



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA  
MESTRADO EM FITOTECNIA

LAÍS TEREZA RÊGO TORQUATO REGINALDO

**SELEÇÃO DE ISOLADOS MICROBIANOS PARA DEGRADAÇÃO DE  
OXYFLUORFEN NO SOLO**

MOSSORÓ

2023

LAÍS TEREZA RÊGO TORQUATO REGINALDO

**SELEÇÃO DE ISOLADOS MICROBIANOS PARA DEGRADAÇÃO DE  
OXYFLUORFEN NO SOLO**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Fitotecnia do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Fitotecnia.

Linha de Pesquisa: Proteção de plantas

Orientador: Prof. Dr. Daniel Valadão Silva

Coorientadores: Prof. Dra. Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio

Prof. Dr. Paulo Sérgio  
Fernandes das Chagas

MOSSORÓ

2023

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

RL189 Reginaldo, Lais Tereza Rêgo Torquato.  
Seleção de isolados microbianos para degradação  
de oxyfluorfen no solo / Lais Tereza Rêgo Torquato  
Reginaldo. - 2023.  
63 f. : il.

Orientador: Daniel Valadão Silva.  
Coorientadora: Márcia Michelle de Queiroz  
Ambrósio.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal  
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em  
Fitotecnia, 2023.

1. Biodegradação. 2. Herbicida. 3. Bactérias.  
4. Contaminação . I. Silva, Daniel Valadão,  
orient. II. Ambrósio, Márcia Michelle de Queiroz,  
co-orient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade  
com AACR2 e os dados fornecidos pelo) autor(a).

Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência  
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva  
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

LAÍS TEREZA RÊGO TORQUATO REGINALDO

**SELEÇÃO DE ISOLADOS MICROBIANOS PARA DEGRADAÇÃO DE  
OXYFLUORFEN NO SOLO**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Fitotecnia do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Fitotecnia.

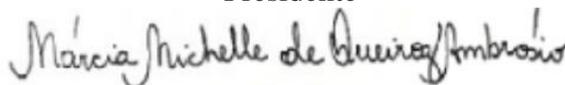
Linha de Pesquisa: Manejo de Plantas Daninhas

Defendida em: 28 / 07 / 2023.

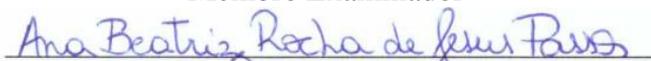
**BANCA EXAMINADORA**



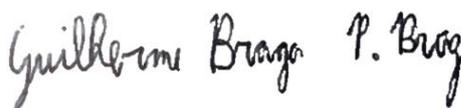
Prof. Dr. Daniel Valadão Silva (UFERSA)  
Presidente



Profa. Dra. Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio (UFERSA)  
Membro Examinador



Profa. Dra. Ana Beatriz Rocha de Jesus Passos (UFERSA)  
Membro Examinador



Prof. Dr. Guilherme Braga Pereira Braz (Cooperativa Comigo)  
Membro Examinador



Prof. Dr. José Barbosa dos Santos (UFVJM)  
Membro Examinador

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida.

Agradeço aos meus pais por tudo que fizeram e fazem por mim e por todas as excelentes oportunidades que me deram.

Agradeço ao meu noivo Matheus Freitas por nunca me deixar desistir e sempre me incentivar.

Agradeço a minhas irmãs por me incentivarem sempre!

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Valadão Silva, por todos os ensinamentos, oportunidades e amizade ao longo dessa trajetória.

Agradeço ao Prof. Dra. Márcia Michelle por todo o auxílio, disponibilidade e orientação.

Agradeço aos professores e pesquisador, Prof. Dr. Guilherme Braga Pereira Braz, Prof. Dr. José Barbosa dos Santos, Prof. Dra. Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio e Profa. Dra. Ana Beatriz Rocha de Jesus Passos por terem aceitado a fazer parte da minha banca examinadora.

Agradeço aos colegas do grupo NOMATO por sempre estarem dispostos a me ajudar durante a condução desse projeto – Cydianne, Kaline, Daniele, Luma, Lucrécia, Carol, Jesley, Mayara, Daniel. Especialmente a Cydianne que sempre me ajudou desde o início desse projeto. Gratidão por tudo.

Agradeço a UFERSA e ao Programa de Pós Graduação em Fitotecnia – PPGFITO pela oportunidade de realizar o mestrado.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Agradeço aos pesquisadores Paulo, Bruno, Bia, Taliane e Hamurabi, integrantes do Núcleo de Estudos em Matologia no Semiárido (NOMATO), por todas as contribuições prestadas a esta pesquisa.

Agradeço a equipe do laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da UFERSA por toda ajuda e disponibilidade, especialmente ao Jarlan Lucas pelo auxílio, disponibilidade e orientação!

