UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da microbiota do solo em resposta ao herbicida 2,4-D

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Biociências e Biotecnologia

Orientada: Jéssica Aparecida Silva Moretto

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Biociências e Biotecnologia em 12/09/2019. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2019

RESUMO

MORETTO, J. A. S. Avaliação da microbiota do solo em resposta ao herbicida 2,4-D. 2019. 85f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A biodiversidade microbiana é formada por micro-organismos cultiváveis e não-cultiváveis e as técnicas de metagenômica oferecem ferramentas para investigar a ecologia microbiana de maneira mais rica e detalhada. O objetivo desse estudo foi verificar as alterações causadas na comunidade bacteriana do solo frente à pressão seletiva exercida pela presença do herbicida 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético) em diferentes concentrações, quantificar o número de cópias do gene *tfdA*, o qual está envolvido na degradação do herbicida 2,4-D e também do gene *nifH*, o qual está envolvido na fixação biológica de nitrogênio. Além disso, o estudo determinou a microbiota do solo antes e após a exposição ao 2,4-D. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles realizados em Michigan (EUA) para avaliar o grau de semelhança entre os estudos. Em uma área experimental agrícola brasileira, foram construídos três *plots*, em triplicata, sendo que um *plot* foi utilizado como controle negativo, sem aplicação de herbicida, e nos demais foram aplicadas diferentes concentrações do herbicida. Enquanto que em Michigan os experimentos foram conduzidos na área experimental de Pesquisas Ecológicas de Longa Duração da Estação Biológica Kellogg, entre o ano de 1988 a 1992. Oito *plots* foram construídos nessa área e em cada quadrante foi aplicada uma concentração diferente do herbicida 2,4-D, além do controle negativo. O DNA total foi extraído diretamente de todas as amostras de solo e estes DNAs foram utilizados nas técnicas de DGGE (Eletroforese em Gradiente Desnaturante), qPCR (PCR quantitativa) e sequenciamento do gene 16S rRNA. Os resultados demonstraram que a comunidade microbiana apresentou um gradiente de distribuição ao longo das doze semanas após o tratamento com herbicida, de acordo com a DGGE. O número de cópias do gene *tfdA* por grama de solo foi diretamente proporcional à concentração de herbicida aplicado e o gene *nifH* foi amplamente distribuído entre as amostras de solo, ou seja, a presença do herbicida 2,4-D não alterou a população fixadora de nitrogênio. Através do sequenciamento do gene 16S rRNA foi possível observar que os filos Acidobacteria e Proteobacteria foram os mais abundantes tanto nas amostras de solo do Brasil quanto nas amostras de solo dos EUA. Dessa forma é possível sugerir que a presença do herbicida 2,4-D não altera a microbiota de maneira significativa.

Palavras-chave: DGGE; Sequenciamento 16S rRNA; Acidobacteria; Proteobacteria.

ABSTRACT

MORETTO, J. A. S. Soil microbiota evaluation in response to the herbicide 2,4-D. 2019. 85f. Thesis (Ph. D's Degree). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Microbial biodiversity is composed by cultivable and non-cultivable microorganisms and metagenomic techniques offer tools to investigate microbial ecology in a richer and more detailed way. The aim of this study was to verify the alterations caused in the soil bacterial community against the selective pressure exerted by the presence of 2,4-D (2,4-Dichlorophenox-acetic) herbicide in different concentrations, to quantify the number of copies of the *tfdA* gene, which is involved in the degradation of herbicide 2, 4-D and also the *nifH* gene, which is involved in the biological fixation of nitrogen. In addition, the study determined the soil microbiota before and after exposure to 2,4-D. The results obtained were compared with those performed in Michigan (USA) to assess the degree of similarity between the studies. In a Brazilian agricultural experimental area, three plots were constructed in triplicate, one plot was used as a negative control, without application of herbicide, and in the others different concentrations of the herbicide were applied. While in Michigan the experiments were conducted in the experimental area of Long-Term Ecological Research of the Kellogg Biological Station from 1988 to 1992. Eight plots were constructed in this area, and in each quadrant was applied a different concentration of herbicide 2,4 -D, plus the negative control. Total DNA was extracted directly from all soil samples and these DNAs were used in the DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), qPCR (quantitative PCR) and 16S rRNA gene sequencing techniques. The results showed that the microbial community presented a distribution gradient over the twelve weeks after treatment with herbicide, according to DGGE. The number of copies of the *tfdA* gene per gram of soil was directly proportional to the concentration of herbicide applied and the *nifH* gene was widely distributed among soil samples, that is, the presence of 2,4-D herbicide did not alter the nitrogen-fixing population. Through the sequencing of the 16S rRNA gene it was possible to observe that the Acidobacteria and Proteobacteria phyla were the most abundant in the Brazilian soil samples as well as in the US soil samples. Thus, it is possible to suggest that the presence of 2,4-D herbicide does not significantly alter the microbiota.

Key- Words: DGGE, 16S rRNA sequencing; Soil, Acidobacteria; Proteobacteria.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A agricultura teve início no Brasil na década de 1940, com o registro do primeiro praguicida para controle de pragas nas lavouras, e, desde então, a utilização desses compostos gerou aumento na produção agrícola. De acordo com Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), atualmente o Brasil com apenas 7% do território agricultado (NASA, 2019) é um dos maiores produtores de alimento do mundo e, consequentemente, também é um dos maiores exportadores desses produtos, atividade que desempenha papel importante na economia local, uma vez que o agronegócio é um dos pilares da economia brasileira (CEPEA-ESALQ/USP, 2019).

Devido ao aumento da produção mundial de alimentos, o gasto mundial com uso de praguicidas é de aproximadamente 38 bilhões de dólares por ano, somente o Brasil gasta 8,5 bilhões de dólares por ano (PAN-GERMANY, 2012). Nesse sentido, o Brasil está classificado em quinto lugar no ranking de maiores consumidores de praguicidas no mundo, ficando atrás da China, Estados Unidos, Argentina e Tailândia (AMEBER, 2017), uma vez que o Brasil possui uma ampla área de cultura em clima tropical e, devido a esse clima, não é possível o controle natural de pragas agrícolas, como acontece no inverno em países de clima temperado, como Estados Unidos e países Europeus (LUIZ, 2015).

