_4$ para o teste de protease e de solução de vermelho-congo para as placas para avaliar a produção de celulase. Para o teste de esterase, as placas foram transferidas para um refrigerador e mantidas a 4ºc durante um período de 48 horas para verificação de halo.

O índice de atividade enzimática para as enzimas de amilase e protease testadas foi realizado por meio da relação halo (H) e colônia (C) (H/C), através da medição do crescimento do Halo e da Colônia em dois diâmetros ortogonais que como determinado pelo método de HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1975).

5.5 -Preparações das amostras para análise de degradação dos herbicidas 2,4D e Imazapyr® por meio da cepa microbiana isolada

Os compostos utilizados para análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência **(**HPLC) são produtos químicos com grau HPLC. Os produtos foram adquiridos através da empresa *Sigma-Aldrich*. Os herbicidas Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D) e o ácido 2- 4,5-di-hidro-4-metil-4-1-metiletil-5-oxo-1H-imidazol-2-il-3-piridinacarboxílico (Imazapyr®) possuem grau de pureza de 99,9%.

A degradação dos herbicidas 2,4D e Imazapyr®® foram avaliadas por meio da HPLC no aparelho Ultimate 3000 LC System – Thermo Fischer Detector UV/VIS em frascos de 10 mL contendo uma concentrações 10 mgL^{-1} dos herbicidas em meio de cultura. Os meios de cultura testados foram MSM e Czapek-Dox para os fungos e a levedura. Alíquotas das amostras foram retiradas a cada cinco dias em triplicatas durante 10 dias e posteriormente armazenadas a -20°C.

A preparação das amostras foi realizada utilizando-se uma membrana de filtragem tipo millipore com poros de 0,22µm no qual o líquido foi filtrado para a remoção dos resíduos. Uma curva padrão foi criada para comparações dos picos gerados no cromatograma com auxilio de padrões externos de ambos os herbicidas. As condições usadas na análise cromatográfica para os herbicidas 2,4D e Imazapyr® foram as seguintes: 2,4D - coluna C18 (4,6 cm x 250 mm, 5 µm) de fase reversa com uma solução de Metanol-água (5:95 v/v) detectado num comprimento de onda de 230nm com um volume de injeção de 50µl e com fluxo de 1,2 mL min-1 com gradiente. Para o Imazapyr® - coluna C18 (4,6 cm x 250 mm, 5 µm) fase móvel com metanol –água acidificada e 0,02% H_3PO_4 (5:95 v/v) para ser detectado num comprimento de onda de 230nm com um volume de injeção de 50µl e com fluxo de 1,2 mL min-1 com gradiente.

5.6-Análise estatística

Os dados obtidos no trabalho foram avaliados por meio do teste estatístico Mann-Whitney considerando o valor de p>005 em relação aos tratamentos aplicados.

6-RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1- Bioprospecção das espécies fúngicas

Após 10 dias de incubação das amostras do solo em meio MSM + 2,4-D e MSM + Imazapyr®, foi possível observar a presença de hifas desenvolvendo-se em ambos os meios seletivos (Figura 11). As amostras foram incubadas por mais 7 dias até obter um bom crescimento das hifas no meio de cultura líquido, posteriormente as mesmas foram transferidas para placas de petri contendo meio de cultura B.D.A e incubadas a 25ºC por 7 dias até a obtenção de colônias bem definidas. Dois isolados apresentaram caracteristicas de micélio aéreo com aspecto filamentoso, coloração variando entre branco/cinza-púrpura. As características macroscópicas das colônias destes isolados foram compatíveis com fungos do gênero *Fusarium* e estes foram denominados de Isolado 1 (I-1) obtido do meio MSM + 2,4-D (Figura 11A) e Isolado 2 (I-2) do meio MSM + Imazapyr® (Figura 11B). Posteriormente observou-se uma colônia de aspecto cremoso em uma placa de petri contendo Imazapyr®, esta froi transferida em meio MSM + Imazapyr® e após crescimento novamente em outra placa com o herbicida, esta foi denominada L-1 (Figura 11C).

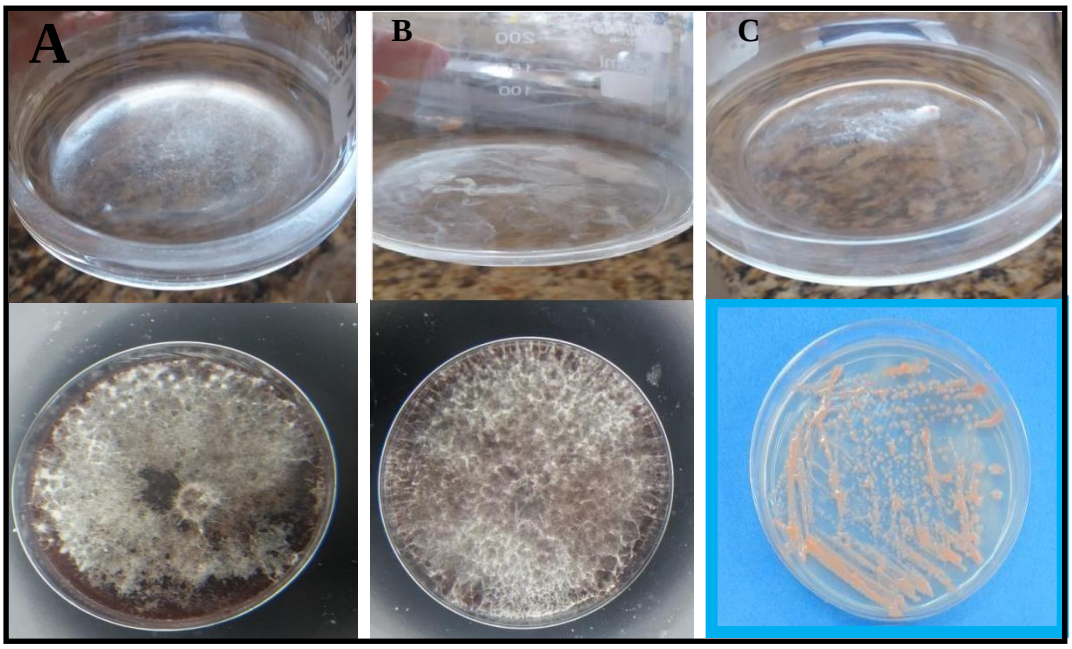

Figura 11: (A) Meio MSM contendo 50 mg/L-1 do herbicida 2,4D com desenvolvimento de estruturas similares a hifas fúngicas. Abaixo o isolado (I-1) em placa com o herbicida. (B) Presença de estruturas similares a hifas em meio contendo 50mg/L-1 de Imazapyr® em meio MSM (Isolado I-2). (C) colônia fúngica com cremoso obtida a partir de uma contaminação em meio com Imazapyr® (L-1). Todas as colônias foram semeadas em placas de meio de cultura B.D.A. Dois Vizinhos/PR, 2019.

6.2- Caracterização macro e micromorfológica dos Isolados I-1, I-2 e L-1

Embora nos últimos anos as técnicas de biologia molecular tem proporcionado grandes avanços na identificação de espécies de fungos, muitos destes organismos possuem grandes similaridades genéticas o que torna-se necessário também estudos das características morfológicas como complementação. Assim, foi realizada a caracterização de macro e micromorfológica para a identificação dos isolados de acordo com o proposto por Barnett e Hunter (1987).

As características das colônias dos isolados do gênero *Fusarium*, tais como forma, elevação, margem e cor estão apresentados na (Tabela7) em diferentes meios de cultura, conforme descrito por PRESCOTT, HARLEY e KLEIN, (2002). Os isolados I-1 e I-2 em diferentes meios de cultura apresentaram forma circular e margem filamentosa. As características de elevação e cor das colônias tiveram diferenças entre os meios de cultura, pois para os meios MSM e Czapek Dox houve a formação de uma borda plana e coloração incolor enquanto que para os meios B.D.A e Sabouraud foi observado uma borda elevada e coloração roxa e branca respectivamente. Segundo Dariva (2011), a coloração das colônias de fungo do gênero *Fusarium* variam entre branco, creme, violeta e roxo. Estas variações podem ser influenciadas pelas condições do meio de cultura tais como o pH e nutrientes (SUMMERELL et al., 2003). Espécies do gênero *Fusarium* possuem como característica micélios aéreos extensos e cotonosos apresentando no meio de cultura tons rosa, roxo ou amarelo (BARNETT e HUNTER, 1998).

Tabela 7- Características morfológicas das colônias dos isolados. Dois Vizinhos, 2019.

	I-1				**I-2**			
	Forma	Elevação (borda)	Margem	Cor	Forma	Elevação (borda)	Margem	Cor
MSM	Circular	plana	filamentosa	Incolor	Circular	plana	filamentosa	Incolor
Czapek Dox	Circular	plana	filamentosa	Incolor	Circular	plana	filamentosa	Incolor
B.D.A	Circular	elevada	filamentosa	Roxa	Circular	elevada	filamentosa	Roxa
Sabouraud	Circular	elevada	filamentosa	Branca	Circular	elevada	filamentosa	Branca

As espécies do gênero *Fusarium* podem ser identificadas através das características morfológicas (micro e macro). Observações micromorfológicas, tais como presença, tamanho e forma de macroconídeos e microconídios e formação de

clamidósporos (POLETTO et al., 2006) são extremamente úteis para a diferenciação entre as espécies. No isolado I-1 foi observado a presença de microconídios ovobóides com base truncada e sem septos, além disso, observou-se esporodóquio e macroconídios com 3 a 5 septos em uma célula basal grossa, apical e raramente entalhada (Figura 12). Os clamidósporos estavam solitários e em pares e as fiálides foram curtas em formato de garrafa. De acordo com as características trata-se da espécie *Fusarium oxysporum* (CIAMPI et al., 2009; BARNETT e HUNTER, 1987).

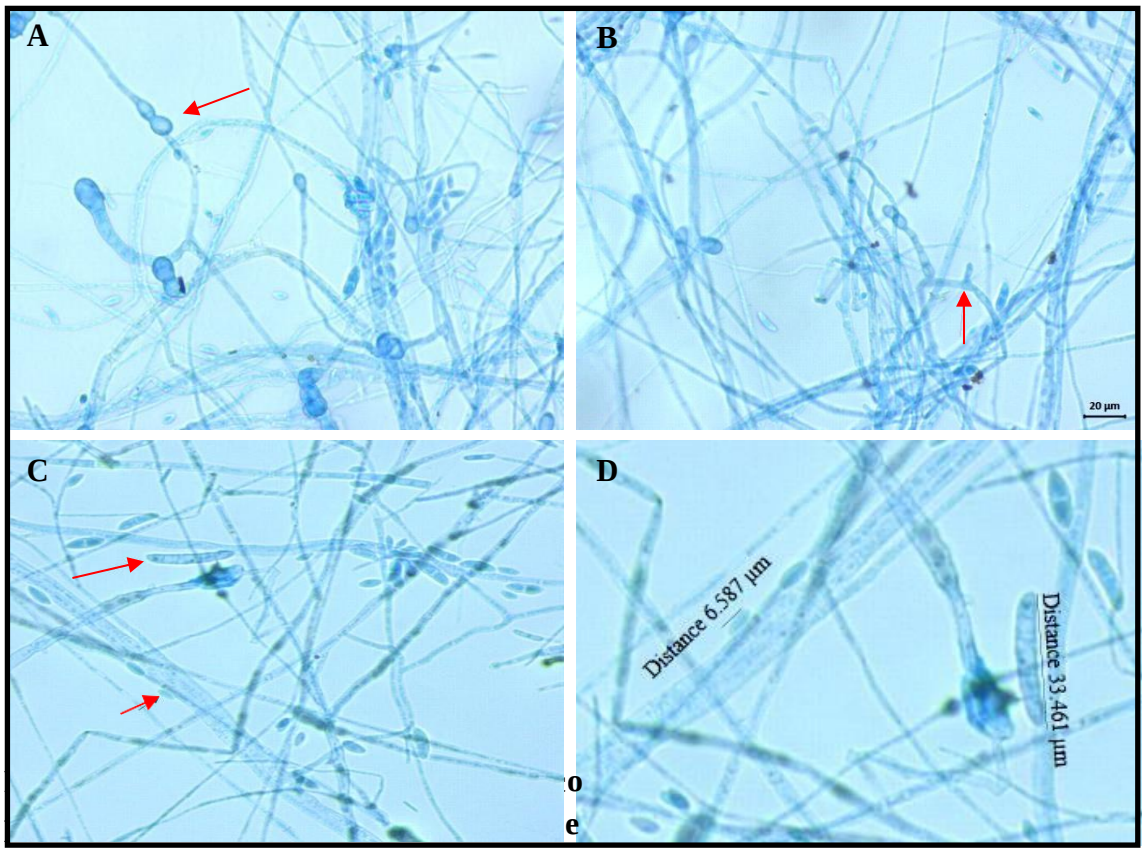

Figura 12: Esporodóquio; (C) Macroconídeo e microconídio com aspecto ovobóide; (D) Medida do comprimento em µm do microconídeo e macroconídeo com aumento total de 400X. Todas as colônias foram semeadas em placas de meio de cultura B.D.A e fotografadas após 21 dias de incubação a 25ºC com fotoperíodo. Dois Vizinhos, 2019.

As observações micromorfológicas do isolado I-2 permitiram inferir que trata-se de *Fusarium solani*, pois observou-se também microconídios obovoides, no entanto, apresentando de 0 a 1 septo formado em cabeças falsas (Figura 13). Já o macroconídeo tem de 3 a 5 septos, porém, com célula basal entalhada e apical na forma de papila. O clamidósporo é solitário, intercalar e terminal. Para Nelson et al., (1983), o que diferencia

principalmente entre as espécies de *F.oxysporum* de *F.solani* é a morfologia dos macroconídeos. Para o fungo *F. solani* a identificação também é facilitada através da forma cilíndrica e sem curvatura dos macroconídeos na sua estrutura como citado nos estudos de Dariva (2011).