Agradeço ao Instituto Goiano de Agricultura (IGA), ao Diretor Executivo, Dulcimar, e aos pesquisadores Robério, Antônio e Laís por me incentivarem e permitirem concluir o mestrado.

“A mente que se abre a uma nova ideia  
jamais voltará ao seu tamanho original”

Oliver Wendell Holmes Sr.

# SELEÇÃO DE ISOLADOS MICROBIANOS PARA DEGRADAÇÃO DE OXYFLUORFEN NO SOLO

## RESUMO

A extensão do residual de herbicidas no solo é fator importante para o controle de plantas daninhas em áreas agrícolas, uma vez que possibilita a redução na dinâmica de emergência destas espécies. Por outro lado, o longo período residual pode causar prejuízos em cultivos sucessivos com espécies sensíveis e aumentar o risco de contaminação ambiental. A biodegradação de herbicidas por microrganismos ocorre naturalmente nos solos e a seleção das espécies com melhor potencial pode ser uma estratégia promissora para reduzir os efeitos negativos do uso destes produtos com elevada persistência no ambiente edáfico. Os objetivos desse estudo foram: i) selecionar isolados microbianos obtidos de área agrícolas com histórico de aplicação de oxyfluorfen capazes de sobreviver em meio contendo esse herbicida; ii) avaliar a habilidade dos isolados sobreviventes para degradação do oxyfluorfen *in vitro*; iii) identificar possíveis marcadores bioquímicos para selecionar isolados microbianos com alta capacidade de degradação do oxyfluorfen; e iv) avaliar os melhores isolados obtidos no teste *in vitro* para a degradação do oxyfluorfen aplicado ao solo pelo processo de bioaugmentação. No total, 35 microrganismos do solo foram isolados de um solo com histórico de uso do oxyfluorfen, mas apenas 20 deles foram capazes de crescer na presença do herbicida. Dos 20 isolados, 65% foram identificados como *Bacillus*, Gram-positivos, com 50% formando endósporos. Os outros 35% foram caracterizados como *Coccus* e leveduras, sendo dois *Coccus* Gram-positivos e cinco leveduras. A análise de correspondência múltipla (MCA) aplicada aos resultados bioquímicos não conseguiu separar claramente os isolados com alta e baixa capacidade de degradação do herbicida. Os resultados mostraram que a presença de isolados microbianos aumentou significativamente a taxa de degradação do oxyfluorfen no solo, e que a fotodegradação também pode ter contribuído para a rápida dissipação do herbicida. Diferentes vias metabólicas entre os grupos de microrganismos podem explicar a diversidade funcional na degradação do herbicida. Os resultados permitem concluir que a identificação de isolados microbianos com alta eficiência de degradação, pertencentes a diferentes gêneros, pode ser útil em projetos de biorremediação para o herbicida oxyfluorfen.

**Palavras-chave:** Biodegradação; Herbicida; Bactérias; Contaminação

## ABSTRACT

The residual presence of herbicides in the soil is an important factor for controlling weeds in agricultural areas for an extended period. On the other hand, the residue can cause damage to successive crops with sensitive species and increase the risk of environmental contamination. The biodegradation of herbicides by microorganisms occurs naturally in soils, and the selection of species with better potential can be a promising strategy to reduce the negative effects of using these pesticides. The objectives of this study were: i) to select microbial isolates obtained from agricultural areas with a history of oxyfluorfen application capable of surviving in media containing this herbicide; ii) to evaluate the ability of the surviving isolates to degrade oxyfluorfen *in vitro*; iii) to identify possible biochemical markers to select microbial isolates with high oxyfluorfen degradation capacity; iv) to evaluate the best isolates obtained in the *in vitro* test for oxyfluorfen degradation when applied to the soil through bioaugmentation. In total, 35 soil microorganisms were isolated from soil with a history of oxyfluorfen use, but only 20 of them were able to grow in the presence of the herbicide. Out of the 20 isolates, 65% were identified as *Bacillus*, Gram-positive, with 50% of them forming endospores. The other 35% were characterized as *Coccus* and yeasts, with two Gram-positive *Coccus* and five yeasts. Multiple correspondence analysis (MCA) applied to the biochemical results failed to clearly separate isolates with high and low herbicide degradation capacity. The results showed that the presence of microbial isolates significantly increased the rate of oxyfluorfen degradation in the soil and that photodegradation may also have contributed to the rapid dissipation of the herbicide. Different metabolic pathways among the groups of microorganisms could explain the functional diversity in herbicide degradation. The results lead to the conclusion that identifying microbial isolates with high degradation efficiency, belonging to different genera, can be useful in oxyfluorfen bioremediation projects.