Os praguicidas desempenham efeitos positivos na agricultura se utilizados corretamente, porém, é extremamente necessário seguir as recomendações de dose e a regulagem dos equipamentos, além do intervalo de aplicações, evitando assim a contaminação dos solos e das águas, além da contaminação de produtos comestíveis (LUIZ, 2015).

1.1 Praguicidas

Os praguicidas são compostos químicos também denominados como pesticidas, praguicidas, defensivos agrícolas, biocidas e agroquímicos; cuja finalidade é proteger as culturas agrícolas e erradicar as pragas, doenças e ervas daninhas. Os praguicidas podem ser divididos em diferentes grupos, entre eles, os fungicidas, os acaricidas, os inseticidas, os nematocidas e os herbicidas (ANVISA, 2019).

De acordo com FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), o uso de praguicidas por área tem crescido anualmente em todo o mundo. Durante a década de 1990, a média do uso de praguicida por área plantada no mundo era de 1,5kg/ha, porém esse número

creceu para 2,57 kg/ha em 2016. Enquanto que a média do Brasil subiu de 0,87 kg/ha para 4,31 kg/há (figura 1).

Figura 1. Média do uso de praguicidas por área plantada

Fonte: FAO, 2017.

A vasta utilização de praguicidas concentra-se, principalmente, nas áreas de agricultura irrigada. Devido à expansão agrícola na região centro-oeste, o estado com maior consumo de praguicidas no Brasil é o Mato Grosso (Figura 2).

Figura 2. Estimativa do consumo de praguicidas utilizados nas culturas agrícolas estudadas por municípios do Brasil em 2015.

Fonte: (PIGNATI et al. 2017)

Os praguicidas podem exercer efeitos tóxicos a organismos não alvos quando não utilizados corretamente (CARVALHO 2017) e podem ser encontrados no ar, no solo, na poeira, nos alimentos, na água e em produtos para consumo humano (FOSTER *et al.*, 2017).

Os praguicidas normalmente acumulam-se no solo após repetidas aplicações, ocasionando impacto ao ambiente ainda que utilizados em doses recomendadas. Assim, é importante entender o papel desses compostos no ambiente para avaliar os riscos de contaminação do solo, águas superficiais e subterrâneas e ainda, os impactos decorrentes da utilização desses praguicidas, visto que nos próximos anos é indispensável o uso de praguicidas na intensa produção de alimentos (CARVALHO, 2017). Deste modo, estudos voltados para a preservação do solo e dos ecossistemas são indispensáveis.

1.1.2 Herbicidas

Os herbicidas são utilizados na agricultura com o objetivo de matar ou suprimir o crescimento de ervas daninhas (espécies específicas), plantas que crescem e disputam espaço,

água, nutrientes e sais minerais com as culturas de interesse (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005; ROMAN *et al.*, 2005).

Os herbicidas podem ser aplicados diretamente nas folhas ou no solo e podem ser classificados como herbicidas de contato ou sistêmicos. Os herbicidas de contato são aqueles onde a aplicação é realizada diretamente nas folhas e o efeito ocorre somente onde houve contato com a planta, enquanto que nos sistêmicos, após a aplicação, estes são absorvidos e transportados pela planta (MARCHI *et al.*, 2008). Eles podem ainda ser classificados quanto ao grupo químico, uso (aplicação pré-emergente e pós-emergente) e pelo seu mecanismo de ação (inibição de proteínas, de enzimas e da divisão celular, inibidores do transporte de elétrons na fotossíntese e da biossíntese de lipídios e de aminoácidos) (ROMAN *et al.*, 2005).

Os herbicidas representam aproximadamente 40% de todos os praguicidas utilizados na agricultura mundial (PROSSER *et al.*, 2016). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2013), os herbicidas representam 45% dos praguicidas comercializados no Brasil (Figura 2), sendo o 2,4-Diclorofenilacético (2,4-D) um dos herbicidas mais comercializados no país (Figura 3), representando cerca de 13% dos herbicidas utilizados no Brasil.

Figura 3. Praguicidas comercializados no Brasil no ano de 2013.

Fonte: ANVISA, 2013.

Figura 4. Distribuição dos praguicidas no Brasil (2005).

Fonte: ANVISA, 2013

Os herbicidas são aplicados no sistema solo-planta e os processos de distribuição desses compostos no solo são a adsorção, a lixiviação, a drenagem, a volatilização e a degradação (STEFFEN *et al.*, 2011). A adsorção é uma ligação reversível do praguicida às partículas do solo e depende do tipo e do teor de matéria orgânica existente no local, das características da carga do composto e também do pH do solo. A lixiviação é o transporte do praguicida pelo solo, os quais podem atingir as águas subterrâneas, enquanto que o escoamento ou drenagem é induzida pela chuva ou irrigação e podem levar a contaminação principalmente de águas superficiais. A volatilização ocorre pela evaporação do praguicidas para o ar, causada por vários fatores, dentre eles a pulverização e aplicação aérea, prática que possivelmente afeta a saúde de peixes, anfíbios e aves (LANGENBACH *et al.*, 1995; GHIMIRE & WOODWARD, 2013; GILL & GARG, 2014).

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

No início da década de 1940, o herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) foi o primeiro herbicida a ser registrado no Brasil (POKORNY, 1941) e, desde então, é um dos herbicidas mais utilizados no país.

Este composto tem sido mundialmente utilizado no controle de ervas daninhas de folhas largas em diferentes culturas como trigo, milho, soja, arroz, aveia, sorgo, cana-de-açúcar, café, pastagens e em florestas. Este herbicida atua como um regulador de crescimento em plantas e

possui efeito análogo ao hormônio auxina e, ao contrário de muitos dos compostos sintéticos liberados no meio ambiente, o 2,4-D é mineralizado rapidamente pelas bactérias do solo (BIEDERBECK *et al.*, 1987). A estrutura química do 2,4-D é representada na figura 4.