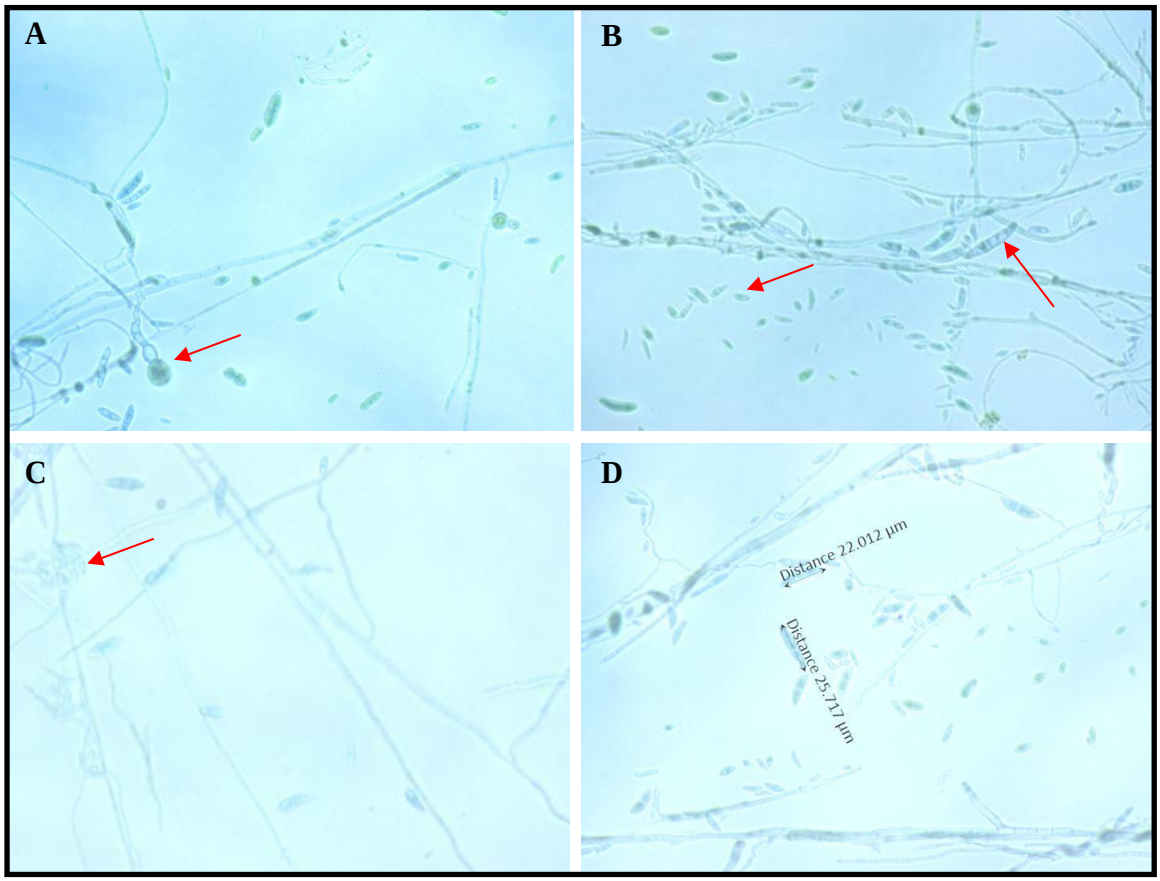

Figura 13: (A) *F. solani* indicando apresença de hifas com desenvolvimento de clamidósporos terminal e individual; (B) Presença de macroconídeo e microconídeos; (C) Microconídeos agrupados em uma cabeça falsa; (D) Medida do comprimento em µm do macroconídeo. Todas as colônias foram semeadas em placas de meio de cultura B.D.A e fotografadas após 21 dias de incubação a 25ºC com fotoperíodo. Dois Vizinhos, 2019.

Os isolados do gênero *F. oxysporum* e *F. solani, são* espécies que geralmente são encontradas no solo (SMITH et al., 1992). Em outros estudos como o Demichelli (2016) fungos dos gêneros *Fusarium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* e *Geotrichum sp* .foram isolados de solos contaminados por uso intensivo do herbicida glifosato. Já Silvia (2007) isolou os fungos *Serratia marcescens* e *Penicillium* sp. em solo contaminado com o herbicida 2,4-D. Em solos contaminados com atrazine + zimazine foram selecionados os fungos *Aspergillus sp, Penicillium sp* e *Trichoderma sp* (COLLA et al., 2008). Corrêa

(2013) em seus estudos realizados para identificação de fungos tolerantes ao herbicida glifosato identificou espécies como *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., e *Trichoderma* sp. em amostras de solos da floresta amazônica.

O crescimento da levedura L-1 em meio de cultura BDA apresentou textura cremosa com coloração entre creme-salmão. Fotos de microscopia indicaram a formação de células leveduriformes característica destes fungos (Figura 14).

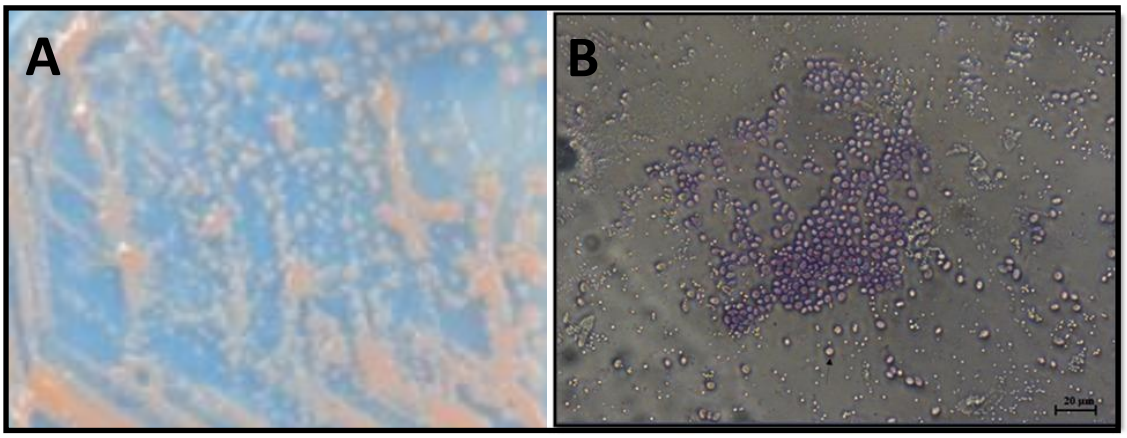

Figura 14: (A) Colônia com aparência cremosa de coloração creme-salmão característico de grupos leveduriformes; (B) Células ovóides com características leveduriformes. A placa foi cultivada em meio B.D.A e fotografadas 5 dias de incubação a 25ºC com fotoperíodo. Dois Vizinhos, 2019.

– Confirmação das espécies de *F. oxysporum* e *F. solani* por técnicas de biologia molecular

A identificação dos isolados do gênero *Fusarium* foram complementadas através da amplificação e sequenciamento do DNA genômico da região do espaçador interno transcrito (ITS) utilizando iniciadores ITS1 e ITS4 segundo a metodologia descrita por White et al., (1990). As sequencias obtidas neste trabalho apresentadas na Figura 15 foram comparadas com outras sequências armazenadas no banco de dados do *GenBank* através da plataforma de ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local *Blast* (blast.ncbi.nlm.nih.gov). Os iniciadores amplificaram uma região nucleotídica de 500pb desta região que após sequenciamento e comparação de dados, foi possível obter um índice de similaridade de 99.26% para *F. oxysporum* e 95.52% para *F. solani* (Figura 15A e 15C). De acordo com Young-Mi et al (2000) os iniciadores ITS1/ITS4 possibilitam a identificação de até 12 espécies do gênero *Fusarium* incluindo *F. solani* e *F. oxysporum*.

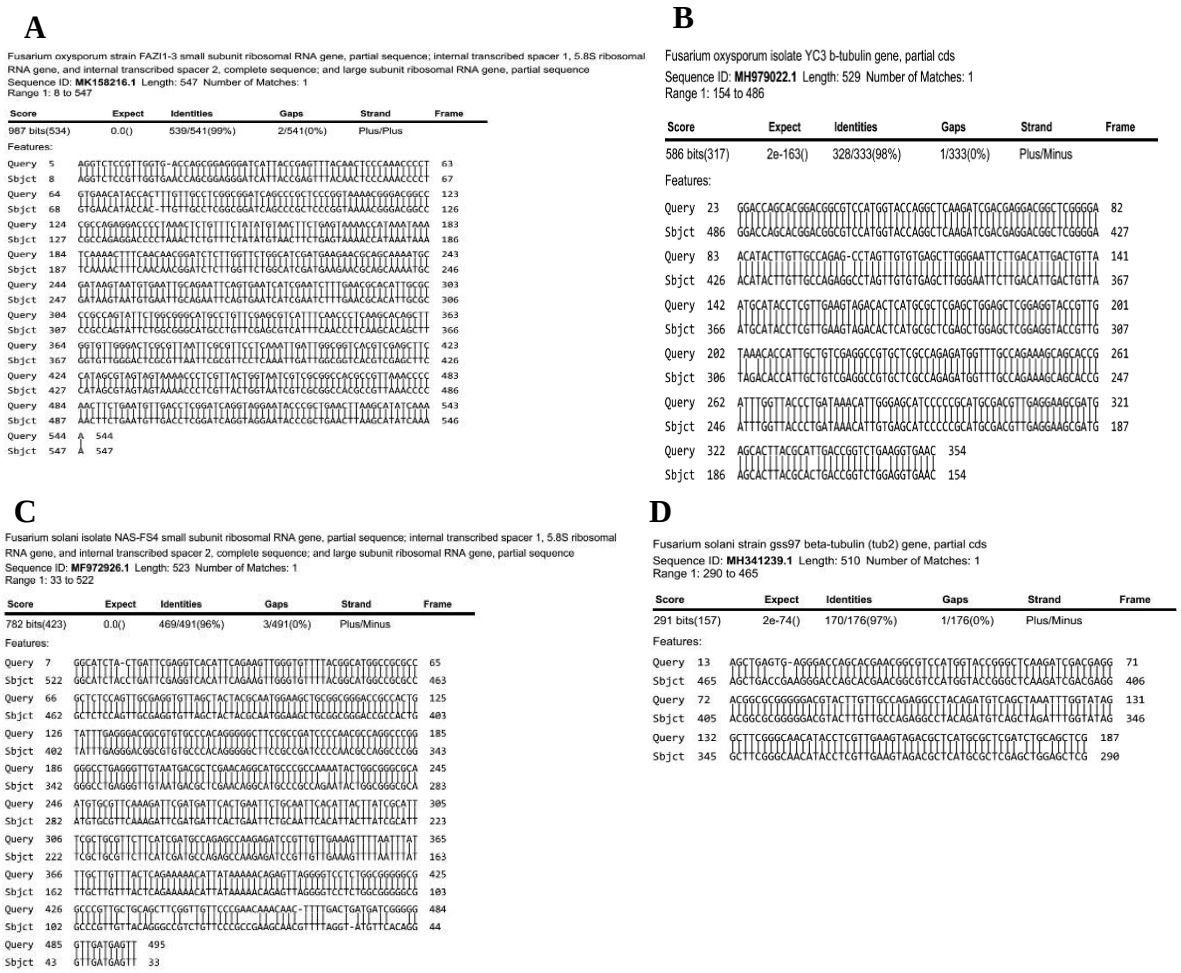

FIGURA 15: Alinhamento e índice de similaridade das sequências nucleotídicas obtidas a partir de iniciadores das regiões ITS e do gene codificante para a β-tubulina. (A) Região ITS de F. oxysporum; (B) β-tubulina de F. oxysporum; (C) Região ITS de F. solani e (B) β-tubulina de F. solani. Alinhamento obtido através da ferrament BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Porém, mesmo sendo uma região de identificação de fungos altamente conservada, a região ITS para algumas gêneros fúngicos apresenta variabilidade no tamanho e nas sequências nucleotídicas o que tem acarretado algumas incertezas quanto a confiabilidade na identificação entre as espécies de *Fusarium* (BOTELHO et al., 2005). Para contornar esta situação, foi realizado a amplificação e sequenciamento de mais de uma região gênica para a identificação (WAALWIJK et al., 1996) sendo proposto a região gênica que codifica a β-tubulina. Utilizando-se os iniciadores BT2Fd/BT4R foi possível identificar um índice de similaridade de 98.50% para o fungo *F. oxysporum* e 96.59% para *F. solani* (Figura 15B e 15D) confirmando os resultados obtidos no sequenciamento da região ITS e também nas avaliações morfológicas.

– Avaliação do crescimento micelial e alterações morfológicas dos isolados expostos aos herbicidas

Considerando que os herbicidas afetam diretamente o metabolismo de plantas e consequentemente o estado fisiológico, este trabalho também avaliou se os herbicidas 2,4-D e Imazapyr® são capazes de alterar o crescimento e também as estruturas das células dos fungos isolados. Desta forma, o crescimento micelial dos isolados fungicos *F. oxysporum* e *F. solani* foi testado em quatros meios diferentes na presença ou ausência dos herbicidas 2,4-D e Imazapyr® na concentração de 10mg/L.

O fungo *F. oxysporum*, obteve uma média de crescimento entre 69-80 mm de diâmetro da colônia após 7 dias de incubação em todos os meios de cultivo (Tabela 8) não apresentando diferença significativa quanto a presença ou ausência do herbicida 2,4-D (Figura 16). Estudos de Dariva (2011) inoculando *F. oxysporum* em meio de cultura observou um crescimento de 63,6mm após 4 dias de incubação. Para Mendes et al (2004), o herbicida 2,4-D não influenciou no crescimento micelial em espécies de *Fusarium* quando foram expostos ao produto.