**Keywords:** Biodegradation; Herbicide; Bacterial; Contamination

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Constante de taxa de declínio (1/horas) do oxyfluorfen obtidos a partir do modelo de taxa única de primeira ordem para diferentes isolados bacterianos e o controle sem bactéria. .... 47
- Figura 2 – Meia-vida ( $t_{1/2}$ ) do oxyfluorfen estimada pela equação inversa do modelo de taxa única de primeira ordem em meios contendo isolados bacterianos e no controle ..... 48
- Figura 3 – Porcentagem de degradação do oxyfluorfen em relação a concentração inicial aplicada aos meios contendo isolados bacterianos e no controle após 196 horas. .... 49
- Figura 4 – Análise de correspondência múltipla entre os isolados para suas respostas aos testes bioquímicos e a capacidade de degradação do oxyfluorfen. Figura A, B e C representam o biplot entre as dimensões 1 e 2, 1 e 3 e 1 e 4 ..... 51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Caracterização morfológica e bioquímica dos isolados (+: reação positiva; -: reação negativa; O: metabolismo oxidativo; F: metabolismo fermentativo; A: metabolismo assacarolítico; VM: vermelho de metila; VP: Voges-Proskauer; Lis: lisina; Fen: fenilalanina; Arg: arginina; G: redução do nitrato à azoto).	44
Tabela 2	–	Isolados obtidos no estudo e seus respectivos gêneros	45
Tabela 3	–	Parâmetros do modelo de taxa única de primeira ordem obtidos a partir dos dados de degradação do oxyflourfen	46
Tabela 4	–	Teste Akaike para seleção de modelos parcimoniosos e melhor ajuste aos dados de degradação do oxyfluorfen para uma concentração inicial no solo de 100 e 200 mg kg <sup>-1</sup>	55
Tabela 5	–	Valores dos parâmetros obtidos para o modelo reduzido Weibull ajustados aos dados de degradação do oxyflourfen no solo para os tratamentos durante 40 dias de avaliação após a aplicação inicial de 100 e 200 mg kg <sup>-1</sup> do herbicida	56
Tabela 6	–	Análise de Variância entre os isolados para degradação do oxyfluorfen aos 40 dias após sua aplicação no solo em duas concentrações iniciais distintas	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Arg	Arginina
BOD	Biochemical Oxygen Demand
C0	Concentração inicial
DAD	Detector arranjo de diodo
Fen	Fenilalanina
ISO	Isolado
k	Constante da taxa de declínio (1/horas)
Lia	Lisina
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
NA	Nutriente Ágar
pH	Potencial hidrogeniônico
PAP	Pseudomonas Ágar
PPO	Pseudo Primeira Ordem
PPS	Pseudo Segunda Ordem
VP	Voges-Proskauer
VM	Vermelho de metila
UHPLC/EM	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência/ Espectrômetro de massas

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
dm <sup>3</sup>	Decímetro cúbico
g	Gramma
g. ha <sup>-1</sup>	Gramas por hectare
g. L <sup>-1</sup>	Gramma por litro
h	Horas
H	Hidrogênio
K	Potássio
Kd	Coefficiente de sorção
Kf	Constante de capacidade de adsorção de Freundlich
Kow	Coefficiente de partição octanol-água
µg L <sup>-1</sup>	Microgramma por litro
mg L <sup>-1</sup>	Miligramma por litro
µL	Microlitros
mL	Mililitro
pKa	Constante de dissociação ácido/base
ppm	Partes por milhão
®	Marca registrada
%	Porcentagem

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	44
REFERÊNCIAS .....	48
SELEÇÃO DE ISOLADOS MICROBIANOS PARA DEGRADAÇÃO DO OXYFLUORFEN NO SOLO .....	50
RESUMO .....	50
ABSTRACT .....	51
1. INTRODUÇÃO .....	52
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
2.1 Coleta de solo .....	54
2.2 Isolamento dos microrganismos do solo e seleção de microrganismos tolerantes ao Oxyfluorfen.....	54
2.3 Caracterização morfológica e bioquímica dos microrganismos tolerantes ao Oxyfluorfen.....	54
2.4 Reagentes .....	55
2.5 Capacidade de degradação do oxyfluorfen comercial <i>in vitro</i> .....	55
2.6 Capacidade de degradação do oxyfluorfen comercial no solo.....	55
2.7 Condições cromatográficas e de espectrometria de massa .....	57
2.8 Análise estatística.....	57
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	60
4. CONCLUSÕES .....	59
5. REFERÊNCIAS .....	60
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	65
ANEXOS .....	66

## INTRODUÇÃO GERAL

O uso de herbicidas para o controle químico de plantas daninhas é prática indispensável para a agricultura moderna, sendo a classe de agrotóxico mais consumida no mundo (FAOSTAT, 2022). A alta eficiência associada ao baixo custo e rapidez de controle tornou o uso de herbicidas para o controle de plantas daninhas uma ferramenta fundamental na agricultura para a manutenção da sanidade e produtividade das culturas, por outro lado, esses pesticidas tem causado preocupações ambientais nos sistemas agrícolas em todo o mundo (CLAPP, 2021).