Figura 5. Estrutura química da molécula 2,4-D

Fonte: disponível em: <<http://pt.pesticides-suppliers.com/herbicide/2-4-dichlorophenoxyacetic-acid-herbicide.html>>

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o 2,4-D é classificado com nível de toxicidade I e geralmente tem baixa toxicidade para humanos, toxicidade moderada para pássaros e mamíferos, é ligeiramente tóxico para peixes e invertebrados aquáticos, e é praticamente não tóxico para as abelhas, segundo a Agência de Proteção Ambiental (United States Environmental Protection Agency- EPA, 2017). Entretanto, estudos recentes sugerem que a exposição ao 2,4-D está associada ao aumento dos riscos de linfomas não-Hodgkin (SMITH *et al.*, 2017). A exposição pode ocorrer através da inalação, do contato direto com a pele ou por ingestão e, na grande maioria dos casos, a via predominante de exposição ocorre através da pele (CHAUDRY & HUANG, 1988). De modo geral, os indivíduos se expõem a esses compostos devido à falta ou má utilização dos equipamentos de proteção individual (EPIs).

Embora o uso de praguicidas seja essencial para o aumento da produção agrícola, é necessário considerar os efeitos negativos dessa prática na fertilidade do solo e também em organismos não alvos, tais como os micro-organismos, os quais são responsáveis pelos processos de decomposição, mineralização e ciclagem de nutrientes no solo (PERUCCI *et al.*, 2000).

1.2 Micro-organismos degradadores de 2,4-D

A biodegradação do herbicida 2,4-D tem sido intensamente estudada, uma vez que os genes codificadores das enzimas envolvidas no metabolismo de degradação desse composto já

foram bem caracterizados. A via de degradação do 2,4-D é iniciada pela enzima cetoglutarato-dioxigenase dependente de 2,4-D, a qual catalisa a oxidação simultânea de 2,4-D e cetoglutarato para gerar 2,4-DCP, sendo essa enzima codificada pelo gene *tfdA*. A enzima 2,4-DCP hidroxilase codificada pelo gene *tfdB* transforma 2,4-DCP hidroxilado em 3,5-dichlorocatechol (3,5-DCC). Esta molécula é posteriormente metabolizada em ácido tricarboxílico (TCA) através de uma via de clivagem do anel intradiol, codificada pelos genes *tfdCDEF*. Estes genes estão descritos em plasmídeos (KITAGAWA *et al.*, 2002). A seguinte via está apresentada na figura 5.

Figura 6. Via de degradação da molécula 2,4-D codificada por genes *tfd*. TCA (Ciclo do ácido tricarboxílico)

Fonte: KITAGAWA *et al.*, (2002).

O processo de biodegradação desse composto é realizado principalmente por bactérias e fungos. Estudos recentes demonstraram o fungo *Umbelopsis isabellina* possui a capacidade de crescer na presença do herbicida 2,4-D e degradar o mesmo (NYKIEL-SZYMAŃSKA *et al.*, 2018). Porém, não há informações detalhadas de como o mecanismo fúngico atua na degradação desse herbicida.

Por outro lado, a biodegradação de herbicidas por bactérias está bem detalhada, alguns estudos mostram que micro-organismos isolados em diferentes locais do mundo, tais como Japão, Estados Unidos, Dinamarca e China, entre outros países, são capazes de biodegradar o 2,4-D (ITOH *et al.*, 2002; MARRO & GALI, 2006; VALLAEYS *et al.*, 1996; TONSO *et al.*, 1995).

Cupriavidus necator é uma das bactérias mais amplamente estudadas e a via de degradação, bem como os genes responsáveis pela degradação do herbicida 2,4-D, foram caracterizados principalmente nesse micro-organismo. Outras bactérias como *Achromobacter* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Burkholderia* sp., *Delftia acidovorans*, *Pseudomonas* sp., *Sphingobium* sp. e outros gêneros também já foram descritos como biodegradadores de 2,4-D (SAKAI *et al.*,

2014; BAEUM *et al.*, 2010; HOFFMANN *et al.*, 2003; VALLAEY *et al.*, 1999; KAMAGATA *et al.*, 1997; KAT *et al.*, 1994;). Além dos isolados em cultura pura, os consórcios microbianos também estão envolvidos no processo de biodegradação desse herbicida, e estudos recentes demonstraram que a comunidade microbiana supraglacial da Groelandia é capaz de degradar o 2,4-D (STIBAL *et al.*, 2018).

1.3 O solo e sua microbiota

O solo é um sistema dinâmico, heterogêneo e complexo, que abriga a maior diversidade microbiana do meio ambiente. Portanto, sua conservação é fundamental para o equilíbrio e funcionamento de todo o ecossistema. (LEITE, 2007; ROESCH *et al.*, 2007; GARDI & JEFERRY, 2009; STEFFEN *et al.*, 2011; CARDOSO & ANDREOTE, 2016).

A composição do solo reflete na diversidade microbiana e estima-se que um grama de solo contém milhões de bactérias, arqueas, vírus e fungos, a qual varia de acordo com a fertilização, a aeração, a temperatura, a umidade, a presença de matéria orgânica e de nutrientes, e também devido a fatores bióticos como competição e parasitismo (KAKIRDE *ET AL.*, 2010). Os micro-organismos desempenham importantes funções na estruturação do solo, tais como ciclagem de nutrientes, controle biológico, decomposição da matéria orgânica, degradação de poluentes, solubilização de minerais (LEITE, 2007) e também contribuem para o crescimento e nutrição das plantas através da fixação de nitrogênio.

As plantas e bactérias vivem em simbiose, formando os nódulos em suas raízes, e é nesse ambiente que as bactérias convertem o nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia NH_3 , que então é utilizado pelas plantas como fonte de nitrogênio para seu crescimento. A fixação biológica de nitrogênio exclui o uso de fertilizantes nitrogenados, de poluentes e do alto custo por parte dos agricultores (SILVEIRA & FREITAS, 2007; RAAIJMAKERS *et al.*, 2009; BAEUM *et al.*, 2010; BERENDSEN *et al.*, 2012; EMBRAPA, 2017).

O gene *nifH* codifica uma das enzimas essenciais para o funcionamento do complexo enzimático da nitrogenase, e este gene é utilizado como marcador molecular na maioria dos estudos sobre fixação biológica de nitrogênio (ZEHR *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2006; WAKELIN, 2007). Estudos descrevem que quanto mais complexa é a comunidade microbiana de um ambiente, maior é a sua estabilidade e o equilíbrio biológico, uma vez que a sobrevivência de um patógeno em um ambiente é inversamente proporcional à biodiversidade microbiana do mesmo (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; VAN ELSAS *et al.*, 2012).