Tabela 8: Média e desvio padrão do crescimento micelial do fungo *F. oxysporum* na presença do herbicida 2,4D. Dois Vizinhos, 2019.

	Crescimento micelial (medida de diâmetro em mm) de *F. oxysporum*						
	1° dia	2° dia	3° dia	4° dia	5° dia	6° dia	7° dia
Meio MSM	8.3 ± 0.4	21.9 ± 1.3	32.1 ± 1.4	49.6 ± 5.7	56.6 ± 4.5	69.9 ± 0.8	75.8 ± 1.7
Meio MSM + Herbicida 2.4D	8 ± 0.1	20.5 ± 2.5	32.7 ± 2.1	44.6 ± 1.8	56.9 ± 1.6	63.8 ± 0.9	74.2 ± 1.3
Meio Czapek-Dox	8.0 ±0.05	18.9 ± 0.7	30.5 ± 2.0	41.3 ± 1.1	54.7±1.1	66.0 ± 5.4	73.3 ± 1.3
Meio Czapek-Dox+ Herbicida 2.4D	8.1 ± 0.1	20.1 ± 0.7	30.9 ± 1.6	41.3 ± 1.0	58.2 ± 0.5	67.5 ± 4.7	74.6 ± 1.6
Meio B.D.A	11 ± 0.5	25.7 ± 1.4	35.8 ± 4.4	51.9 ± 2.4	62.15 ± 0.5	69.6 ± 2.6	80.8 ± 2.0
Meio B.D.A + Herbicida 2.4 D	11.6 ± 1.3	20.3 ± 1.4	33.5 ± 1.8	43.8 ± 6.8	51.3 ± 8.9	70.4 ± 0.5	80.2 ± 1.5
Meio Sabouraud	10.3 ± 0.7	21.7 ± 1.4	31 ± 2.4	43.8 ± 5.4	57.1 ± 7.4	67.4 ± 9.0	75.8 ± 3.7
Meio Sabouraud + herbicida 2.4D	10.3 ± 0.4	21.5 ± 0.8	30 ± 0.4	39.6 ± 2.2	50.3 ± 1.6	58.7 ± 2.3	69.5 ± 4.0

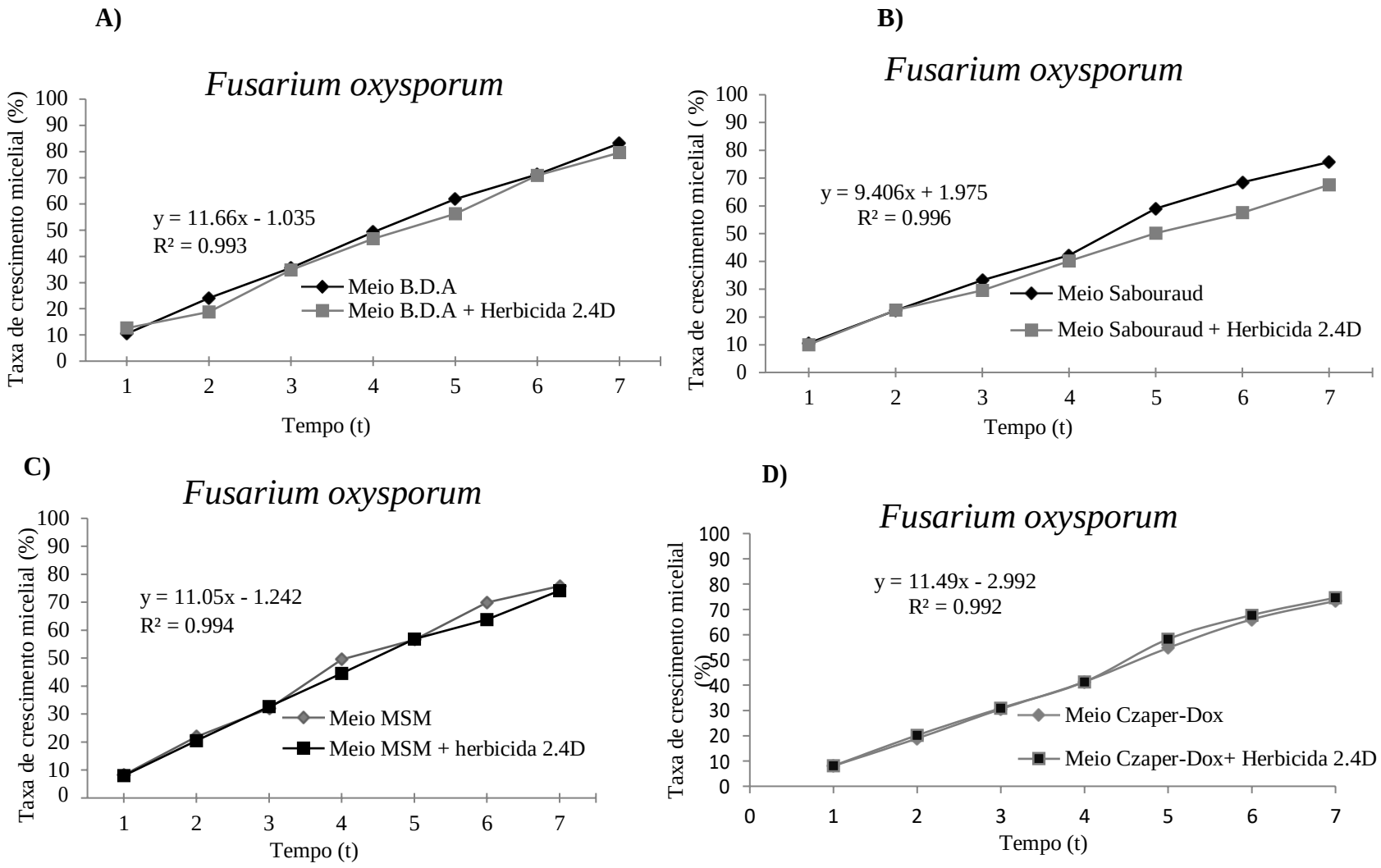

Figura 16: Crescimento micelial de *F. oxysporum* em diferentes meios de cultura na ausência e presença do herbicida 2,4D. Dois Vizinhos, 2019.

O fungo *F. solani*, obteve uma média de crescimento variando entre 70-76 mm de diâmetro da colônia durante 7 dias de incubação em todos os meios (Tabela 9). Não houve uma diferença significativa também quanto a presença ou ausência do herbicida Imazapyr® (Figura 17). Em meios B.D.A e B.S.A (Batata Sacarose Ágar) o fungo desempenha um bom crescimento micelial (SILVA e TEIXEIRA, 2012). Testes realizados em meio MSM e Czapeck-Dox com o herbicida glifosato nas concentrações entre 84,5 mg/L a 253,65 mg/L indicaram que as espécies *F. oxysporum* e *F. solani*, não tiveram o crescimento afetado na presença do herbicida em meio seletivo após 180 dias. Porém, em concentrações mais altas o herbicida acabou inibindo o seu crescimento (DEMICHELLI, 2016).

Galvão et al., (2003) afirmam que o fungo da espécie *F. oxysporum* tende a apresentar modificações na coloração e na velocidade de crescimento em diferentes concentrações de herbicida. Porém, neste estudo os resultados foram contraditórios aos apresentados pelo autor, demonstrando desenvolvimento fúngico. Testes com as concentrações de 0,002, 0,02 e 0,2 mg/g de glifosato, estimularam o crescimento das espécies *Mucor hiemalis, F. oxysporum, Mortierella alpina, Trichoderma harzianum, Sphaerospermum arthrinium, Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium nigricans* (WARDLE e PARKINSON, 1990). Confirmando as observações de Satyaprasad (2006) onde fungos como *Aspergillus sp., Fusarium sp., Penicillium sp*. e *Trichoderma sp.* foram os que melhor obtiveram crescimento estimulado quando expostos ao glifosato. O estímulo ou inibição do crescimento do fungo depende muito da linhagem e da concentração do herbicida que é testado (CARRILO e HONRUBIA, 2003).

Tabela 9: Média e desvio padrão do crescimento micelial. Dois Vizinhos, 2019.

	Crescimento micelial (diâmetro em mm) de *F.solani*						
	1° dia	2° dia	3° dia	4° dia	5° dia	6° dia	7° dia
Meio MSM	8.2 ± 0.3	20.3 ± 0.5	32 ± 3.6	48.4 ±4.6	60.2 ± 3.9	69.7 ± 2.5	76.1 ± 2.6
Meio MSM + Herbicida IMAZAPYR®	8 ± 0.0	22± 0.4	30.7 ± 1.7	44.4 ± 1	54.2 ± 5.8	68.8 ± 0.6	74.1 ± 1.7
Meio Czapek-Dox	8.5±0.2	20.3 ± 0.6	33.1 ± 0.9	47.1 ± 2.4	57.3±1.3	68.5 ± 5.4	76 ± 1.4
Meio Czapek-Dox+ Herbicida IMAZAPYR®	8 ± 0.05	20.4 ± 0.4	33.6 ± 0.5	44.5 ± 3.1	58.3 ± 1.0	68.5 ± 1.8	75.6 ± 2.7
Meio B.D.A	8.2 ±0.1	19.3±1.5	32.1±1.9	43.3±0.6	58.9±5.4	68.2±1.9	75.4±0.8
Meio B.D.A + Herbicida IMAZAPYR®	8.2±0.02	16.9±0.2	31.8±1.2	42.15±1.7	47.8±2.8	59.7±5.3	71.8±6.6
Meio Sabouraud	8.3±0.2	15.7±1.3	27.9±4.6	39.3± 5.3	54±1.3	67.7±5.6	72.7±3.8
Meio Sabouraud + herbicida IMAZAPYR®	8.2±0.2	16.5±1.9	27.1± 3.6	41.9± 6.0	49.2±3.4	61.7±6.0	70.3± 2.1

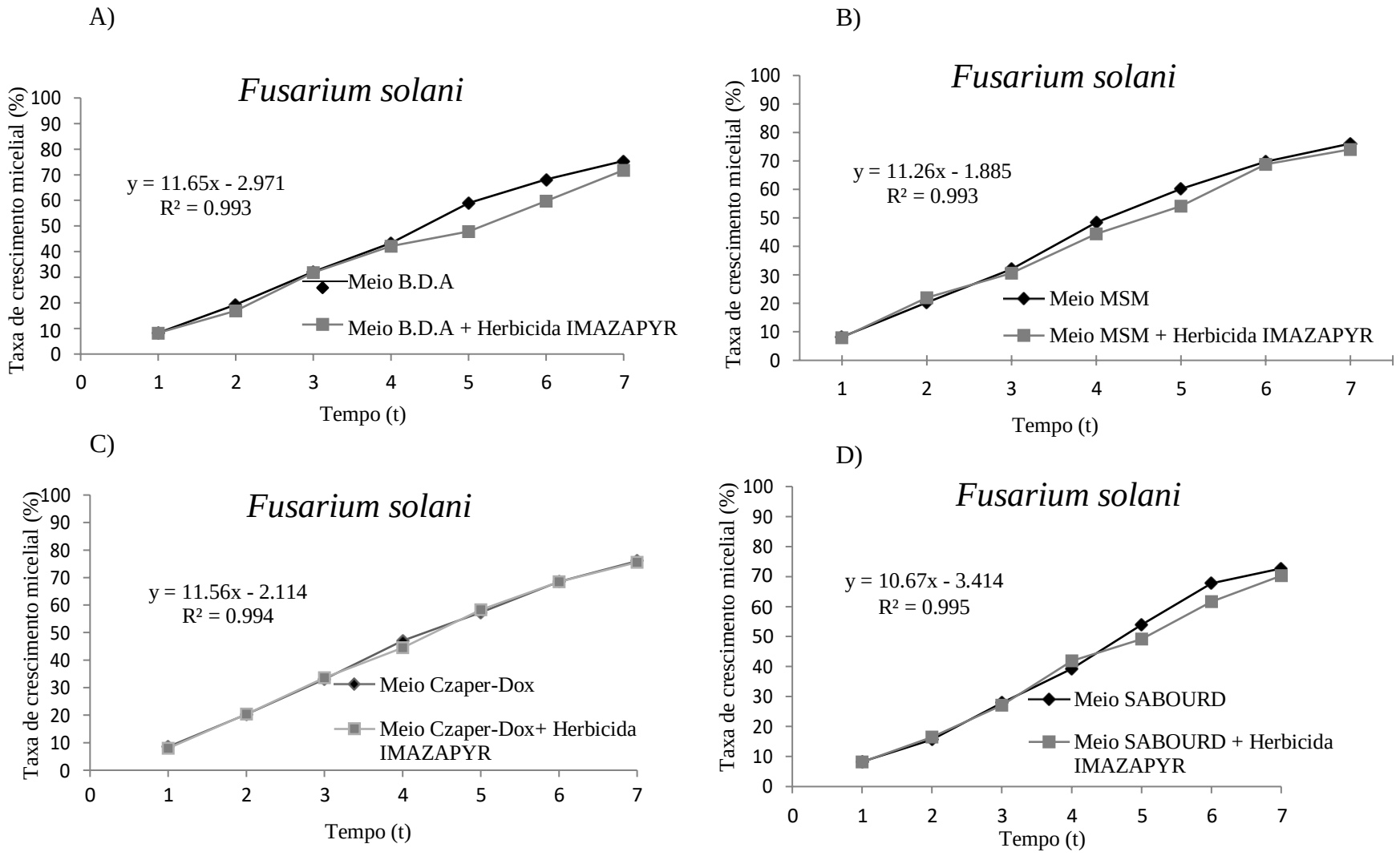

Figura 17: Crescimento micelial de *F. solani* em diferentes meios de cultura na ausência e presença do herbicida IMAZAPYR®. Dois Vizinhos, 2019.

Além disso, o crescimento do fungo é influenciado diretamente pelas características biológicas, fatores bióticos e abióticos e o tipo de enzimas por ele sintetizadas (MICHEREFF, 2005).