A produção de culturas em larga escala é dependente do uso de herbicidas para o controle de plantas daninhas, fato este que contribui para que esses compostos sejam responsáveis por aproximadamente 60% dos pesticidas usados em todo o mundo (DAYAN, 2019). Um dos herbicidas mais eficazes e amplamente utilizado em todo mundo é o oxyfluorfen (SANTOS et al., 2016). No Brasil, o oxyfluorfen amplamente utilizado tendo registro para o uso nas culturas do café, soja, algodão, cebola, pinus, eucaliptos, citros, arroz irrigado e cana-de-açúcar (MAPA, 2023). Esse herbicida não possui registro para o uso na maioria das culturas olerícolas, mas vem sendo utilizado em pré-emergência das culturas.

O oxyfluorfen (2-chloro- $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-p-tolyl 3-ethoxy-4-nitrophenyl ether) é um herbicida do grupo químico difeniléter, de ação de contato, que possui amplo espectro de ação de controle sendo posicionado em pré-emergência e pós-emergência das plantas daninhas (PPDB, 2022). Esse herbicida atua inibindo a enzima protoporfirinogênio oxidase (PROTOX) na via de biossíntese do tetrapirrol antes de levar à síntese de heme e clorofila (MATRINGE et al., 1992). A inibição dessa enzima resulta no acúmulo de protoporfirinogênio IX, que vaza do plastídio para o citoplasma e é rapidamente oxidado pela protoporfirina IX (MATSUMOTO et al., 1993), ocasionando a morte da planta.

O oxyfluorfen apresenta baixa solubilidade em água (0,116 mg L<sup>-1</sup> em 20 °C) e baixa pressão de vapor (0,026 mPa a 25 °C), alto coeficiente de adsorção ao solo (log K<sub>oc</sub> = 3,46–4,13) e alto coeficiente de partição octanol-água (logK<sub>ow</sub> = 4,86) (PUBCHEM, 2023). Possui classificação como sendo um produto pouco tóxico a mamíferos e muito perigoso ao meio ambiente. O tempo de meia-vida do oxyfluorfen é de cerca de 37-172 dias e tem uma persistência considerada de média a muito alta (SONDHIA et al., 2009; EFSA, 2010). Com base nas propriedades físico-químicas do herbicida, o oxyfluorfen é muito bem adsorvido pela maioria dos solos, e a ligação atinge o pico em solos com alta porcentagem de matéria

orgânica e argila; assim, é considerado ligeiramente móvel a imóvel no solo (USEPA, 2002; EFSA, 2010).

Por ser fortemente absorvido por coloides orgânicos no solo, esse herbicida pode ser transportado com sedimentos e atingir corpos d'água, levando à contaminação de solos, águas superficiais, subterrâneas e vegetais (Ramírez-Morales et al., 2021; Calderon et al., 2016). Em corpos d'água, esse herbicida representa um grande problema ambiental, pois é muito tóxico para os organismos aquáticos (EFSA, 2010).

Em estudos com o oxyfluorfen, foi observado resíduos do produto até 140 dias após a aplicação, além disso, o efeito tóxico diminuiu quando foi acrescentado compostos orgânicos no substrato (SOUZA et al., 1996). Outro estudo realizado por Yen et al. (2003) teve como objetivo analisar a mobilidade e degradação do oxyfluorfen em diferentes solos, sob diferentes condições de umidade e temperatura, concluíram que o aumento da temperatura aumenta a taxa de degradação. Os mesmos autores analisaram que o herbicida não ultrapassou os 9 cm de profundidade e a maior parte do herbicida foi retida nos 0-3 cm. A temperatura teve grande importância, apresentando quase nenhuma degradação do herbicida à 10°C de temperatura de incubação, e apenas 23% do oxyfluorfen foi degradado à 25°C, mas cerca de 55% foi degradado em alta temperatura (40°C), em que todos os tratamentos estavam com solos à 60% da capacidade de campo, incubados por 13 semanas.

A utilização contínua deste produto químico tem gerado consequências ambientais significativas, afetando a segurança e a saúde (Zhang et al., 2018, Zhang et al., 2018). Diversos pesquisadores têm enfatizado que as águas superficiais e subterrâneas estão sendo contaminadas devido à dispersão e ao escoamento do herbicida (HARRISON et al., 2019; LUPI et al., 2019; TUDI et al., 2021). Além disso, foi observado que resíduos de oxyfluorfen podem se acumular nas plantações (SONDHIA, 2010). Portanto, a remoção adequada dos resíduos de oxyfluorfen é uma questão de extrema importância para o meio ambiente.

Diante desse cenário, a biorremediação tem surgido como uma estratégia promissora para mitigar os efeitos negativos da contaminação por herbicidas, incluindo o oxyfluorfen. Os microrganismos desempenham um papel crucial na biorremediação do oxyfluorfen, pois possuem a capacidade de degradar ou transformar os componentes tóxicos do herbicida em substâncias menos prejudiciais ou até mesmo inofensivas. Esses microrganismos podem utilizar o oxyfluorfen como fonte de carbono e energia, o que resulta em sua degradação e posterior remoção do ambiente contaminado.