Embora seja possível compreender que após um impacto ambiental, seja este causado por um evento da natureza ou por atividades humanas, o solo mantenha a sua capacidade de retornar ao seu estado original, ou seja, de restabelecer a sua comunidade de organismos, o uso intensivo de agroquímicos promove alterações na biomassa microbiana e formação de grandes quantidades de resíduos tóxicos e, ao longo do tempo, estas transformações são quase sempre irreversíveis e os danos ao ambiente dificultam a sua recuperação (STEFFEN *et al.*, 2011).

1.4 Microbioma

As comunidades microbianas são construídas com base em um grande número de indivíduos de cada espécie (ROBBINS *et al.*, 2016), os quais podem proliferar rapidamente e apresentar altas taxas de mutação, sendo capazes de realizar transferências de genes em diferentes grupos filogenéticos (MCDONALD & CURRIE, 2017). Porém, ainda são necessários muitos estudos para entender a organização de tais comunidades complexas.

Atualmente, a diversidade microbiana é um dos temas mais abordados dentro da ciência e a possibilidade de acesso a grande maioria dos micro-organismos de maneira mais acurada originou o termo microbioma, que compreende metodologias independentes de cultivo, visto que aproximadamente 99% dos organismos do solo não podem ser cultivados (BRIDGE & SPOONER, 2001; STREIT & SCHMITZ, 2004). Portanto, o termo microbioma compreende um conjunto de micro-organismos que ocupam conjuntamente um ambiente (BOON *et al.*, 2014).

Os microbiomas sustentam processos biogeoquímicos, as bases das cadeias alimentares e ainda reciclam carbono e nutrientes. Assim, os micro-organismos são responsáveis pela determinação das respostas dos ecossistemas às mudanças ambientais.

Muitos estudos estão voltados para as causas e as consequências da estabilidade do microbioma, e buscam entender as respostas de microbiomas complexos frente à pressão seletiva, associadas à mudança ambiental (SHADE, 2017). Essa complexa biodiversidade de organismos permaneceu inexplorada por várias décadas, mas com o desenvolvimento de técnicas moleculares (metagenômicas) houveram avanços no estudo de ecologia microbiana. Essas técnicas estão focadas nas sequências do gene 16S rRNA e indicam que existem vários grupos de micro-organismos em muitos ambientes, visto que apenas aproximadamente 1% destes micro-organismos pode ser cultivado em meios de cultura sintéticos. Portanto, para investigar a ecologia microbiana em uma escala mais rica e detalhada aplicam-se as ferramentas

das técnicas de metataxonômica (ANDREOTE *et al.*, 2009; HIRSCH *et al.*, 2010; KAKIRDE *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2017), sendo essa uma das linhas de pesquisas mais promissoras em busca de inovações teóricas (PYRLO *et al.*, 2014; BOON *et al.*, 2014; ANDREOTE, 2014; CARDOSO & ANDREOTE, 2016).

Nesse sentido, vários pesquisadores brasileiros estão coletando amostras e depositando sequências que foram geradas em várias regiões do Brasil, com o objetivo de reunir informações relevantes sobre a diversidade microbiana, do ponto de vista funcional e genético, no projeto Microbioma Brasileiro. (PYLRO *et al.*, 2013). Porém, ainda há um grande desafio ao avaliar o microbioma do solo brasileiro, principalmente em regiões tropicais, uma vez que há uma vasta heterogeneidade física e química no solo, os quais sofrem alterações espaciais e temporais muito intensas. Apesar dos inúmeros estudos, o acervo microbiano brasileiro ainda encontra-se amplamente desconhecido (ANDREOTE *et al.*, 2014).

CONCLUSÕES

2. CONCLUSÕES

- A comunidade microbiana foi mais influenciada pelo tempo do que pelos diferentes tratamentos com o herbicida 2,4-D.
- O número de cópias do gene *tfdA* por grama de solo foi diretamente proporcional à concentração de herbicida aplicado e o maior número de cópias do gene *tfdA* por grama de solo foi observado na segunda semana.
- O aumento do número de cópias do gene *tfdA* pode refletir o tamanho da comunidade microbiana possuindo este gene e/ou no aumento do número de cópias dos plasmídeos que o transportam.
- O número de cópias do gene *nifH* foi amplamente distribuído entre as amostras de solo, ou seja, a presença do herbicida 2,4-D não alterou a população fixadora de nitrogênio.
- Os representantes dos filos Acidobacteria e Proteobacteria foram os mais abundantes, tanto nas amostras de solo do interior de São Paulo quanto nas amostras de solo de Michigan. Porém, em Michigan, os representantes dos filos Actinobacteria e Bacteriodetes também foram bastante abundantes.
- De acordo com o sequenciamento do gene 16S rRNA, o gênero *Sphingomonas* foi o mais abundante nas amostras de solo do interior de São Paulo (Brasil), porém, outros gêneros como *Bradyrhizobium*, *Burkholderia* e *Arthrobacter* também foram abundantes nessas amostras.
- As análises de DGGE apresentaram resultados semelhantes ao sequenciamento do gene 16S rRNA, portanto a DGGE corrobora com o sequenciamento.
- O NMP exibiu padrões semelhantes em resposta ao tratamento com 2,4-D em ambos os experimentos.

- O número de micro-organismos degradadores de 2,4-D foi diretamente proporcional à concentração de herbicida em estudo, ou seja, o maior número de micro-organismos degradadores de 2,4-D foi observado nas amostras de solo tratados com concentrações de 10 e 100 x, respectivamente.

***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOIM, M.C.R.; BARBOSA, J.C.; COUTINHO, H.L.; ROSADO, S.A. *Avaliação de Diversidade microbiana em amostras de solos- Técnica do PCR/DGGE*. Rio de Janeiro, RJ, Embrapa solos, 2004.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Relatório de Atividades 2017*. Brasília DF, 2018.

AGUIAR, A.C.F. *Sustentabilidade do sistema plantio direto em argissolo no trópico úmido*, Botucatu, 2006.

AMODU, O.S; NTWAMPE, S.K.O; OJUMU, T.V. **Improving biodegradation of benzo (Ghi) perylene in soil: Effects of bacterial co-culture, agrowaste and biosurfactant supplementation improving biodegradation of benzo (ghi) perylene in soil: effects of bacterial co-culture, agrowaste and biosurf**, 2019.

ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. *Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants*. Brazilian Journal of Microbiology, v. 40, p. 417–432, 2009.

ANDREOTE, F.D.; GUMIERE, T.; DURRER, A. *Exploring interactions of plant microbiomes*. Scientia Agricola, v. 6, p. 528-539, 2014.

ANDRIGHETTI, M.S. **Biodegradação de glifosato por bactérias isoladas de solos cultivados com macieira com diferentes históricos de aplicação deste herbicida**, Porto Alegre, RS. 2011.

ATAMANIUK, T.M.; KUBRAK, O.I.; STOREY, K.B.; LUSHCHARK, V.I. *Oxidative stress as a mechanism for toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D): studies with goldfish gills*. [Ecotoxicology](#), v. 22, p. 1498-508, 2013.

BÆLUM, J., PRESTAT, E., DAVID MM *et al*. **Modeling of phenoxy acid herbicide mineralization and growth of microbial degraders in 15 soils monitored by quantitative real-time PCR of the functional tfdA gene**. *Appl Environ Microbiol*, v.78, p. 5305–5312, 2012.

BAELUM, J.; JACOBSEN, C.S.; HOLBEN, W.E. *Comparison of 16S rRNA gene phylogeny and functional tfdA gene distribution in thirty-one different 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid degraders*. Syst Appl Microbiol, v. 33, p. 67–70, 2010.

Balmer, M., Sulzberger, B. **Atrazine degradation in irradiated iron/oxalate systems: effects of pH and oxalate**. Environmental Science Technology, v.33, p.2418-2424, 1999.

BERENDSEN, R.L.; PIETERSE, C.M.J; BAKKER, P.A.H.M. **The rhizosphere microbiome and plant health**. Trends in plant science, v. 17, n. 8, p. 478–486, 2012.

BERENDSEN, R.L; PIETERSE, C.M.J; BAKKER, P.A.H.M. *The rhizosphere microbiome and plant health*. Trends in Plant Science, v.8, p. 478- 486, 2012.

BHAT S V., BOOTH SC, MCGRATH SGK *et al*. **Rhizobium leguminosarum bv. viciae 3841 adapts to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid with “auxin-like” morphological changes, cell envelope remodeling and upregulation of central metabolic pathways**. PLoS One, v.10, p. 1–21, 2015.

BIEDERBECK, V. O., CAMPBELL, C. A.; SMITH, A.E. **Effects of long-term 2,4-D field applications on soil biochemical processes**. J. Environ. Qual, v.16, p257-262, 1987.

BONFLEUR, E.J., TOMISIELO, V.L., REGITANO, J.B., LAVORENTI, A. **The Effects of Glyphosate and Atrazine Mixture on Soil Microbial Population and Subsequent Impacts on Their Fate in a Tropical Soil**. Water, Air and Soil Pollution, v.226, p. 21, 2015.

BOON, E. et al. **Interactions in the microbiome: communities of organism and communities of genes**. FEMS Microbiology Reviews, Amsterdam. V. 38, p. 90-118, 2014.

BORTOLOZI, A., EVANGELISTA de DUFFARD, F., DAJA, R., SILVEIRA, R. *Intracerebral administration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induces behavioral and neurochemical alterations in the rat brain*. Neurotoxicology, v. 22, p. 221–32, 2001.

BRIDGE, P; SPOONER, B. **Soil fungi: diversity and detection**. Plant and Soil, The Hague, v. 232, p. 147-154, 2001.

BUKOWSKA, B. *Toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid – molecular mechanisms*. Pol J Environ Stud, v.15, p. 365–74, 2006.

BURNS, C.J., SWAEN, G.M. *Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) biomonitoring and epidemiology*. Crit Rev Toxicol., v. 42, p. 768–86, 2012.

CARDOSO, E.J.B.N & ANDREOTE, F.D. **Microbiologia do solo**. 2a edição. Esalq, Piracicaba (SP), 2016.

CARVALHO, F.P. Pesticides, environment and food safety. **Food and Energy Security**, 6(2): 48-60, 2017. DOI: 10.1002/fes3.108.

Carvalho, L.B. *Herbicidas*. 1 ed. Lages, 2013.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA (CEPEA-ESALQ/USP). 2019. Disponível em: www.cepea.esalq.usp.br, último acesso em: julho de 2019.

CHAUDRY, G. R.; HUANG, G. H. *Isolation and characterization of a new plasmid from a Flavobacterium sp. which carries the genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate*. J. Bacteriol., v.170, p.3897–3902, 1988.

CHAUHAN, P.S.; JHA, B. **Pilot scale production of extracellular thermo-alkali stable laccase from Pseudomonas sp. S2 using agro waste and its application in organophosphorous pesticides degradation**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 93, n. 4, p. 1022–1030, 2018.

COADY, K.; MARINO, T.; THOMAS, J.; SOSINSKI, L.; NEAL, B.; HAMMOND, L. *An evaluation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in the amphibian metamorphosis assay and the fish short-term reproduction assay*. Ecotoxicology Environmental Safety, v. 90, p. 143–50, 2013.

CULLIMORE, D. R. **The enumeration of 2,4-D degraders on of 2,4-D degraders. The observed gradual shift of Saskatchewan soils**. Weed Sci, v.29, p.440-443, 1981.

DAI Y, L. I. N.; ZHAO, Q.; XIE, S. **Bioremediation using Novosphingobium strain DY4 for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-contaminated soil and impact on microbialcommunity**. Biodegrad., v. 6, p. 161-170, 2015.

DE SOUZA, M. L., NEWCOMBE, D., ALVEY, S., CROWLEY, D. E., HAY, A., SADOWSKY, M. J., WACKETT, L. P. **Molecular basis of a bacterial consortium: Interspecies catabolism of atrazine**. Applied Environmental Microbiology, v. 64, n.1, p. 178, 1998.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Embrapa Solos. *Sistema brasileiro de classificação de solos*. 3 ed. Brasília DF, 2013.

FANG, C.; RADOSEVICH, M.; FUHRMANN, J. J. **Atrazine and phenanthrene degradation in grass rhizosphere soil**, v. 33, 2001.

FELD, Louise et al. **Pesticide Side Effects in an Agricultural Soil Ecosystem as Measured by amoA Expression Quantification and Bacterial Diversity Changes**. PloS one, v. 10, n. 5, p. 1260-1280, 2015.