Na Tabela 10 estão representados os Índices de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) para os isolados de *F. oxysporum* e *F. solani* nos meios testados. Não houve diferenças significativas entre as médias testadas pelo teste Mann-Whitney no tratamento. Em testes de IVCM realizados com o fungo *Aspergillus* na presença do herbicida picloran observou-se que o composto não apresentou diferenças em relação as diferentes concentrações avaliadas (CORRÊA et a.l, 2017).

Tabela 10: Índice de Velocidade de Crescimento Médio (IVCM) dos isolados *F. oxysporum* e *F. solani* na presença e ausência dos herbicidas 2,4-D e IMAZAPYR® em diferentes meios de cultura. Dois Vizinhos, 2019.

IVCM- ÍNDICE DE VELOCIDADE DE CRESCIMENTO MICELIAL			
	F. oxysporum		*F. solani*
Meio MSM	1.3 a	Meio MSM	2.3a
Meio MSM + Herbicida 2,4-D	2.4a	Meio MSM + Imazapyr®	1.9a
Meio Czapek-Dox	2.6a	Meio Czapek-Dox	2.0a
Meio Czapek-Dox+ Herbicida 2,4-D	3.3a	Meio Czapek-Dox + Imazapyr®	2.7a
Meio B.D.A	2.0a	Meio B.D.A	3.1a
Meio B.D.A + Herbicida 2,4-D	2.4a	Meio B.D.A + Imazapyr®	1.1a
Meio Sabouraud	2.6a	Meio Sabouraud	2.9a
Meio Sabouraud + herbicida 2,4-D	2.1a	Meio Sabouraud + Imazapyr®	1.4a

Médias seguidas por mesma letra na vertical, não diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste Mann-Whitney.

As observações micromorfológicas obtidas de meio B.D.A contendo os herbicidas 2,4D e Imazapyr indicaram a presença tanto para *F. oxysporum* quanto *F. solani* de macroconídeos e microconídeos. No entanto, houve uma redução do número de macroconídeos e microconídeos de *F. oxysporum* na presença do herbicida 2,4-D quando comparado ao grupo controle. Já para *F. solani* não foi observado diferenças na quantidade de ambas as estruturas reprodutivas quando expostos ao Imazapyr® (Tabela11). Não houve alterações na quantidade de esporodóquios para ambos os fungos avaliados.

Estudo relatado por Mendes et al., (2004) avaliando espécies de *Fusarium* quando exposto ao herbicida 2,4-D verificou que não houve diferenças significativas na esporulação. Em outras espécies testadas, tais como *Trichoderma spp*, a presença dos herbicidas carfentrazone-ethyl, thiobencarb + propanil e clomazone induziu maior produção de esporos enquanto que com os herbicidas pendimethalin, clomazone e byspiribac-sodium a produção dessas estruturas foi baixa (REIS et al., 2013).

O tamanho dos macroconídeos e a quantidade dos septos fungicos em ambos os tratamentos tiveram variações nos testes. Para o fungo *F. oxysporum* observou-se a presença de 1-3 septos em meio B.D.A e de 0-6 septos em meio B.D.A + herbicida 2,4-D. O tamanho dos macroconídeos em meio B.D.A variou de 13 - 22µm e em meio B.D.A + o herbicida 2,4D foi de 13 -32µm diferindo estatisticamente ($p < 0.04$) (Tabela 12).

Conforme a descrição de Nelson et al., (1983) os macroconídeos de *F. oxysporum* apresentam um tamanho variando entre 3-6 a 25-35µm contendo em média de 3-5 septos.

Para o fungo *F. solani* foi observada a presença de 0-5 septos quando este foi inoculado somente em meio B.D.A e de 0-4septos nos macroconídeos em meio B.D.A + herbicida Imazapyr®. O tamanho dos macroconídeos em meio B.D.A variou entre 23 - 32µm e em meio B.D.A + herbicida houve uma variação entre 22 –36µm. Neste caso, houve uma variação no tamanho e significativa estatisticamente ($P < 0,003$) (Tabela 12).

Tabela 11: Caracterização da Colônia de isolados fúngicos por microcultivo na presença e ausência do herbicida. Dois Vizinhos, 2019.

	Fusarium oxysporum		***Fusarium Solani***	
	Meio B.D.A	Meio B.D.A + herbicida 2,4D	Meio B.D.A	Meio B.D.A + herbicida IMAZAPYR®
Macroconídeo	Presente > 50	Presente < 50	Presente < 50	Presente < 50
Microconídeo	Presente > 50	Presente < 50	Presente > 50	Presente > 50
Esporodoquío	Presente<50	Presente <50	Presente <50	Presente <50

Tabela 12: Número de septos em macroconídeos na presença e ausência dos herbicidas 2,4D e Imazapyr®. Dois Vizinhos, 2019.

	F. oxysporum				*F. solani*			
	Meio B.D.A		Meio B.D.A + herbicida 2,4D		Meio B.D.A		Meio B.D.A + herbicida IMAZAPYR®	
Amostra	N° de Septo	Tamanho do macroconídeo (µm)	N° de Septo	Tamanho do macroconídeo (µm)	N° de Septo	Tamanho do macroconídeo (µm)	N° de Septo	Tamanho do macroconídeo (µm)
1	3	17a	0	18b	4	24ª	4	30b
2	1	19a	1	13b	5	20ª	2	22b
3	2	14a	1	18b	1	26ª	0	34b
4	1	22a	1	19b	0	25ª	2	36b
5	1	13a	6	20b	1	22ª	0	33b
6	1	14a	1	33b	3	23ª	0	31b
7	1	14a	0	32b	0	28ª	3	29b
8	1	17a	1	17b	4	32ª	2	30b
9	1	14a	0	20b	2	26ª	4	33b
10	1	17a	1	18b	2	24ª	0	31b

6.5-Atividade enzimática de *F. oxysporum* e *F. solani*

Além das observações quanto a alterações morfológicas causadas pelos herbicidas 2,4-D e Imazapyr®, também foi avaliado a capacidade desses herbicidas em alterar o metabolismo enzimático básico dos fungos avaliados. Desta forma, foram analisados os efeitos dos herbicidas quanto a produção de amilase, protease, celulase e esterase.

O fungo *F. oxysporum* apresentou atividade enzimática para todos os substratos avaliados, obtendo-se um Índice de Atividade Enzimática (IAE) para todas as enzimas avaliadas. Os resultados não indicaram uma redução significativa na produção de enzimas quando o mesmo fungo foi semeado e incubado em meio MSM + o herbicida 2,4-D, exceto para a produção de esterase onde a relação Halo/Colônia (H/C) foi 0.28 e 0.37 para o meio MSM + substrato e meio MSM + substrato + 2,4-D respectivamente. Isto sugere que o 2,4-D induz a um aumento da produção de esterases em *F. oxysporum*.

A atividade enzimática também foi observada em *F. solani*, no entanto, observou-se um aumento da degradação de amido e celulose o fungo foi inoculado na presença do meio MSM contendo Imazapyr® com relação H/C de 0.24 para 0.39 e 0.13 para 0.21 respectivamente para amilase e celulase. Já o índice que identifica a produção de protease foi reduzido quando o fungo cresceu na presença deste herbicida, tendo valores de relação H/C de 0.31 para 0.13 (Tabela14).

Estudos apontam que tanto a atividade amilolítica (LINK e ONOFRE, 2010) quanto a proteolítica (RODARTE et al., 2011) são realizadas por espécies de fungos presentes no solo como *Fusarium* e *Penicillium* (OLIVIERI et al., 2004). De acordo com estudos de Sannino e Gianfreda (2001) e Weaver et al., (2007) o glifosato não é capaz de afetar a atividade enzimática do solo e da comunidade microbiana quando aplicado em baixa quantidade. No caso do *Fusarium* a quantidade de enzima extracelular que é produzida varia de espécie para espécie de *Fusarium* (MAIA et al., 2001). Segundo Shihata et al. (1995) espécies como *F. oxysporum, F. solani* e *F. moniliforme* são adequadas para a produção *in vitro* e *in vivo* de enzimas como celulase, pectinase, amilase e proteases

Tabela 13: Média da atividade enzimática de F. oxysporum em meio MSM contendo ou não o herbicida 2,4-D. Dois Vizinhos, 2019.

F. oxysporum						
	Crescimento Micelial (mm)		Halo (mm)		Relação halo e colônia (H/C)	
	MSM + substrato	MSM + substrato com Herbicida 2,4D	MSM + substrato	MSM + substrato com Herbicida 2,4D	MSM + substrato	MSM + substrato com Herbicida 2,4D
Amilase	50	50	24.3	22	0.48	0,43
Protease	61	63	24.4	26.1	0.40	0.41
Celulase	49	52	10.9	13.6	0.22	0.26
Esterase	42	56	15.5	21.0	0.28	0.37

Tabela 14: Média da atividade enzimática de *F. solani* em meio MSM contendo ou não o herbicida Imazapyr®. Dois Vizinhos, 2019.

F. solani						
	Crescimento Micelial (mm)		Halo (mm)		Relação halo e colônia (H/C)	
	MSM + substrato	MSM + substrato com Herbicida IMAZAPYR®	MSM + substrato	MSM + substrato com Herbicida IMAZAPYR®	MSM + substrato	MSM + substrato com Herbicida IMAZAPYR®
Amilase	33	48	12.7	18.9	0.24	0.39
Protease	70.13	53.5	37.9	17.0	0.31	0.13
Celulase	45.2	49.4	6	10.5	0.13	0.21
Esterase	35.7	33.7	13.2	13.8	0.24	0.27

6.6- Avaliação da degradação dos herbicidas 2,4-D e Imazapyr® pelos fungos *F. oxysporum*, *F. solani* e a levedura L-1 utilizando a técnica de HPLC

Os resultados das análises por cromatografia líquida de alto desempenho (Figura 18) demonstraram que o fungo *F. oxysporum* promoveu a degradação do 2,4-D de 11% e 18% nos meios de cultura MSM e Czapeck Dox respectivamente após 15 dias de incubação (Tabela 15). Segundo Vroumsia et al., (1996) as condições dos meios de cultura acabam interferindo no processo de biodegradação em diferentes linhagens de fungos. Yadav e Reddy (1993) demonstraram que o fungo *Phanerochaete chrysosporium* foi capaz de degradar e mineralizar o 2,4-D em maior quantidade quando o herbicida estava em meio de cultura rico em nutriente. Segundo os autores a melhor eficiência de degradação em meio rico justifica-se pela maior quantidade de carbono e nitrogênio no meio. Porém, é possível que meios de cultura com baixa quantidade de nitrogênio possam atuar como indutores de enzimas que degradam o 2,4-D, como foi observado em experimentos conduzidos por Vroumsia et al., (2005).

Tabela 15: Resultados da degradação dos herbicidas em mg/mL. Dois Vizinhos, 2019.

Dias	**Levedura L-1**				***F. oxysporum***		***F. solani***	
	2,4-D		Imazapyr®®		2,4-D		Imazapyr®®	
	MSM	Czapek Dox	MSM	Czapek Dox	MSM	Czapek Dox	MSM	Czapek Dox
0	0,0022	0,0020	0,006	-	0,0018	0,0027	0,004	0,005
05	0,0109	-	0,008	-	0,0017	0,0026	0,004	0,005
10	0,0113	0,0019	0,013	-	0,0017	0,0023	0,004	0,005
15	-	0,0013	0,046	-	0,0016	0,0022	0,004	0,005

O fungo *F. solani* isolado a partir do meio MSM + Imazapyr® praticamente não degradou o herbicida após os 15 dias de incubação. O desenvolvimento inicial e sobrevivência deste fungo neste meio provavelmente estão relacionados com reservas internas dos esporos, incluindo lipídeos e polissacarídeos, principalmente glicogênio (SEONG, K et a.l., 2008). Os resultados do isolado *F. oxysporum* é compatível com aqueles descritos na literatura, Fornier e Catroux (1980) observaram que um isolado de *F. oxysporum* foi capaz de biotransformar o 2,4-D entre 10-15%, já Vroumsia e

colaboradores obtiveram uma linhagem desta espécie que foi inativa para a degradação deste composto, no entanto, o isolado *F. solani* foi capaz de degradar o 2,4D em 17%.

A levedura L-1 isolada de um meio MSM contendo Imazapyr®, demonstrou um resultado atípico, ou seja, quanto mais tempo de incubação, maior foi a área no cromatograma correspondente ao herbicida. Isto foi observado com a levedura no meio MSM com 2,4-D e Imazapyr®. No entanto, quando este fungo foi inoculado em meio Czapeck Dox, observou-se o oposto, ou seja, houve redução correspondente a concentração de 2,4-D. É provável que este microrganismos esteja biotransformando ou mineralizando os herbicidas em intermediários que continuam sendo detectados na mesma região que seus compostos íntegros.