A degradação biológica do oxyfluorfen apresenta vantagens significativas em relação a outros métodos de remediação, como a remoção física ou a degradação química. A biorremediação é uma abordagem mais sustentável, pois utiliza microrganismos naturalmente presentes no ambiente para eliminar o herbicida (PILEGGI et al., 2020). Além disso, a biorremediação pode ser realizada in situ, evitando a remoção do solo contaminado e reduzindo custos associados (DAVIN et al., 2018). Entre as estratégias para utilização de agentes biológicos para degradação de pesticidas, a bioaugmentação tem sido frequentemente pesquisada nos últimos anos. Essa técnica consiste na introdução controlada de microrganismos com alta capacidade de degradação do pesticida, acelerando o processo de remoção desses compostos do ambiente, reduzindo sua toxicidade e minimizando o risco de lixiviação e escoamento superficial capazes de contaminar lençóis freáticos, rios e mananciais (DAVIN et al., 2018; CASTREJÓN-GODÍNEZ et al., 2021). Apesar da técnica ser promissora para remoção de pesticidas no ambiente, a seleção dos microrganismos específicos e eficientes para degradação da molécula de interesse é uma etapa crucial para avanço da técnica. Uma vez selecionados, esses microrganismos podem ser avaliados em composições consorciadas a fim de elevar a eficiência na remoção do pesticida (KHANPOUR-ALIKELAYEH et al., 2021).

Além das bactérias, outros microrganismos, como fungos e leveduras, também têm sido investigados quanto à sua capacidade de degradar herbicidas (NISHIMURA et al., 2002; HU et al., 2020; CASTREJÓN-GODÍNEZ et al., 2021; CARLES et al., 2021). Esses microrganismos podem desempenhar um papel complementar na remediação de áreas contaminadas pelo herbicida. Além disso, fatores como temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes e presença de outras substâncias no ambiente podem influenciar a eficiência da degradação microbiana do herbicida (STARKE et al., 2019). Portanto, é importante otimizar as condições ambientais para proporcionar um ambiente propício ao crescimento e atividade dos microrganismos degradadores.

Diversos gêneros de bactérias foram identificados como tendo a capacidade de degradar o oxyfluorfen. Estudos têm comprovado que bactérias pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhodococcus*, entre outros, possuem enzimas com a habilidade de quebrar as moléculas do herbicida em compostos menos tóxicos (MOHAMED et al., 2011). Essas enzimas, como hidrolases e oxigenases, atuam em diferentes estágios do processo de degradação, transformando o oxyfluorfen em produtos mais simples e de menor persistência. O processo enzimático de degradação do oxyfluorfen pode ocorrer em fases distintas,

convertendo o herbicida em metabólitos intermediários e, por fim, em produtos finais não nocivos. Essa degradação pode ocorrer tanto em condições com presença de oxigênio (aeróbicas) como em condições sem oxigênio (anaeróbicas), dependendo da bactéria envolvida e das condições do ambiente.

Em um estudo realizado por Shang et al. (2022) mostraram que a bactéria identificada como *Bacillus* sp. YS-1 mostrou excelente capacidade de degradação de lactofen, herbicida do mesmo grupo químico que o oxyfluorfen. Os resultados mostraram que a cepa *Bacillus* sp. YS-1 alcançou uma taxa de degradação de 97,6% de 50 mg/L de lactofen em 15 h. Segundo Barroso (2020), utilizando a bactéria *Bradyrhizobium* 3901, o oxyfluorfen pode servir como fonte de carbono e nitrogênio para o BR 3901 e causar a degradação desse agrotóxico.

Compreender o potencial das bactérias na biorremediação do oxyfluorfen é fundamental para desenvolver estratégias eficientes de recuperação de áreas contaminadas e promover a sustentabilidade ambiental. Ao explorar o uso desses microrganismos como uma alternativa aos métodos convencionais de remediação, podemos avançar no sentido de minimizar os impactos negativos dos herbicidas na natureza e garantir um futuro mais saudável para nosso ecossistema.

## REFERÊNCIAS

CALDERON, Maria Jesus et al. Herbicide monitoring in soil, runoff waters and sediments in an olive orchard. **Science of the Total Environment**, v. 569, p. 416-422, 2016.

CARLES, Louis et al. Potential of preventive bioremediation to reduce environmental contamination by pesticides in an agricultural context: a case study with the herbicide 2, 4-D. **Journal of Hazardous Materials**, v. 416, p. 125740, 2021.

CASTREJÓN-GODÍNEZ, María Luisa et al. Glyphosate pollution treatment and microbial degradation alternatives, a review. **Microorganisms**, v. 9, n. 11, p. 2322, 2021.