FOSTER, W.G., EVANS, J.A., LITTLE, J., ARBOUR, L., MOORE, A., SAUVE, R., LEÓN, J.A., LUO, W. Human exposure to environmental contaminants and congenital anomalies: a critical review. **Critical Reviews in Toxicology**, 47(1): 59-84, 2017. DOI: 10.1080/10408444.2016.1211090.

FOX JE, GULLEDGE J, ENGELHAUPT E *et al.* **Pesticides reduce symbiotic efficiency of nitrogen-fixing rhizobia and host plants**. *Proc Natl Acad Sci*, v.104, p.10282–10287, 2007.

GARABRANT, D.H.; PHILBERT, M.A. **Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) epidemiology and toxicology**. Crit. Rev.Toxicol., v. 32, p. 233–57, 2002.

GARDI, C., JEFFERY, S. **Soil and Biodiversity**: JRC Scientific and Technical Reports. European Communities, 2009.

GARDI, C.; JEFFERY, S. **Soil and Biodiversity**. JRC Scientific and Technical Reports. European Communities, 2009.

- GATTINGER, A., PALOJÄRVI, A., SCHLOTER, M., **Soil Microbial Communities and Related Functions, Perspectives for Agroecosystem Management**. Elsevier B.V, Chapter 3.4, 2008.
- GAYLARDE, C.C.; BELLINASSO, M.D.L.; MANFIO, G. P. **Aspéctos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos**. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, n.34, 2005.
- GHANI, A., WARDLE, D. A. **Fate of C-14 from glucose and the herbicide metsulfuron-methyl in a plant-soil microcosm system**. Soil Biology & Biochemistry, v.33, p.777–785, 2001.
- GHIMIRE, N.; WOODWARD, R. *Under- and over-use of pesticides: An international analysis*. Ecological Economics, v. 89, p. 73-81, 2013.
- GIGLIOTTI, C, ALLIEVI, L.; SALARDI, C.; FERRARI, F; FARINI, A. **Microbial ecotoxicity and persistence in soil of the herbicide bensulfuron-methyl**. Journal Environmental Science Health Part B Pesticides, v.33, p.381–398, 1998.
- GILL, H.K., GARG, H. *Pesticides: environmental impacts and management strategies*, Pesticides - toxic aspects, Dr. Sonia Soloneski (Ed.), InTech, 2014. DOI: 10.5772/57399. Disponível em: < <https://www.intechopen.com/books/pesticides-toxic-aspects/pesticides-environmental-impacts-and-management-strategies>>. Acesso em: 30 jan. 2018.
- GIRVAN, M.S., BULLIMORE, J. BALL, A.S., PRETTY, J.N., OSBORN, M.A. **Responses of Active Bacterial and Fungal Communities in Soils under Winter Wheat to Different Fertilizer and Pesticide Regimens**. 70: 2692–2701, 2004.
- GONOD, L.V., MARTIN-LAURENT, F., CHENU, C., *2,4-D impact on bacterial communities, and the activity and genetic potential of 2,4-D degrading communities in soil*. FEMS Microbiol. Ecol, v. 58, p. 529–537, 2006.
- HAN, L., ZHAO, D., LI, C. **Isolation and 2,4-D-degrading characteristics of *Cupriavidus campinensis* BJ71**. Brazilian Journal of Microbiology, v.46, p. 433-441, 2015.

HIRSCH, P.R., MAUCLINE, T.H., CLARK, I.M. **Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology.** *Soil Biology & Biochemistry*, v. 42, p. 878-887, 2010.

HOFFMANN, D. et al. **A Transposon Encoding the Complete 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid Degradation Pathway in the Alkalitolerant Strain Delftia Acidovorans P4a Printed in Great Britain.** *Microbiology*, v. 149, p. 2545–2556, 2003.

HOLBEN, W.E., SCHROETER, B.M., CALABRESE, V.G., OLSEN, R.H., KUKOR, J.K., BIEDERBECK, V.O., SMITH, A E., TIEDJE, J.M. **Gene probe analysis of soil microbial populations selected by amendment with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.** *Appl. Environ. Microbiol*, v.58, p.3941–3948, 1992.

ITOH, K. et al. **TfdA -Like Genes in 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid-Degrading Bacteria Belonging to the Bradyrhizobium-Agromonas-Nitrobacter-Afipia Cluster in Proteobacteria.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 7, p. 3449–3454, 2002.

JOFRÉ, Edgardo et al. **2,4-Dichlorophenoxyacetic acid affects the attachment of Azospirillum brasilense Cd to maize roots.** *Toxicology*, v. 107, n. 1, p. 9–15, 1996.

KAKIRDE, K.S., PARSLEY, L.C., LILES, M.R. **Size does matter: application-driven approaches for soil metagenomics.** *Soil Biology & Biochemistry*, v.42, p.1911-1923, 2010.

KAMAGATA, Y. et al. **Pristine Environments Harbor a New Group of Oligotrophic 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid-Degrading Bacteria.** *Appl Environ Microbiol*, v. 63, n. 6, p. 2266–2272, 1997.

KAT, J.; HOLBENT, W. E.; TIEDJE, J. M. **Use of Gene Probes To Aid in Recovery and Identification of Functionally Dominant 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid-Degrading Populations in Soil.** *Appl Environ Microbiol.*, v. 517, p. 0–4, 1994.