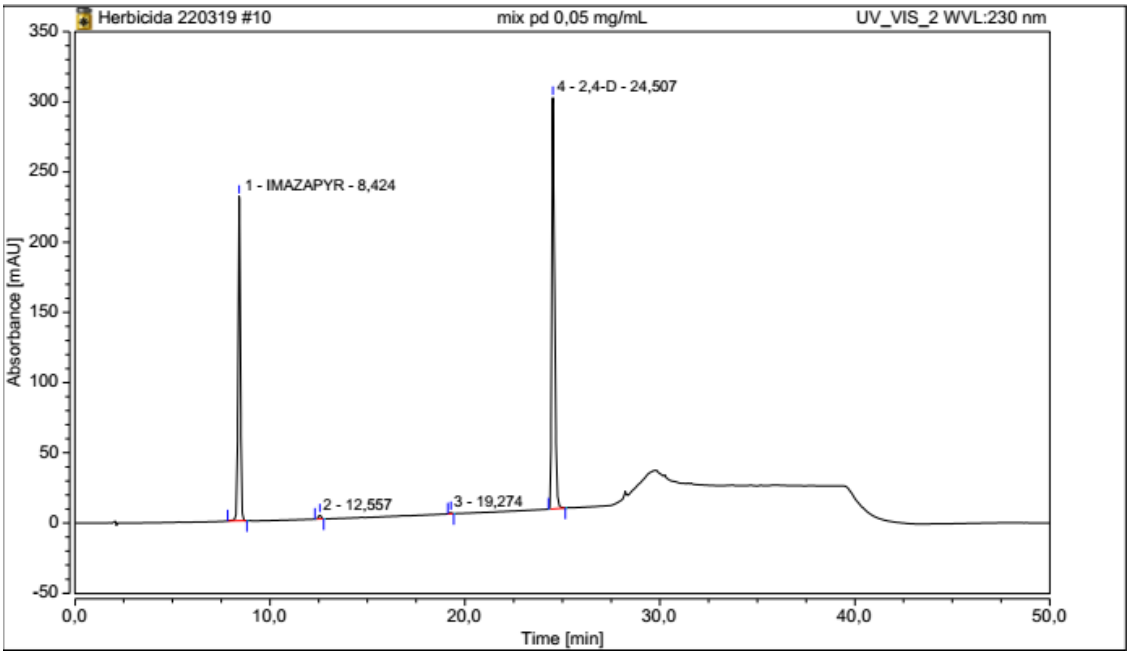

Figura 18: Cromatograma dos padrões químicos dos herbicidas utilizados neste trabalho 2,4-D e Imazapyr® na concentração de 0,05mg/mL.

7- CONCLUSÃO

- A coleta de amostras de solo em uma região com histórico de uso de herbicidas possibilitou o isolamento de dois fungos filamentosos que se desenvolveram na presença dos herbicidas 2,4-D e Imazapyr® como única fonte de carbono.
- Análises morfológicas e moleculares identificaram os dois fungos filamentosos como *F. oxysporum* (isolado em meio contendo 2,4-D) e *F. solani* (em meio com Imazapyr®).
- Ambos herbicidas não afetaram o crescimento micelial e as características morfológicas dos fungos isolados nas concentrações testadas, porém, o 2,4-D reduziu a quantidade de macroconídeos em *F. oxysporum* e aumentou a produção de esterases. Já o Imazapyr® aumentou a produção das enzimas amilase e celulase e reduziu a produção de protease em *F. solani*.
- Análises cromatográficas indicaram que o fungo *F. oxysporum* promoveu a degradação do 2,4-D de 11% e 18% nos meios de cultura MSM e Czapeck Dox respectivamente após 15 dias de incubação. Isto sugere que o tipo de meio de cultura pode interferir na atividade de degradação do fungo.
- A levedura isolada L-1 promoveu alterações cromatográficas significativas em ambos herbicidas, sugerindo que esta pode estar modificando as estruturas dos herbicidas aumento a biodisponibilidade, a confirmação deste fato necessita de mais estudos.

8- REFERENCIAS

ABD EL RAHIM, W. M., MOAWAD, H., AND KHALAFALLAH, M. (2003). Microflora involved in textile dye waste removal. **J. Basic Microbiol**., 43, 167.

ADENIPEKUN, C.O. AND LAWAL, R. (2012) Uses of mushrooms in bioremediation: A review. Biotechnol. Molec. **Biol. Rev**., 7(3),62-68.

AGROW. **Mixed results for top 20 companies. n. 621, p.2, ago. 2011.**

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários** 2018.

ALEXANDER, M. Bioremediation Technologies: In Situ and Solid Phase In: **Biodegradation and Bioremediation**. 2 ed.; Academic Press: San Diego, USA; ch.16, pp. 325-353, 453p .1999.

ALMEIDA, G.C.S; LAMOUNIER, W. M. **Organizações Rurais & agroindustriais**, Lavras, v. 7, n.3, p.345-355, 2005.

ATAMANIUK, T. M; KUBRAK O. L; STONEY K. B; LUSHCHAK, K. V. **Ecotoxicol**. 22 (2013) 1498.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO F. e JARDIM, I. F. **Biorremediação de solos contaminados por Petróleo e seus derivados.** Eclética Química, Campinas, v.35, n. 3, p.17-43, 2010.

ARAÚJO, A. S. F. **Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solos**. 2002. 83 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; SOBRAL, J. K.; LACAVA, P. T. **Manual de isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba, 86p., 2002.

ARAÚJO. A. S. F; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Bioscience Journal**, v.23. n.3, p.66-75, 2007.

AVANZI, J. C.; BORGES, L. A. C.; CARVALHO, R. Proteção legal do solo e dos recursos hídricos no Brasil. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 2, n. 2, p. 115-128, 2009.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Critérios para a classificação toxicológica** (2001).

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos**. Relatório anual de 2009**.

BACZYNSKI TP, PLEISSNER D, GROTENHUIS T. Anaerobic biodegradation of organochlorine pesticides in contaminated soil - significance of temperature and availability. **Chemosphere**. 2010; 78 (1): 22-8. Epub 2009/10/23.

BALJINDER SINGH AND KASHMIR SINGH (2014). Microbial degradation of herbicides. **Critical Reviews In Microbiology**, [s.l.], p.1-17, 27 ago. 2014. Informa UK Limited. http://dx.doi.org/10.3109/1040841x.2014.929564.

BARNETT, H. C., e B. B. HUNTER. **Illustrated genera of imperfect fungi. Minneapolis**: Burgess Publications, 1987.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4th ed. The American phytopathological Society, St. Paul. Minnesota, 1998. 218p.

BARRAGÁN-HUERTA B, E., COSTA-PÉREZ C, PERALTA-CRUZ J, BARRERA-CORTÉS J, ESPARZA-GARCÍA F, RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ R. Biodegradation of organochlorine pesticides by bacteria grown in microniches of the porous structure of green bean coffee. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 2007; 59:239-44.

BERNOTH, L.; FIRTH, I.; MCALLISTER, P. & RHODES, S. Biotechnologies for remediation and pollution control in the mining industry. **Miner. Metall. Proc**., 17:105-111, 2000.

B€ORJESSON E, TORSTENSSON L, STENSTR€ OM J. (2004). The fate of imazapyr in a Swedish railway embankment. **Pest Manag Sci** 60:544–549

BISWAS, S. S. K., CHAUDHARI, S., AND MUKHERJI, S. (2005). Microbial uptake of diesel oil sorbed on soil and oil spill clean-up sorbents. J. **Chem.Technol.Biotechnol**., 80, 587.

BOLLAG, J.M. Microbial transformation of pesticides.**Advance Applied Microbiology**, San Diego, v. 18, p. 75- 130, 1974.

BOMBARDI, L. M. (2017). **Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil e Conexões com a União Europeia**. São Paulo: FFLCH - USP, 296 p.

BORÉM, A. **Biotecnologia e Meio ambiente.** Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 2005. Cap. 5, p. 96-117.

BORGGAARD, O. K., GIMSING, A. L. (2008**).** Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: A review. **Pest Management Science** [s.l.], v. 64, n. 4, p.441-456, .

BOOTH, C. **The genus Fusarium. Kew**, Commonwealth Mycological Institute, 1971.

BOTELHO, GR. et al. Uso de ITS (“ Intergenic Transcribed Spacer’’) para caracterização de genotípica de isolados de Pseudomonas do grupo fluorescente. **Seropédia**. EMBRAPA, 2005. 4p.

BIGGAR, J. W.; CHEUNG, M. W. Adsorption of picloram (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid) on Panoche, Ephrata, and Palouse soils. Thermodynamic approach to the adsorption mechanism. **Proc. Soil Sci. Soc. Am.,** v. 37, p. 863-868, 1973.

BIOEDIT- Programa de Biological Sequence Alignment Editor.http://www.mbio.ncsu.edu/***bioedit***/***bioedit***.html

BUSH PB, BERISFORD YC, TAYLOR JW, NEARY DG, MILLER KV. 1995. Operational monitoring of forest site preparation herbicides in the coastal plain: Assessment of residues in perched water table. Society, Memphis, TN, USA, January 16–18, 1995, pp 115–120.

Proceedings, 48th Annual Meeting of the Southern Weed Science
Proceedings, 48th Annual Meeting of the Southern Weed Scienc
BLAST- www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank

BRITISH CROP PROTECTION COUNCIL. **The Pesticide Manual: incorporating the agrochemicals handbook**. 10.ed. Surrey: Tomlin, 1994. 1341p.

Brillas . E, Calpe J.C, Cabot P.L, Applied Catalysis B: **Environmental** 46 (1986) 381.

BRITO, N. N. et al. Utilização de fungos na remediação de efluentes industriais. In**:** FÓRUM DE ESTUDOS CONTÁBEIS, 4., 2004, Rio Claro. **Anais...** Rio Claro: Faculdades Integradas Claretianas, 2004.

CAMPANHA PERMANENTE CONTRA OS AGROTÓXICOS E PELA VIDA. Governo pode autorizar agrotóxicos cancerígeno por medida provisória, 2017. Disponível em:< http://contraosagrotoxicos.org/suprema-corte-dos-eua-revela-que-gerente-damonsantoencobriu-provas-relacionando-o-cancer-ao-uso-de-glifosato-e-ddt/>. Acesso em: 29 de jun. de 2017.

CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO L. G. S.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A. C. Dossiê ABRASCO: **um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

CARBONE, L. M. KOHN. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, [s.l.], v. 91, n. 3, p.553-553, maio 1999.

CARRILLO, G. D; HONRUBIA, M. Differentail responses of ectomycorrizhal fungi to pesticides in pure culture. **Cryptogamie Mycologie**, Paris, v.24, n.3, p.199-211, 2003.

CASTELO-GRANDE, T., AUGUSTO, P. A., MONTEIRO, P., ESTEVEZC, A. M., AND BARBOSA, D. (2010). Remediation of soils contaminated with pesticides: a review. Intern. J. Environ**. Anal.** Chem., 90, 438.

CASTILLO, J.M., CASAS, J. AND ROMERO, E. 2011. Isolation of an endosulfan-degrading bacterium from a coffee farm soil: persistence and inhibitory effect on its biological functions. **Sci. Total Environ**. 2011: 412-413.

CASTRO, F.D. **Degradação do Ácido diclorofenoxiacético (2,4 D) com Ozonio Eletrogerado.** 2010. Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal de Uberlandia.

CETESB: COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Manual de gerenciamento de áreas contaminadas**. Capítulo X – Investigação para Biorremediação, 2004. 77p.

CIAMPI, L.; NISSEN, J.; VENEGAS, E.; FUENTES, R.; COSTA, M.; SCHÖBITZ, R.; ALVAREZ, E.; ALVARADO, P. Identification of two species of *Fusarium* Link that cause wilting of colored callas (Zantedeschia aethiopica (L.) Spreng.) cultivated under greenhouse conditions in Chile. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Santiago, v.69, n.4, p.516-525. 2009.

COLLA, L. M; PRIMAZ, A.L; LIMA, M; BERTOLIN, T. E; COSTA, J. A. V. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciênc.agrotec**., Lavras, v. 32, n.3, p. 809-813, 2008.

COMMITTEE ON TOXICITY, ECOTOXICITY AND THE ENVIRONMENT (CTEE). **Opinion on human and wildlife health effects of endocrine disrupting chemicals, with emphasis on wildlife and on ecotoxicology: test methods**. 1999.

COSTA JL, APARICIO V, ZELAYA M, GIANELLI V, BEDMAR F. 2011. Transporte de imazapir, atrazina, S-metolacloro y acetoclorenel perfil de um suelo argiudol del sudeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina. **Estudios de la Zona no Saturada del Suelo** 10:157–162.

COSTA, C.N.; MEURER, E.J.; BISSANI, C.A.; SELBACH, P.A. Contaminantes e poluentes do solo e do ambiente. In: MEURER, E. J. **Fundamentos de química do solo**. 2 ed. Porto Alegre, 2004. 290p.

CONWAY, G. Êxitos anteriores. In: **Produção de alimentos no século XXI: biotecnologia e meio ambiente**. São Paulo: Estação Liberdade, 2003. cap.4, p.69-74.

CORRÊA, L. **Degradação do glifosato (N-fosfonometil-glicina) por fungos isolados de solo da Floresta Amazônica. 2013, 55p**. Dissertação de mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais, Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus. 2013.

CORRÊA, ANNA LABELLE ALVES et al. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solos contaminados com agrotóxicos. Faculdade De Ciência E Tecnologia De Montes Claros, **Congresso Nacional de iniciação cientifica SEMESP**. 2017.

COSTA NETO, C. Agricultura sustentável, tecnologias e sociedade. In: CARVALHO COSTA, L. F et al.. (orgs.). Mundo rural e tempo presente. Rio de Janeiro: **MAUAD**, 1999. p. 301-320.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Degradable polymersProg, **Polym.Sci**., v. 23, p. 1273-1335, 1998.

CHAUDHRY, G. R. Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals, **Dioscorides Press, Warsaw**, Poland, 1994.

CHEN LZ, LI YL, WANG T, JIANG YL, LI K, YU YL (2014) Microencapsulated chlorpyrifos: degradation in soil and influence on soil microbial community structures. **J Environ Sci** 26:2322–2330.

CLARK, B., AND BOOPATHY, R. (2007). Evaluation of bioremediation methods for the treatment of soil contaminated with explosives in Louisiana Army Ammunition Plant, Minden, Louisiana. **J. Hazard. Mater**., 143, 643.

CROPLIFE. Facts and figures – **The status of global agriculture**, 2010.

CHRISTAKOPOULOS P, NERINCKX W, KEKOS D, MACRIS B, CLAEYSSENS M (1996). Purification and characterization of two low molecular mass alkaline xylanases from *Fusarium oxysporum* F3. **J Biotechnol** 51:181–189

CYCON M, PIOTROWSKA-SEGET Z. Changes in bacterial diversity and community structure following pesticides addition to soil estimated by cultivation technique. **Ecotoxicology**. 2009;18(5):632-42. Epub 2009/05/16.