CLAPP, Jennifer. Explaining growing glyphosate use: The political economy of herbicide-dependent agriculture. **Global Environmental Change**, v. 67, p. 102239, 2021.

DAVIN, Marie et al. Could saponins be used to enhance bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aged-contaminated soils?. **Chemosphere**, v. 194, p. 414-421, 2018.

DAYAN, Franck E. Current status and future prospects in herbicide discovery. **Plants**, v. 8, n. 9, p. 341, 2019.

DE SOUZA, A. P. et al. Efeito do oxyfluorfen, 2, 4-D e glyphosate na atividade microbiana de solos com diferentes texturas e conteúdos de matéria orgânica. **Planta Daninha**, v. 14, p. 55-64, 1996.

DOS SANTOS, Elisama Vieira et al. Removal of oxyfluorfen from ex-situ soil washing fluids using electrolysis with diamond anodes. **Journal of Environmental Management**, v. 171, p. 260-266, 2016.

**EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) et al.** Review of the existing maximum residue levels for oxyfluorfen according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. **EFSA Journal**, v. 18, n. 10, p. e06269, 2020. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/502.htm>. Acesso em: 8 de abril de 2023.

HU, Kaidi et al. Fungal bioremediation of diuron-contaminated waters: Evaluation of its degradation and the effect of amendable factors on its removal in a trickle-bed reactor under non-sterile conditions. **Science of the Total Environment**, v. 743, p. 140628, 2020.

MATRINGE, Michel et al. Localization within chloroplasts of protoporphyrinogen oxidase, the target enzyme for diphenylether-like herbicides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 7, p. 4646-4651, 1992

MATSUMOTO, Hiroshi; LEE, Jeung Joo; ISHIZUKA, Kozo. A rapid and strong inhibition of protoporphyrinogen oxidase from several plant species by oxyfluorfen. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 47, n. 2, p. 113-118, 1993.

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA.** **Cultura do algodão. 2023.** Disponível em [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 08 abril de 2023.

MOHAMED, Afrah T. et al. Degradation of oxyfluorfen herbicide by soil microorganisms biodegradation of herbicides. **Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 274-279, 2011.

**NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (2023)**. PubChem Compound Summary for CID 39327, Oxyfluorfen. Retrieved June 8, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oxyfluorfen>.

NISHIMURA, K. et al. Biodegradation of triazine herbicides on polyvinylalcohol gel plates by the soil yeast *Lipomyces starkeyi*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 58, p. 848-852, 2002..

PILEGGI, Marcos; PILEGGI, Sônia AV; SADOWSKY, Michael J. Herbicide bioremediation: from strains to bacterial communities. **Heliyon**, v. 6, n. 12, 2020.

**PPDB-PESTICIDE PROPERTIES DATABASE. A to Z Index**. University of Hertfordshire. Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/atoz.htm#F>. Acesso em: 29 mar. 2023.

RAMIREZ-MORALES, Didier et al. Pesticide occurrence and water quality assessment from an agriculturally influenced Latin-American tropical region. **Chemosphere**, v. 262, p. 127851, 2021.

SHANG, Na et al. Biodegradation of diphenyl ether herbicide lactofen by *Bacillus* sp. YS-1 and characterization of two initial degrading esterases. **Science of The Total Environment**, v. 806, p. 151357, 2022.

SONDHIA, Shobha. Persistence and bioaccumulation of oxyfluorfen residues in onion. **Environmental monitoring and assessment**, v. 162, n. 1-4, p. 163-168, 2010.

TUDI, Muyesaier et al. Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. **International journal of environmental research and public health**, v. 18, n. 3, p. 1112, 2021.

**USE, FAO Pesticides**. Pesticides Trade and Pesticides Indicators–Global, Regional and Country Trends, 1990–2020. FAOSTAT Analytical Briefs, v. 46, 2022.

YEN, Jui-Hung; SHEU, Wey-Shin; WANG, Yei-Shung. Dissipation of the herbicide oxyfluorfen in subtropical soils and its potential to contaminate groundwater. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 54, n. 2, p. 151-156, 2003.

ZHANG, Qinghua et al. Simultaneous efficient removal of oxyfluorfen with electricity generation in a microbial fuel cell and its microbial community analysis. **Bioresource technology**, v. 250, p. 658-665, 2018.