KITAGAWA, W.; TAKAMI, S.; MIYAUCHI, K. et al. **Novel 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation genes from oligotrophic Brady**

- rhizobium sp strain HW13 isolated from a pristine environment.** J Bacteriol, v. 184, p. 509–18, 2002.
- LANGENBACH, T.; PAIM, S. **Os Pesticidas no Ecossistema do Solo.** Ecologia Brasiliensis, v.1, p. 349-363, 1995.
- LEITE, L.F.C. **Ecologia microbiana do solo.** 1 ed. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2007.
- LEVY-BOOTH DJ, PRESCOTT CE, GRAYSTON SJ. **Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems.** *Soil Biol Biochem*, v.75, p.11–25, 2014.
- LIPTHAY, J. R.; TUXEN, N.; JOHNSEN, K.; HANSEN, L.H; ALBRECHTSEN, H.J.; BJERG, P. L.; AAMAND, J. **In situ exposure to low herbicide concentrations affects microbial population composition and catabolic gene frequency in an aerobic shallow aquifer.** *Appl. Environ. Microbiol*, v.69, p.461–467, 2003.
- LUIZ, A.J.B. **Agrotóxicos são do mal?** Embrapa Meio Ambiente, 2015. Disponível em:<<https://www.embrapa.br/buscadenoticias//noticia/6248227/artigoagrotoxicossao-do-mal>>. Acesso em: 07 de julho de 2019.
- MARCHI, G., MARCHI, E.C.S., GUIMARÃES, T.G. **Herbicidas: mecanismos de ação e uso.** Embrapa Cerrados. Planaltina DF, 2008.
- MARRO, E.; GALI, C. J. **Isolation, Kinetic Characterization in Batch and Continuous Culture and Application for Bioaugmenting an Activated Sludge Microbial Community.** v. 41, p. 1521–1528, 2006.
- MCMURDIE, P.J., HOLMES, S. **phyloseq: a R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data.** *PLoS One* 8, 612-617, 2013.
- MIKOV, I.; VASOVIC, V. MIKOV A. et al. **Hypoglycemic effect of herbicide 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D).** *Pestic Phytomed*, v. 25, p. 349–52, 2010.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Monitoramento de agrotóxicos na água para consumo humano no Brasil.** *Boletim Epidemiológico*, Secretaria de Vigilância em Saúde, v.44, 2013.

- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica de solo**. 2ª ed. p.266-272, Ufla, Lavras (MG), 2006.
- MORETTO, J.A.S., ALTARUGIO, L.M., ANDRADE, P.A., FACHIN, A.L., ANDREOTE, F.D., STEHLING, E.G. **Changes in bacterial community after application of three different herbicides**. FEMS Microbiol. Lett, v.364, p. 1–6, 2017.
- MUNRO, I.C.; CARLO, G.L.; ORR, J.C. et al. **A comprehensive, integrated review and evaluation of the scientific evidence relating to the safety of the herbicide 2,4-D**. J. Am. Coll. Toxicol., v. 11, p. 559–664, 1992.
- NEWMAN, M.M., HOILETT, N., LORENZ, N., DICK, R.P., LILES, M.R., RAMSIER, C., KLOPPER, J.W. **Science of the Total Environment Glyphosate effects on soil rhizosphere-associated bacterial communities**. Sci. Total Environ, v.543, p. 155–160, 2016.
- NGUYEN, T. P. O. et al. **Intra- and Inter-Field Diversity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid-Degradative Plasmids and Their Tfd Catabolic Genes in Rice Fields of the Mekong Delta in Vietnam**. FEMS Microbiology Ecology, v. 95, p. 2018.
- NYKIEL-SZYMA, J.; STOLAREK, P. **Elimination and Detoxification of 2, 4-D by Umbelopsis Isabellina with the Involvement of Cytochrome P450**. Environ Sci Pollut Res p. 2738–2743, 2018.
- PAN-GERMANY. **Pesticide and health hazards: facts and figures**, 2012. Disponível em: <https://www.pangermany.org/download/Vergift_EN-201112-web.pdf>. Acesso em: 15 de julho de 2019.
- PAZMINO, D.M., ROMERO-PUERTAS, M.C., SANDALIO, L.M. **Insights into the toxicity mechanism of and cell response to the herbicide 2,4-D in plants**. Plant Signal. Beha, v. 7, p.425–427, 2012.
- PEIXOTO, R.S.; COUTINHO, H.L.C.; RUMJANEK, N.G.; MACRAE, A.; ROSADO, A.S. **Use rpo Band 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE**. Letters in Applied. Microbiology, v. 35, p.316-320, 2002.

PELIZZETTI, E., MAURINO, V., MINERO, C., CARLIN, V., PRAMAURO, E., ZERBINATI, O., TOSATO, M.L. **Photocatalytic Degradation of Atrazine and Other s-Triazine Herbicides**. Environmental Science Technology, v. 24, p.1559-1565, 1990.

PERUCCI, P., DUMONTET, S., BUFO, S.A., MAZZATURA, A., CASUCCI, C. **Effects of organic amendment and herbicide treatment on soil microbial biomass**. Biology and Fertility of Soils, 32: 17–23, 2000.

PIGNATI, W.A et al. Distribuição Espacial Do Uso de Agrotóxicos No Brasil : Uma Ferramenta Para a Vigilância Em Saúde Spatial Distribution of Pesticide Use in Brazil : A Strategy for Health Surveillance. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 10, p. 3281–3294, 2017.

PIRNAY, J. P. et al., **Pseudomonas aeruginosa biodiversity as reflected in a Belgian river**. Environmental Microbiology, v. 7, p. 969–980, 2005.

POKORNY, R. **Some chlorophenoxyacetic acids**. J. Amer. Chem. Soc., v.63, p.1768, 1941.

POLY, F.; MONROZIER, L.J.; BALLY, R. **Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil**. Research in Microbiology, v. 152, p 95-103, 2001.

PROSSER, R.S., ANDERSON, J.C., HANSON, M.L., SOLOMON, K.R., SIBLEY, P.K. Indirect effects of herbicides on biota in terrestrial edge-of-field habitats: A critical review of the literature. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, 232: 59–72, 2016.

PYLRO, V.S.; ROESCH, L.F.; ORTEGA, J.M. et al. **Brazilian microbiome project: reavelingthe unexplored microbial diversity-challenges and ´prospects**. Microb. Ecol., v. 2, p. 237-241, 2014.

RAAIJMAKERS, J.M et al. **The rhizosphere: a playground and battlefield for soil borne pathogens and beneficial microorganism**. Plant and Soil, v. 2, p. 341- 361, 2009.

REBECCHI, L., SABATINI, M. A.; CAPPI, C.; GRAZIOSO, P.; VICARI, A.; DINELLI, G.; BERTOLANI, R. **Effects of a sulfonylurea herbicide on soil microarthropods**. *Biology Fertilization Soils*, v.30, p.312–317, 2000.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 5. ed. Edição dos autores. Londrina, 2005.

ROESCH, L.F.W., FULTHORPE, R.R., RIVA, A., CASELLA, G., HADWIN, A.K.M., KENT, A.D., DAROUB, S.H., CAMARGO, F.A.O., FARMERIE, W.G., TRIPLETT, E.W. **Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity**. *The ISME Journal*, v.1, p.283–290, 2007.