DAMS, R. I. Pesticidas: Usos e perigos à saúde e ao meio ambiente. **Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal**, v. 7, n. 2, dez. 2006.

DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE AMBIENTAL E SAÚDE DO TRABALHADOR. Ministério da Saúde. **Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 141 p.

DARIVA, J. M. Fusarioses do maracujazeiro: etiologia e sintomatologia, 2011, 71p. Management of Contaminated Sites, **Contaminated Sites Guidelines, Department of Environment Regulation**: http://www.der.wa.gov.au/contaminatedsites.

DIX, N.J.; WEBSTER, J. **Fungal Ecology**. Chapman and Hall: London, UK, 1995; 549 pp.

DEMICHELLI, FERNANDA NATALÍ. **Isolamento, seleção e avaliação do potencial de biodegradação de glifosato (n-(fosfonometil)glicina) por microrganismos isolados de solo de lavoura, em Laranjeiras Do Sul, Pr.** Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS.

DOYLE, J. J. AND DOYLE, J. L. (1990), Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12, 13–15.

DUNN, I.S. & BLATTNER, F.R. Sharons 36 to 40: Multi-enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vecto with polylinkers and ploystuffers. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 15, n. 6, p.2677-2698, 1987. Oxford University Press (OUP). http://dx.doi.org/10.1093/nar/15.6.2677.

EDWARDS, C.A. Impact of herbicides on soils ecosystems. **Critical Reviews in plant science**, London, v.8, p. 221 -257, 1989.

EMBRAPA. **Agricultura e Meio Ambiente**. Disponível em http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_40_210200792814. html. Acessado em 14 de dezembro de 2013.

EPA, "**What is a Pesticide**," April 2015, http://www.epa.gov.

EPA, "**What is a Pesticide**," April 2006, http://www.epa.gov.

EPA- "Pesticides Industry Sales and Usage 2008-2012 Market Estimate" 2017. **Biological and Economic Analysis Division Office of Pesticide Programs Office of Chemical Safety and Pollution Prevention U.S**. Environmental Protection Agency Washington, DC 20460

EVANS, C.S.; HEDGER, J.N. Degradation of plant cell wall polymers. In Fungi in Bioremediation; Gadd, G.M., Ed.; **Cambridge University Press: Cambridge**, UK, 2001; 1–26.

FAETH, S. H., AND FAGAN, W. F. (2002). Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. **Integr. Comp. Biol.** 42, 360–368. doi: 10.1093/icb/42.2.360

FELICONIO E. **Agrotóxicos: Risco para a saúde e meio ambiente**. Disponível em: http://WWW.sitiodomoinho.com/jornal/powervoice/DefaultNewsShow.asp?Editoria=6&Noticia=35 Acessado em 06 de agosto 2006.

FELIX-CARIEDO, T. E.; DURAN-ALVAREZ, J. C.; JIMENEZ-CISNEROS, B., The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources. **Sci. Total Environ.** 2013, 454, 109-118.

FIGGS L.W, HOLLAND N.T, HOLMES F.F, VANDYCK K., BLAIR A, **CANCER CAUSES AND CONTROL** 11 (2000) 373.

FORTES, N. L. P. Taxonomia e identificação de Fusarium spp. **Repositório eletrônico Ciências Agrárias, Coleção Ambientais**, p. 1-11, 2006.

FOURNIER J-C CATROUX G (1980).Use of microbial strains from a collection in the study of pesticides biodegradability. **Chemosphere** 9: 33–38.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO).PESTICIDES: PESTICIDES - **AVERAGE USE PER AREA OF CROPLAND** (FAO (2017): https://ourworldindata.org/fertilizer-and-pesticides#pesticide-application-rates

FRAGOEIRO S. **Use of fungi in bioremediation of pesticides** [dissertation].Bedford: Cranfield University; 2005.

FRIEDRICH, K. **Desafios para a avaliação toxicológica de agrotóxicos no Brasil: desregulação endócrina e imunotoxicidade (**2013).

FRUTOS FJG, ESCOLANO O, GARCI´A S, MAR BABI´N M, FERNA´NDEZ MD (2012) Bioventing remediation and ecotoxicity evaluation of phenanthrene-contaminated soil. **J Hazard Mater** 183:806–813. doi:10.1016/j.jhazmat. 2010.07.098

FUSI, P. et al. Interactions of two acetanilidade herbicides with clay surfaces modified with Fe (III) oxyhydroxides and hexadecyltrimethyl ammonium. **Chemosphere,** v. 27, n. 5, p. 765-771, 1993.

GADD, G.M., Ed. Fungi in Bioremediation. Cambridge University Press: **Cambridge,** UK, 2001; 481 pp.

GARON, D., SAGE, L., AND SEIGLE-MURANDI, F. (2004). Effects of fungal bioaugmentation and cyclodextrin amendment on fluorene degradation in soil slurry. **Biodegradation**, 15, 1.

GALVÃO, J.G.; GUERREIRO, M.C.; SOUZA, J.A.; COURA, S.M.C. Uso do fungo Fusarium oxysporum como indicador de Ametrina, através da medida de biomassa, pela quantificação do ergosterol. **Ciências Agrotecnológicas**, v.27, n.4, p.840-845, 2003.

GEORGE, E.F. et al. Plantpropagation by tissue culture, 3rd edn. Berlin: **Springer**, 1963.

GERLACH W, NIRENBERG H, (1982). The Genus Fusarium – a Pictorial atlas. **Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft**. 209:1-406

GIRVAN, M.S., BULLIMORE, J., BALL, A.S., PRETTY, J.N., OSBORN, A.M., 2004. Responses of active bacterial and fungal communities in soils under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens. **Applied Environmental Microbiology** 70, 2692e2701.

GLEICH F, MONS U, PÖTSCHKE-LANGER M 2011 Air contamination due to smoking in German restaurants, bars, and other venues—before and after the implementation of a partial smoking ban. **Nicotine & Tobacco** Research: ntr099

GOLTAPEH, E.M.; DANESH, Y.R.; VARMA, A., Eds. Fungi as bioremediators. In Soil biology, Vol. 32; **Springer**, Heidelberg, Germany, 2013; 489 pp

GUIMARÃES, R. M. **Exposição a organoclorados e alterações em caracteres sexuais primários e secundários na população exposta em Cidade dos Meninos**. 2011. 233 f. Tese (Doutorado Saúde Coletiva) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Estudos em Saúde Coletiva. Rio de Janeiro, 2011.

GURGEL, A. M.; CARNEIRO, F. F.; TEIXEIRA, A. C. A. **Nota técnica - Fiocruz** Ceará - PL Agrotóxicos. Fortaleza, 2015.

GREEN, J. M. (2014). Current state of herbicides in herbicide-resistant crops. **Pest Management Science** 70, 1351-1357

GROENEWALD JZ, NAKASHIMA C, NISHIKAWA J, et al. 2013. Species concepts in Cercospora: spotting the weeds among the roses. **Studies in Mycology** 75: 115–170.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L.The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, 67:597- 607. 1975.

HARA E, KURIHARA M, NOMURA N, NAKAJIMA T, UCHIYAMA H (2013) Bioremediation field trial of oil-contaminated soil with food-waste compost. **J JSCE** 1(1):125–132. doi:10.2208/journalofjsce.1.1_125

HART, R. et al. Imazethapyr herbicide. In: Shaner, D.; Connor, S. (Eds.) **The imidazolinones herbicides**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 247-256.

HINCHEE R.E; ANDERSON, D.B; .METTING JR F. B, ANDG. D. SAYLES, **Applied Biotechnology for Site Remediation**, Lewis, Chelsea, Mich, USA, 1994.

HOOVER D.G., BORGONOV G.E., JONES S.H., ALEXANDER M, Anomalies in Mineralization of Low Concentrations of Organic Compounds in Lake Water and Sewage. **Applied and Environment Microbiology** 51 (1986) 226.

HSIAO YL, HO WH, YEN JH (2013) Vertical distribution in soil column and dissipation in soil of benzoylurea insecticides diflubenzuron, flufenoxuron and novaluron and effect on the bacterial community. **Chemosphere** 90:380–386

HUTSCH BW (2001).Methane oxidation in non-flooded soils as affected by crop production.Invitedpaper. Eur. **J. Agron**. 14: 237-260.

IBAMA- Instituto Brasileiro Do Meio Ambiente E Dos Recursos Naturais E Renováveis (2013). **Relatório de comercialização de agrotóxico**: Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil, ano 2012, 2013 e 2014.

IBAMA- Instituto Brasileiro Do Meio Ambiente E Dos Recursos Naturais E Renováveis (2017). **Relatório de comercialização de agrotóxico**: Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil, ano 2015, 2016 e 2017.

IBAMA- Instituto Brasileiro Do Meio Ambiente E Dos Recursos Naturais E Renováveis (2018). Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. **41 do Decreto n° 4.074/2002**.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal: culturas temporárias e permanentes**: v. 39. 2012.

ISLAM, M., MORGAN, J., DOYLE, M.P., JIANG, X.P., 2004. Fate of escherichia coli o157:h7 in manure compost-amended soil and on carrots and onions grown in an environmentally controlled growth chamber. **J.Foodprot**. 67, 574–578.

JIANG, J; YANG, B; FAN F et al., "Method for using alfalfaorganophosphorus pesticide degradation bacteria to jointly renovate organophosphorus pesticide contaminated soil," **Faming ZhuanliShenqing**, CN 102755991 B, 2012.

JENKINS, S.R. et al.Temperature effects on retention of atrazine and imazapyr soils. **Water Air Soil Pollut.**, v.118, p.169-178, 2000.

JIANG, X., ZENG, G., HUANG, D., CHEN, Y., LIU, F., HUANG, G., LI, J., XI, B., AND LIU, H. (2006). Remediation of pentachlorophenol-contaminated soil by composting with immobilized Phanerochaetechrysosporium, World **J. Microbiol**. **Biotechnol**., 22, 909.

KIRCHHOFF, M. M. (2003). Promoting green engineering through green chemistry. **Environ.Sci**.Technol., 37, 5349.

KRISHNA, K. R., AND PHILIP, L. (2011). Bioremediation of single and mixture of pesticide-contaminated soils by mixed pesticide-enriched cultures. **Appl. Biochem. Biotechnol**., 164, 1257

KUSTER, M.; JOSE LOPEZ DE ALDA, M.; DOLORES HERNANDO, M.; PETROVIC, M.; MARTIN-ALONSO, J.; BARCELO, D., Analysis and occurrence o pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). **J. Hydrol**. **2008**, 358, 112-123

LAL, R., 2008. The urgency of conserving soil and water to address 21st century issues including global warming. **J.Soil Water Conserv**.63, 140A–141A.

LANE, M., LORENZ, N., SAXENA, J., RAMSIER, C., DICK, R. P. (2012).The effect of glyphosate on soil microbial activity, microbial community structure, and soil potassium. **Pedobiologia** 55, 335-342.7

LAURENT, F.; DEBRAUWER, L.; RATHAHAO, E.; SCALLA, R., 2,4-dichlorophenoxyacetic acid metabolism in transgenic tolerant cotton (Gossypiumhirsutum). **J. Agric. Food Chem**. 2000,48, 487 5307-5311.

LAURENCE, M. H.; SUMMERELL, B. A.; BURGESS, L. W.; LIEW, E. C. Genealogical concordance phylogenetic species recognition in the *Fusarium oxysporum* species complex. **Fungal biology**, v. 118, n. 4, p. 374-384, 2014.

LAZAROTTO, M. **Identificação e caracterização de Fusarium ssp. e Pestalotiopsis ssp. associados a Carya illinoinensis no Rio Grande do Sul**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, 2013.

LEAHY, J. G. e COLWELL, R. R. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. Microbiological reviews - Copyright C, **American Society for Microbiology**. Vol. 54, N.3, p. 305-315, 1990.

LEE, A., GATTERDAM, P.E., CHIU, T.Y. et al. Plant metabolism. In: SHANER, D.L., O ' CONNO R , S . L .(E d s .) . **The imidazolin one herbicides** , Florida: CRC Press, Inc., 1991. p.151-165

LEI, L., KHODADOUST, A. P., SUIDAN, M. T., AND TABAK, H. H. (2005). Biodegradation of sediment-bound PAHs in field contaminated Sediment. **Water Res**., 39, 349.

LEMUS, M.A; LOPEZ, T; RECILLAS, S; FRIAS, D; MONTES, M; DELGADO, J; CENTENO, M; ODRIOZOLA, J. Photocatalytic Degradation of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Using Nanocrystalline Cryptomelane Composite Catalysts. **Journal of Molecular Catalysis A**: Chemical 281 (2008) 107–112.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A.**The *Fusarium* laboratory manual**. Blackwell Publishing, v. 1, p. 1- 388, 2006.

LESLIE, J. F.; ZELLER, K. A.; SUMMERELL, B. A. Icebergs and species in populations of Fusarium. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 59, n. 3, p. 107-117, 2001.

LIAN Y, GAO W, ZHOU L, WU N, LU Q, HAN W, TIE X 2014 Occurrence of Sudan I in Paprika Fruits Caused by Agricultural Environmental Contamination. **Journal of agricultural and food chemistry**.

LIMA, A. F. T. DE; GURGEL, A. M. **Perigos associados ao malation e seus metabólitos no controle vetorial do Aedes aegypti**. In: Ed. Universitária da UFPE (Ed.); Agrotóxicos: vulnerabilidades socioambientais, político-institucionais e teórico-metodológicas. 1st ed., p.32–50, 2018.

LINK, S. & ONOFRE, S.B. Microrganismos Epifíticos Da Vassourinha – Baccharis Dracunculifolia D. C. (Asteraceae). **Revista em agronegócios e meio ambiente** 3:131-143. 2010.

LIU, X-M., CHEN, K., MENG, C., ZHANG, L., ZHU, J-C., HUANG, X., LI, S-P. & JIANG, J-D. (2014). Pseudoxanthobacter liyangensis sp. nov., isolated from dichlorodiphenyltrichloroethane-contaminated soil. **Int J Syst Evol Microbiol** 64, 3390–3394.