# SELEÇÃO DE ISOLADOS MICROBIANOS PARA DEGRADAÇÃO DO OXYFLUORFEN NO SOLO

## RESUMO

A agricultura brasileira é vital para a economia e segurança alimentar, porém o uso extensivo de herbicidas, como o oxyfluorfen, tem impactos ambientais negativos. A biodegradação de herbicidas por microrganismos pode ser uma estratégia promissora para minimizar esses efeitos. Os objetivos desse estudo foram: i) selecionar isolados microbianos obtidos de área agrícolas com histórico de aplicação de oxyfluorfen capazes de sobreviver em meio contendo esse herbicida; ii) Avaliar a habilidade dos isolados sobreviventes para degradação do oxyfluorfen *in vitro*; iii) Identificar possíveis marcadores bioquímicos para selecionar isolados microbianos com alta capacidade de degradação do oxyfluorfen; iv) Avaliar os melhores isolados obtidos no teste *in vitro* para a degradação do oxyfluorfen aplicado ao solo pelo processo de bioaugmentação. Foram isolados 35 microrganismos do solo, mas apenas 20 deles foram capazes de crescer na presença do herbicida. Esses isolados foram caracterizados morfolologicamente e bioquimicamente. Dos 20 isolados, 65% foram identificados como *Bacillus*, Gram-positivos, com 50% formando endósporos. Os outros 35% foram caracterizados como *Coccus* e leveduras, sendo dois *Coccus* Gram-positivos e cinco leveduras. A análise de correspondência múltipla (MCA) aplicada aos resultados bioquímicos não conseguiu separar claramente os isolados com alta e baixa capacidade de degradação do herbicida. O menor valor de beta obtido para os Isolados 14 e 4 sugerem que esses microrganismos, quando adicionados ao solo, podem acelerar a degradação do oxyfluorfen comparado aos demais isolados e ao controle. Os Isolados 14 e 4 foram capazes de degradar 40% da concentração inicial de oxyfluorfen aplicado ao solo em, respectivamente, 2,8 e 7,4 dias na condição de 100 mg kg<sup>-1</sup>, e 9,8 e 13,6 dias para 200 mg kg<sup>-1</sup>. Para o controle, a degradação próxima a 40% da concentração inicial de oxyfluorfen foi alcançada apenas aos 40 dias após a aplicação do herbicida. Os resultados permitem concluir que a identificação de isolados microbianos com alta eficiência de degradação, pertencentes a diferentes gêneros, pode ser útil em projetos de biorremediação para o herbicida oxyfluorfen. Entretanto, a capacidade de degradação não pôde ser atribuída a testes bioquímicos específicos.

**Palavras-chave:** Biodegradação; Herbicida; Bactérias; Contaminação

## ABSTRACT

Brazilian agriculture is crucial to the economy and food security; however, the extensive use of herbicides, such as oxyfluorfen, has negative environmental impacts. The biodegradation of herbicides by microorganisms can be a promising strategy to mitigate these effects. The objectives of this study were as follows: i) to select microbial isolates obtained from agricultural areas with a history of oxyfluorfen application capable of surviving in media containing this herbicide; ii) to evaluate the ability of the surviving isolates to degrade oxyfluorfen *in vitro*; iii) to identify possible biochemical markers to select microbial isolates with a high capacity for oxyfluorfen degradation; iv) to evaluate the best isolates obtained in the *in vitro* test for oxyfluorfen degradation when applied to the soil through bioaugmentation. A total of 35 soil microorganisms were isolated, but only 20 of them were able to grow in the presence of the herbicide. These isolates were morphologically and biochemically characterized. Out of the 20 isolates, 65% were identified as *Bacillus*, Gram-positive, with 50% of them forming endospores. The remaining 35% were characterized as *Coccus* and yeasts, including two Gram-positive *Coccus* and five yeasts. Multiple correspondence analysis (MCA) applied to the biochemical results failed to clearly separate isolates with high and low herbicide degradation capacity. The lower beta value obtained for Isolate 14 and Isolate 4 suggests that these microorganisms, when added to the soil, can accelerate the degradation of oxyfluorfen compared to the other isolates and the control. Isolate 14 and Isolate 4 were capable of degrading 40% of the initial concentration of oxyfluorfen applied to the soil in 2.8 and 7.4 days, respectively, under the condition of 100 mg kg<sup>-1</sup>, and 9.8 and 13.6 days for 200 mg kg<sup>-1</sup>. In contrast, for the control, degradation close to 40% of the initial concentration of oxyfluorfen was achieved only after 40 days following the herbicide application. The results lead to the conclusion that the identification of microbial isolates with high degradation efficiency, belonging to different genera, can be useful in oxyfluorfen bioremediation projects. However, the degradation capacity could not be attributed to specific biochemical tests.

**Keywords:** Biodegradation; Herbicide; Bacterial; Contamination

## 1. INTRODUÇÃO

A agricultura brasileira desempenha um papel fundamental na economia do país e na segurança alimentar, sendo um dos setores mais importantes para o desenvolvimento socioeconômico. O Brasil é reconhecido como um dos maiores produtores e exportadores de commodities agrícolas, como grãos (soja e milho), algodão, café, citrus, entre outros (FAO, 2022). Esse crescimento das lavouras brasileiras exige a utilização de grandes quantidades de pesticidas, principalmente os herbicidas. Por esse motivo, os herbicidas são os principais pesticidas consumidos no Brasil somando mais de 300 mil toneladas por ano (EMBRAPA, 2021)

O uso de herbicidas na agricultura brasileira é uma prática comum e essencial para o manejo eficiente de plantas daninhas, as quais competem com as culturas agrícolas por recursos, como nutrientes, água, espaço e luz solar. Os herbicidas desempenham um papel crucial no controle dessas plantas indesejadas, permitindo o estabelecimento e o desenvolvimento adequado das culturas. No entanto, a persistência dos herbicidas no ambiente causa impactos negativos na biodiversidade e na qualidade dos recursos hídricos e do solo (SHARMA et al., 2019; TUDI et al., 2021).