ROJO, F. Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS: Microbiology Reviews*, v.34, p. 658–684, 2010.

ROMAN, E.S., VARGAS, L., RIZZARDI, M.A., HALL, L., BECKIE, H., WOLF, T.M. **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação**. Editado por Erivelton Scherer Roman, Leandro Vargas. Passo Fundo: Gráfica Editora Berthier, 2005.

SAKAI, Y. et al. **A 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Degradation Plasmid PM7012 Discloses Distribution of an Unclassified Megaplasmid Group across Bacterial Species**. *Microbiology (Reading, England)*, v. 160, n. Pt 3, p. 525–536, Mar. 2014.

SANDMANN, E. R.; LOOS, M.A. **Enumeration of 2,4-D-degrading microorganisms in soils and crop plant rhizospheres using indicator media: high populations associated with sugarcane (*Saccharum officinarum*)**. *Chemosphere*, v.13, p.1073–1084, 1984.

SCHMITZ, O. J. et al. **Conserving Biodiversity: Practical Guidance about Climate Change Adaptation Approaches in Support of Land-Use Planning**. *Natural Areas Journal*, v. 35, n. 1, p. 190–203, 2015. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.3375/043.035.0120>>.

SHADE, A. **Understanding Microbiome Stability in a Changing World**. *mSystems*, v. 3, n. 2, p. 1–4, 2018.

- SHAW, L.J.; BURNS, R.G. **Enhanced mineralization of [U-14C]2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soil from the rhizosphere of Trifolium pratense.** Applied and Environmental Microbiology, v. 70, n. 8, p. 4766–4774, 2004.
- SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S. *Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental.* Instituto Agrônomo Campinas, São Paulo, 2007.
- SIMONET, P.; GROSJEAN, M.C.; MISRA, A.K; NAZARET, S; COURNOYER, B.; NORMAND, P. **Frankia genus specific characterization by polymerase chain reaction.** Applied Environmental Microbiology, v.57, n.11, p.3278-3286, 1991.
- SMITH, A. M. et al. **Lymphoma : A Meta-Analysis Accounting for Exposure Levels.** Ann Epidemiol, v. 27, n. 4, p. 281–289, 2017.
- STEFFEN, G.P.K & Antonioli, Z.I. **Contaminação do Solo e da Água pelo Uso de Agrotóxico.** Tecnológica, v.15, p. 15-21, 2011.
- STIBAL, M.; BAEUM, J.; HOLBEN, W. E. **Microbial Degradation of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid on the Greenland Ice Sheet.** Journal ASM, v. 78, p. 5070-5076, 2012.
- STONE, M. M.; KAN, J.; PLANTE, A. F. **Parent Material and Vegetation Influence Bacterial Community Structure and Nitrogen Functional Genes along Deep Tropical Soil Profiles at the Luquillo Critical Zone Observatory.** Soil Biology and Biochemistry, v. 80, p. 273–282, 2015.
- STORCK, V et al. **Lab to Field Assessment of the Ecotoxicological Impact of Chlorpyrifos, Isoproturon, or Tebuconazole on the Diversity and Composition of the Soil Bacterial Community.** Frontiers in microbiology, v. 9, p. 1412, 2018.
- STREIT, W.R; SCHMITZ, R.A. **Metagenomics the key to the uncultured microbes.** Curr Opin Microbiol, v.7, n.5, p. 492-498, 2004.
- TONSO, N L; MATHESON, V.G.; HOLBEN, W. . **Polyphasic Characterization of a Suite of Bacterial Isolates Capable of Degrading 2,4-D.** Microbial ecology, v. 30, p. 3–24, 1995.

TU, C. M.; MARKS, C. F.; JOHNSON, P. W.; GAYED, S. K.; ELLIOT, M.J. **Effects of pesticides on soil enzymatic-activities, *Pratylenchus penetrans* populations, black root-rot, and growth of flue-cured tobacco.** Journal Environmental Science Health Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes, v.30, p.141–162, 1995

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA), **Environmental data and effects division's risk assessment for there registration eligibility document for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D),** 2004, disponível em: <http://www.regulations.gov>

VALLAEYS, T.; FULTHORPE, R.R.; WRIGHT, A.M.; SOULAS, G. **The metabolic pathway of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation involves different families of *tfdA* and *tfdB* genes according to PCR-RFLP analysis.** FEMS Microbiol. Ecol., v. 20, p. 163–172, 1996.

VAN ELSAS, J.D; CHIURAZZI, M.; MALLON, C.A; ELHOTTOVA, D; KRISTUFEK, V; SALLES, J.F. **Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen.** Proceedings of the National Academy of Science of United States of America, v. 109, n.4, p.1159-1164, 2012.

VIDAL, R. A.; MEROTTO, A. **Herbicidologia.** Porto Alegre - Rio Grande do Sul,

WAKELIN, S.T; COLLOF, M.J; HARVEY, P.R; MARCHNER, P; GREGG, A.L; ROGERS, S.L **The effects of stubble retention and nitrogen application on soil microbial community structure and functional gene abundance under irrigated maize.** FEMS microbiology ecology, Amsterdam, v.59, n.3, p.661-670, 2007.

WANG H, LI X, LI X *et al.* **Changes of microbial population and N- cycling function genes with depth in three Chinese paddy soils,** p. 1–16, 2017.

ZEHR JP, CRUMBLISS LL, CHURCH MJ *et al.* **Nitrogenase Genes in PCR and RT-PCR Reagents: Implications for Studies of Diversity of Functional Genes.** England, 2003.

ZEHR JP. **Nitrogen fixation by marine cyanobacteria.** *Trends Microbiol*, v.19, p.162–73, 2011.

ZHANG, T., M. BREITBART, W. H. LEE, J. Q. RUN, C. L. WEI, S. W. SOH, M. L. HIBBERD, E. T. LIU, F. ROHWER, and Y. RUAN. **RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses**. *PLoS Biol*, v. 4, p1-3, 2006.

ZHANG, Y. et al. **Analysis of bacterial communities in rhizosphere soil of healthy and diseased cotton (*Gossypium* sp.) at different plant growth stages**. *Plant Soil*, v.339, p. 447–455, 2017.