LONDRES, Flávia. **Agrotóxicos no Brasil um guia na ação em defesa da vida**. 1° Edição.Rio de Janeiro/2011.Biblioteca DigitalFlorestal.

MA L-J, GEISER DM, PROCTOR RH, ROONEY AP, O'DONNELL K, TRAIL F, GARDINER DM, MANNERS JM, KAZAN K (2013) Fusarium pathogenomics. Annu **Rev Microbiol** 67:399–416

MAIA MMD, HEASLEY A, CAMARGO DE MORAIS MM, MELO EHM, MORAISJÚNIOR MA, LEDINGHAM WM, LIMA FILHO JL. Effect of culture conditions on lípase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology** 76:23-27. 2001.

MACIEL, C. G. **Fusarium sambucinum associado a sementes de pinus elliottii: patogenicidade, morfologia, filogenia molecular e controle.** 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria. Rio grande do Sul, 2012.

MANGELS, G D.L. SHANNER, S.L. Conner. Imidazolinone Herbicides, pp. 191–209, **Academic Press, Princeton** (1991).

MAGAN N. Ecophysiology: impact of environment on growth, synthesis of compatible solutes and enzyme production. In: Boddy L, Frankland JC, van West P, editors. Ecology of saprotrophic Basidiomycetes. **Amsterdam: Elsevier** Ltd.; 2007

MALLIPUDI. N, J.S. STOUT, R. ADRIAN. **J. Agric. Food Chem**., 39, 412 (1991).

MARINOZZI M, COPPOLA L, MONACI E, KARPOUZAS DG, PAPADOPOULOU E, MENKISSOGLU-SPIROUDI U, VISCHETTI C (2013) The dissipation of three fungicides in a biobed organic substrate and their impact on the structure and activity of the microbial community. **Environ Sci Pollut Res** 20:2546–2555

MASTER, E. R.; MOHN, W. W. Psychrotolerant bacteria isolated from arctic soil that degrade polychlorinated biphenyls at low temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4823-4829, 1998.

MCDOUGALL, P. The global agrochemical market in 2010 – preliminary 275 review.

MELO, I. S.; et al. Microbiologia Ambiental.2.ed.rev. e ampl. – Jaguariúna, SP: **EMBRAPA Meio Ambiente**, 2008. 647 p.

MENDES, D.; PITELLI, R. A.; COELHO, L. Efeito de concentrações de herbicidas sobre aspectos biológicos de Fusarium SP.(isolado FCAV# 940). Planta Daninha, p. 85-93, 2004.

MENDONÇA, E.; MARTINS, A.; ANSELMO, A. M. Biodegradadion of natural phenolic compounds as singles and mixed substrates by Fusarium floccicferum. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 1, 2004

MENEGHETTI, L. R. R. Biorremediação na descontaminação de solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel. Passo Fundo: **UPF**, 2007.

MILIC J, BESKOSKI V, ILIC M, ALI S, GOJGIC-CVIJOVIC G, VRVIC M (2009) Bioremediation of soil heavily contaminated with crude oil and its products: composition of the microbial consortium. **J Serb Chem Soc** 74(4):455–460. doi:10.2298/jsc0904455m

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Diretrizes para Atenção Integral à Saúde do Trabalhador de Complexidade Diferenciada: **Protocolo de Atenção à Saúde dos Trabalhadores Expostos a agrotóxicos**. 2006.

MICHEREFF, S. et al. Manejo integrado de doenças radiculares. In: MICHEREFF, S.J. et al. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, 2005. p.367-388.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Sistema de agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT)**. 2004. disponível em: HTTP://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 25 jan 2009.

MITHILA, J. et al. Evolution of Resistance to Auxinic Herbicides: Historical Perspectives, Mechanisms of Resistance, and Implications for Broadleaf Weed Management in Agronomic Crops. **Weed Science,** v. 59**,** p. 445-457, 2011.

MONKIEDJE, A., ILORI, M.O., SPITELLER, M., 2002.Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxyl to a sandy loam soil. **Soil Biology & Biochemistry** 34, 1939e1948.

MONTEIRO, D. Fundação Oswaldo Cruz (Org.). **Brasil consome 14 agrotóxicos proibidos no mundo**. 2014. Disponível em: <http://redesfito.far.fiocruz.br/index.php/noticias/58-brasil-consome-14-agrotoxicos-proibidos-no-mundo>.

MONTOYA JC, PORFIRI C, ZELAYA M. 2010. Estimación de laadsorción de imazapir y atrazinaalsuelo y cálculo del Índice GUS. **Proceedings, 3rd Congreso Argentino de laSociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC),** Santa Fe, Argentina, May 12–14, p 76.

NARRA,M.R.,2016.Singleandcarteleffectofpesticideonbiochemicalandhaema- tological satutus of Clariabatrachus: Along-termmonitoring. **Chemosphere** 144,966–974.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL.The future role of pesticides in US agriculture. Washington, D.C.: **National Academy Press**, 2000.

NELSON PE, TOUSSOUN TA, COOK RJ (1981) ***Fusarium*: Diseases, Biology, and Taxonomy**. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, USA

NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A. & MARASAS, W.F.O. **Fusarium species an illustrated manual for indentification.** University Park: The Pennsylvania State University Press. 1983.

NISSEN SJ, SHER AA AND NORTON A, TAMARISK: **Best Management Practices in Colorado Watersheds.** Colorado State University, Fort Collins, CO (2010).

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasil, 1997. Disponível em . Acesso em: 14 dez. 2013.

O‘DONNEL, K.; SUTTON, D. A.; RINALDI, M. G.; SARVER, B. A. J.; BALAJEE, S. A; SCROERS, H. J.; SUMMERBELL, R. C.; ROBERT, V. A. R. G., CROUS, P. W.; ZHANG, AOKI, T.; JUNG, K.; PARK, J.; LEE, Y. H.; KANG, S.; PARK, B.; GEISER, D. M. Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 10, p. 3708-3718, 2010

OLIVEIRA, M.F., BRIGHENTI, A.M. (2011). Comportamento dos herbicidas no ambiente. In: Oliveira Jr., R.S.; Constantin, J. e Inoue, M.H. (Eds) **Biologiae Manejo de Plantas Daninhas**. Curitiba, PR: Omnipax, cap. 11, p. 263-304.

OLIVEIRA, J. A**. Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (Cucumis sativas L.) e pimentão (Capsicum**

annanum L.). 1991. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1999.

OLIVEIRA A, PAMPULHA ME (2006).Effects of long-term heavy metal contamination on soil microbial characteristics**. J. Biosci**. **Bioeng**. 102:157-161

OLIVIERI FP, MALDONADO S, TONÓN CV, CASALONGUÉ CA (2004) Hydrolytic activities of *Fusarium solani* and *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* associated with the infection process of potato tubers. **J Phytopathol** (Berlin) 152:337–344

PAVLOSTATHIS, S. G., PRYTULA, M. T., AND YEH, D. H. (2003).Potential and limitations of microbial reductive dechlorination for bioremediation applications.**Water Air Soil Poll**., 3, 117.

PATTANASUPONG, A. H. NAGASE, M. INOUE et al., "Biodegradation of persistent pesticides by immobilized microbial consortia for use in paddy fields," **Biotechnology for Sustainable Utilization of Biological Resources in the Tropics**, vol. 17, pp. 421–425, 2004.

PELAEZ, V. **Monitoramento do Mercado de Agrotóxicos.** Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c4bdf280474591ae99b1dd3fbc4c6735/estudo_monito ramento.pdf?MOD=**AJPERES**. Acesso em: 31 jul. 2011.

PEPER , IL.; GERBA,C.P.; BRUSSEAU, M.L., ed. **Polluition science**. Lodon: Academic Press, 1996.397p.

PERELO, L.W. Review: in situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. **J. Hazard. Mat**. 2010, 177, 81–89.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. Health, environment, and pesticide use in a farming area in Rio de Janeiro State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.23, p.S612-S621, 2007.

PERES, F.; ROZEMERG, B. É veneno ou é remédio? – os desafios da comunicação rural sobre agrotóxicos. In PERES, F.; MOREIRA, J. C. (orgs.). É veneno ou é remédio? **Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 327- 346.

PERFIL TÉCNICO: **Iniciativa 2,4-D**. Disponível em: <https://www.iniciativa24d.com.br/media/upload/boletim-tecnico-24d-web.pdf>. Acessoem: 14 mar. 2016).

PINHEIRO, A.; MORAES, J. C. S.; SILVA, M. R.; **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** 2011,*15*,533.3

PINTO, J. J. O. et al. Atividade residual de (imazethapyr + imazapic) sobre azevém anual (Loliummultiflorum), semeado em sucessão ao arroz irrigado, sistema Clearfield®. **Planta Daninha**, v. 27, n. 3, p. 609-619, 2009.

POLETTO, I. et al. Zoneamento e identificação de Fusarium spp. causadores de podridão de raízes em plantios de erva-mate (Ilex paraguariensis A. St.-Hil.) na região do Vale do Taquarí, RS. **Ciência Florestal,** Santa Maria, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2006.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. Microbiology. 5th edition. The McGraw-Hill Companies, 2002, 1139 p.

PRIMEL, EDNEI GILBERTO et al . Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. **Quím. Nova,** São Paulo , v. 28, n. 4, Aug. 2005

PROCÓPIO, S. O.; SILVA, A. A.; VARGAS, L. Manejo e controle de plantas daninhas em cana-de-açúcar. In: VARGAS, L.; ROMAN, E. S. (Eds.) **Manual de manejo e controle de plantas daninhas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. p. 397-452.

QUINTERO, J. C., MOREIRA, M. T., LEMA, J. M., AND FEIJOO, G. (2006). An anaerobic bioreactor allows the efficient degradation of HCH isomers in soil slurry. **Chemosphere**, 63, 1005.

QUINTERO, J. C., L´U-CHAU, T. A., MOREIRA, M. T., FEIJOO, G., AND LEMA, J.M. (2007). Bioremediation of HCH present in soil by the white-rot fungus Bjerkanderaadustain a slurry batch bioreactor. Int. **Bioter. Biodeg**., 60, 319

RADTKE C, COOK WS, ANDERSON A. Factors affecting antagonism of the growth of Phanerochaetechrysosporium by bacteria isolated from soils. **Appl Microbiol Biotechnol** 1994;41: 274-80

RAHMAN A, JAMES TK, SANDERS P. 1993. Leaching and movement of Imazapyr® in different soil types.**Proceedings, 46th New Zealand Plant Protection Conference**, [cited 2012 november 15] Available from: http:// www.nzpps.org/terms_of_use.html. pp 115–119.

RAMALHO, J.P.G.P; et al. **Acumulação de metais pesados pelo uso de insumos agrícolas na microbacia de Caetés**, Paty do Alferes, RJ. Embrapa. 2000.

RANA ANJUL, MANVIKA SAHGAL AND B. N. JOHRI. **Fusarium oxysporum: Genomics**, Diversity and Plant–Host Interaction Chapter · December 2017 DOI: 10.1007/978-981-10-4768-8_10

RAJESWAI R., KANMANI S., IRAN. J. **Environ. Health. Sci. Eng**. 6 (2009) 61

RAO MA, SCELZA R, ACEVEDO F, DIEZ MC, GIANFREDA L. 2014. Enzymes as useful tools for environmental purposes. **Chemosphere**. Volume 107: 145–162

REMEDIATION PROCESS GUIDE. NATIONAL ENERGY BOARD, **Calgary**, Canada, 2011; 1–23.

REIS, M. R. et al. Impacto de herbicidas em isolados de *Trichoderma* spp. **Planta Daninha**, v. 31, n. 2, p. 419-426, 2013.

ROBINSON, A. P.; SIMPSON, D. M.; JOHNSON, W. G . Summer annual weed control with 2,4-D and glyphosate. **Weed Technology**, v. 26, n. 4, p. 657-660, 2012.

ROBLES-GONZ´ALEZ, I., R´IOS-LEAL, E., FERRERA-CERRATO, R., ESPARZA-GARC´IA, F., RINDERKENECHT-SEIJAS, N., AND POGGI-VARALDO, H. M. (2006).Bioremediation of a mineral soil with high contents of clay and organic matter contaminated with herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using slurry bioreactors: effect of electron acceptor and supplementation with an organic carbon source. **Process Biochem.**, 41, 1951.

RODR´IGUEZ-MEZA, M. A., CH´AVEZ-GOMEZ, B., POGGI-VARALDO, H. M., R´IOS-LEAL, E., AND BARRERA-CORTES, J. (2010). Design of a new rotating drum bioreactor operated at atmospheric pressure on the bioremediation of a polluted soil. **Bioprocess Biosyst**. Eng., 33, 573.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. 6a edição. Londrina: Edição dos autores, 2011. 697 p.

RODARTE, M.P. et. al, Proteolytic activities of, bacteria, yeasts and filamentous fungs. Isolated from coffe fruit (coffea a*rabica* L.) Acta scientiarum. **Agronomy**, v 33, n.3, p. 457-467,2011.

ROGER-ESTRADE J, ANGER C, BERTRAND M, RICHARD G (2010) Tillage and soil ecology: Partners for sustainable agriculture. **Soils Till Res** 111: 33-40. doi:10.1016/j.still.2010.08.010.

ROTTERDAM CONVENTION (2001). Interim secretariat for rotterdam convention on the prior informed consent procedure for certain hazardous chemicals and pesticides in international trade - **PIC CIRCULAR XIV**. http://www.pic.int/Portals/5/en/Circular/CIRC14EN.pdf. [Access online 13 February 2013].

SALMAN J AND AL-SAAD KA. (2012). Adsorption of 2,4- dichlorofhenoxyacetic acid onto date seeds activated carbon; equilibrium, kinetic and thermodynamic Studies. Int. **J. Sci.** 10(2): 677-690.

SANTOS, V.L.; LINARDI, V.R. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents - identification and degradation potential. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 1001-1006, 2004.

SINGH, H. Mycoremediation: fungal bioremediation. John Wiley & Sons, Inc. **Hoboken, New Jersey**.617p. 2006.

SANNINO, F.; GIANFREDA, L. Pesticide influence on soil enzymatic activities.Chemosphere., v.45, n. 4/5, p. 417-425, 2001.

SATYAPRASAD K., SAILAJA K. K., Degradation of Glyphosate in Soil and its Effect on Fungal Population. **Journals in Environmental Science & Engineering,** v. 48, p. 189-190, 2006.

SAYARA, T., SARR`A, M., AND S´ANCHEZ, A. (2009).Preliminary screening of cosubstrates for bioremediation of pyrene-contaminated soil through composting. **J. Hazard**. Mater., 172, 1695.

SENSEMAN SA (ed.), Herbicide Handbook, 9th edition.**Weed Science Society of America, Lawrence, KS** (2007).

SEONG, K.Y., ZHAO, X., XU, J.R., Güldener, U., and Kistler, H.C. (2008).Conidial germination in the filamentous fungus Fusarium graminearum. **Fungal Genet. Biol**. 45: 389–399.

SHEIBANI, G., NAEIMPOOR, F., AND HEJAZI, P. (2011). Statistical factor-screening optimization in slurry phase bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene contaminated soil. **J. Hazard. Mater**., 188, 1.

SHIHATA ZA, ABDOU ES, GALAL AA (1995) Production of pectolytic and cellulolytic enzymes by Fusarium species in diseased cowpea plants and in vitro.Assiut **Journal of Agricultural Sciences** 26:339-344.

SILVA, A. A.; VIVIAN, R.; OLIVEIRA Jr., R. S. Herbicidas: comportamento no solo. In: SILVA, A. A.; SILVA, J. F. Tópicos em manejo de plantas daninhas. Viçosa, MG: **Universidade Federal de Viçosa**, 2007. p. 189-248.

SILVA, J. L. da; TEIXEIRA, R. N. V. Esporulação e crescimento micelial de Fusarium solani em diferentes meios de cultura e regimes de luminosidade. **Revista Agroambiente**, v. 6, n. 1, p. 47–52, 2012.

SILVA, C. N. DA; ANGELOTTI, J.; NEVES, D. L. DAS; TESSMANN, D. J. Identificação e Prevalência de Espécies de Fusarium Associadas a Grãos de Milho no Estado do Paraná. **ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR**, 8, 2013, Maringá. Anais... Maringá: UNICESUMAR, 2013, p. 1-4

SINDAG- **SINDICATO NACIONAL DA INDUSTRIA DE PRODUTOS PARA A DEFESA AGRICOLA**. Disponível em**:**<HTTP:// WWW.sindag.com..br/html/estat_dezembro.html>acesso em 28 de maio de 2001.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA VEGETAL- SINDIVEG. Balanço 2015 – **Setor de agroquímicos confirma queda de vendas** (2017). Disponivel em:http://sindiveg.org.br/balanco-2015-setor-de-agroquimicos-confirma-queda-de-vendas/

SINGH K, CHANDRA S (2014) Treatment of petroleum hydrocarbon polluted environment through bioremediation: a review. **Pak J Biol Sci** 17(1):1–8. doi:10.3923/pjbs.2014.1.8

SINGH, H. (2006) Mycoremediation: fungal bioremediation. **Wiley, Hoboken**.

SMITH, I., J. DUNEZ, R. LELLIOTT, D. PHILLIPS, Y S. ARCHER. 1992. **Manual de las enfermedades de las plantas**. 671 p. Ediciones Mundi Prensa, Madrid, España.

SMITH E, THAVAMANI P, RAMADASS K, NAIDU R, SRIVASTAVA P, MEGHARAJ M (2015) Remediation trials for hydrocarbon-contaminated soils in arid

environments: evaluation of bioslurry and biopiling techniques. **Int Biodeterior Biodegradation** 101:56–65.doi:10.1016/j.ibiod.2015.03.029

SCHROERS, H. J.; BAAYEN, R. P.; MEFFERT, J. P.; GRUYTER, J.; HOOFTMAN, M.; K. O'DONNELL. Fusarium foetens, a new species pathogenic to begonia elatior hybrids (Begonia x hiemalis) and the sister taxon of the Fusarium oxysporum species complex.**Mycologia,** v. 96, n. 2, p. 393-406, 2004.

SMITH R, SCHUKKEN Y, PRADHAN A, SMITH J, WHITLOCK R, VAN KESSEL J, WOLFGANG D, GROHN Y (2011).Environmental contamination with Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis in endemically infected dairy herds**. Preventive veterinary medicine** 102:1-9

SNYDER, W.C.; HANSEN, H.N. The species concept in Fusarium with reference to discolor and other sections. **Am. J. Bot**., Columbus, v.27, p.64-67, 1940.

SOARES, I. A. et al. Fungos na biorremediação de áreas degradadas. Arquivos do Instituto Biológico, v. 78, n. 2, p. 341-350, 2011.

SOUSA, H. F. Aspectos gerais e morfológicos de Fusarium sp. **Estudos em doenças de plantas**. Goiano, Câmpus Urutaí, 2010.

SOUTHWOOD, M. J. ;VILJOEN, A.; MOSTERT, L.; ROSE, L.J.; MCLEOD, A. Phylogenetic and biological characterization of Fusarium oxysporum isolates associated with onion in South Africa. **Plant Disease**, v. 96, n. 9, p.1250-1261, 2012.

SOUZA, G. V. R. et al .Exsudato radicular de imazapyr aplicado sobre mudas de diferentes clones de eucalipto. **Planta Daninha**, v. 24, n. 1, p. 141-147 2006.

SOUZA, M. F., NETO, M. D. C., MARINHO, M. I., SARAIVA, D. T., FARIA, A. T., SILVA, A. A. AND SILVA, D. V. (2016). Persistence of imidazolinones in soils under a clearfield system of rice cultivation. **Planta Daninha**, 34(3): 589 – 596.

SPADOTTO, C.A. Uso de Herbicidas no Brasil. **Comitê de Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas**. 2002.Disponível em: http://www.cnpma.embrapa.br/herbicidas/ [Acessado em 15/05/2018].

STEFFEN, G.P.K; ANTONIOLLI Z.I , 2011. **Contaminação do solo e da água pelo uso de agrotóxicos**. Tecnologia 15:15-21, 2011.

SU X, CHEN X, HU J, SHEN C, DING L. Exploring the potential environmental functions of viable but non-culturable bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**:1-6 (2013).

SUMMERELL, B. A.; LESLIE, J. Fifty years of Fusarium: how could nine species have ever been enough? **Fungal Diversity**, v. 50, p. 135-144, 2011

SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. A., 2003.Utilitarian Approach to Fusarium Identification. **Plant Disease** 87, 117-128.

TIAN, L. S. AND CHEN, F. “Biological characteristics and degradation performance of a degrading strain,” **Yangzhou DaxueXuebao**, vol. 33, no. 1, pp. 86–90, 2012.

TU, M.; CALLIE, H.; RANDALL J.M. **The herbicides: Herbicide** Table a) 2,4-D. In: TU, M.; CALLIE, H.; RANDALL J.M. Weed Control Methods Handbook: Tools & Techniques for Use in Natural Areas. The Nature Conservancy, 2001, p.7a10.

USEPA (Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos**). Sobre Agrotóxicos. Pesticidas Home**. 2009. Disponível em: <http://www.epa.gov/ pesticidas / about / index.htm.> Acesso em: 19 de novembro de 2014.

US EPA (2005A). (**Imazapyr: Review for Use in Lakes & Ponds in Massachusetts** January, 2012).

URBEN, A. F. et al. Curso sobre Taxonomia de Fusarium spp. Brasília, Embrapa **Recursos Genéticos**, 2009.

VAN LIEDEKERKE, M.; PROKOP, G.; RABL-BERGER, S.; KIBBLEWHITE, M.; LOUWAGIE, G. Progress in the Management of Contaminated Sites in Europe.**Report EUR** 26376; European Union, Luxembourg, 2014; 1–68.

VASCONCELOS, Y. Agrotóxicos na berlinda, **Revista Pesquisa Fapesp**, São Paulo, n. 271, Ano 19, p. 18-27, set. 2018.

VASILYEVA, G. K., AND STRIJAKOVA, E. R. (2007).Bioremediation of soils and sediments contaminated by polychlorinated biphenyls. **Microbiology**., 76, 639.

VENCILL, W. L. et al. (Ed). Herbicide handbook.8.ed. Lawrence: **Weed Science Society of America**, 2002. 493 p

VENKATA MOHAN, S., PURUSHOTHAM REDDY, B., AND SARMA, P. M. (2009). Ex situ slurry phase bioremediation of chrysene contaminated soil with the function of metabolic function: Process evaluation by data enveloping analysis (DEA) and Taguchi design of experimental methodology (DOE). **Bioresource Technol**., 100, 164.

VERMA JP, JAISWAL DK (2016) Book review: advances in biodegradation and bioremediation of industrial waste. **Front Microbiol** 6:1–2. doi:10.3389/fmicb.2015.01555

VERMELHO, A. B. et al. **Práticas de Microobiologia**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006.

VIDALI, M. (2001).Bioremediation.Anoverview. **Pure App. Chem**., 73, 1163.

VILLA, S. C. C. et al. Arroz tolerante aimidazolinonas: controle do arroz-vermelho, fluxo gênico e efeito residual do herbicida em culturas sucessoras não-tolerantes. **Planta Daninha**, v. 24, n. 4, p. 761-768, 2006

VIZANTINOPOULOS S AND LOLOS L, Persistence and leaching of the herbicide Imazapyr® in soil. **Bull Environ ContamToxicol** 52:404–410 (1994).

VROUMSIA, T., STEIMAN, R., SEIGLEMURANDI, F., BENOITGUYOD. J. Fungal Bioconversion of 2,4- Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) and 2,4-Dichlorophenol (2,4-DCP). Chemosphere; 2005. 60: 1471–80 p.

VROUMSIA, T., R. STEIMAN, F. SEIGLE-MURANDI, J.L. Benoit-Guyod, and lin, metolachlor, and metribuzin in a commerce soil. J. Environ. A. Khadrani. 1996. Biodegradation of three substituted phenylurea Sci. Health B 33:529–546. herbicides (chlortoluron, diuron, and isoproturon) by soil fungi. A Kobayasi, Y., T. Matsushima, M. Takada, and H. Hagiwara. 1977. comparative study. **Chemosphere** 33:2045–2056.

WANG IK, Diffusion and Acceptance of Recommended Farm Practices for Increased Food Production. College of Agriculture, **Seoul National University**. (1971).

WAALWIJK, C et al. Discordant groupings of fusarium spp. From sections Elegans, Liseolas and Dlaminia based on ribosomal ITS1 and ITS 2 sequences. **Mycologia,** S.I, v.88, n.3 p .361-368, 1996.

WANG, Q.; WEIPING, L. Correlation of imazapyr adsorption and desorption with soil properties. **Soil Sci.**, v. 164, n. 6, p.411-416, 1999.

WARDLE, D.A.; PARKINSON, D. Influence of the herbicide glyphosate on soil microbial community structure. **Plant and Soil**, v. 122, n. 1, p.29-37, 1990.

WEAVER, M. A.; KRUTZ, L. J.; ZABLOTOWIKZ, R. M.; REDDY, K. N. Effects of glyphosate on soil microbial communities and its mineralization in a Mississippi soil. **Pest Management Science**, v. 63, n. 4, p. 388-393, 2007.

WOUDENBERG, J.H.C., AVESKAMP, M.M., GRUYTER, J. DE, SPIERS, A.G. AND CROUS, P.W. (2009). Multiple Didymella teleomorphs are linked to the Phoma clematidina morphotype. **Persoonia** 22: 56-62.

WHITE TJ, BRUNS T, LEE S, TAYLOR J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). **Academic Press**, New York, USA: 315–322.

XIE SG, WAN R, WANG Z, WANG QF (2013) Atrazine biodegradation by Arthrobacter strain DAT1: effect of glucose supplementation and change of the soil microbial community. **Environ Sci Pollut Res** 20:4078–4084.

YANG YY, WANG Z, XIE SG (2014) Aerobic biodegradation of bisphenol A in river sediment and associated bacterial community change. **Sci Total Environ** 470:184–1188

YADAV J S, REDDY C A (1993).Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX) by the lignin-degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. **Appl Environ Microbiol** 59(3), 756-762.

YOUNG-MI LEE, YONG-KEEL CHOI & BYUNG-RE MIN (2000) Molecular Characterization of Fusariumsolani and its Formae Speciales Based on Sequences

Analysis of the Internal Transcribed Spacer (ITS) Region of Ribosomal DNA. **Mycobiology**, 28:2, 82-88, DOI: 10.1080/12298093.2000.12015728

ZAMBERLAN, Jurandir; FRONCHETI, Alceu: **preservação do pequeno agricultor e o meio ambiente**. Petrópolis: Vozes, 2001.

ZHAO, P; WEN-JING, Q; WANG, Y et al., "Isolation and identification of two strains capable of degrading of organophosphorus pesticides and their biodegradation abilities," Lanzhou Ligong-**Daxue Xuebao**, vol. 36, no. 3, pp. 86–90, 2012.

ZHOU, X.; ROTONDARO, S. L.; MA, M.; ROSSER, S. W.; OLBERDING, E. L.; WENDELBURG, B. M.; 479 ADELFINSKAYA, Y. A.; BALCER, J. L.; BLEWETT, T. C.; CLEMENTS, B., Metabolism and residues of 480 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in DAS-40278-9 maize (Zea mays) transformed with 481 aryloxyalkanoate dioxygenase-1 gene. **J. Agric. Food Chem**. **2016**, 64, 7438-7444.

ZOBELL CE (1946) Action of microorganisms on hydrocarbons. **Bacterial Reviews** 10: 1-49.