Um dos herbicidas amplamente utilizados no Brasil é o oxyfluorfen. O oxyfluorfen (2-chloro- $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-p-tolyl 3-ethoxy-4-nitrophenyl ether) é um herbicida do grupo dos difeniléteres, usado em aplicações em pré e pós emergência da cultura, apresenta atividade de contato e residual, atua inibindo a síntese de clorofila e compostos do heme nas células das plantas daninhas (PRITCHARD et al., 1980; PPDB, 2022). Esse herbicida é eficaz no controle de uma ampla gama de plantas daninhas, incluindo espécies de folhas largas e algumas gramíneas. A utilização do herbicida oxyfluorfen é particularmente importante na agricultura brasileira em culturas como algodão, citros, cana-de-açúcar, florestais, olerícolas e frutíferas (MAPA, 2023). No entanto, o oxyfluorfen dissolvido ou adsorvido no solo pode ser transportado de áreas agrícolas para ecossistemas aquáticos por meio do escoamento superficial de água (SONDHIA, 2009; CALDERON et al., 2016; TOPAZ et al., 2018). Os efeitos deste herbicida são conhecidos em algas, plantas e peixes (PEIXOTO et al., 2006; IBRAHIM et al., 2019).

Diante do impacto ocasionado pelo uso frequente do herbicida oxyfluorfen, estratégias devem ser adotadas para minimizar os efeitos poluentes no ambiente. A biodegradação de herbicidas tem se mostrado uma importante estratégia para mitigar os impactos ambientais causados por esses compostos (SINGH & SINGH, 2016). A biodegradação refere-se ao processo em que organismos vivos, como bactérias e fungos, metabolizam e transformam os

herbicidas em produtos menos tóxicos ou até mesmo em compostos inofensivos (ABATENH et al., 2017). A compreensão dos mecanismos e da eficiência da biodegradação de herbicidas é fundamental para o desenvolvimento de estratégias sustentáveis de manejo e controle de plantas daninhas. Além disso, a identificação e o estudo de microrganismos capazes de degradar esses compostos possibilitam a utilização de biotecnologias para promover a remediação de solos e águas contaminadas por resíduos de herbicidas.

A biodegradação do oxyfluorfen tem sido objeto de estudo de diversas pesquisas científicas, que buscam compreender os mecanismos envolvidos na degradação desse composto e identificar microrganismos capazes de degradá-lo de forma eficiente. Estudos mostram que a biodegradação do oxyfluorfen no solo foi atribuída a 10 espécies microbianas diferentes (*Bacillus* spp., *Pseudomonas* sp., *Arthrobacter* spp., *Aspergillus* sp., *Micobacterium* sp. e *Streptomyces* sp.), mas espécies de *Bacillus* têm a capacidade de degradar 80–95,6% em 21 dias e sua atividade aumentou em solo fertilizado com NPK (MOHAMED et al., 2011).

Em um estudo realizado por Zhao, mostrou que a bactéria identificada como *Chryseobacterium aquifrigidense* foi capaz de degradar e utilizar o oxyfluorfen como única fonte de carbono. Além disso, outros microrganismos, como fungos e leveduras, também têm sido investigados como potenciais degradadores de herbicidas (NISHIMURA et al., 2002; MAQBOOL et al., 2016). Assim, levantamos a hipótese que isolados microbianos obtidos a partir de solos expostos a frequentes aplicação de oxyfluorfen podem ser usados para degradação acelerada desse herbicida pelo processo de bioaugmentação. Os objetivos desse estudo foram: i) selecionar isolados microbianos obtidos de área agrícolas com histórico de aplicação de oxyfluorfen capazes de sobreviver em meio contendo esse herbicida; ii) Avaliar a habilidade dos isolados sobreviventes para degradação do oxyfluorfen *in vitro*; iii) Identificar possíveis marcadores bioquímicos para selecionar isolados microbianos com alta capacidade de degradação do oxyfluorfen; iv) Avaliar os melhores isolados obtidos no teste *in vitro* para a degradação do oxyfluorfen aplicado ao solo pelo processo de bioaugmentação.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta de solo**

O experimento foi conduzido no laboratório de Microbiologia e Fitopatologia e no laboratório de Manejo de Plantas Daninhas na Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), na cidade de Mossoró, RN. Os isolados microbianos foram obtidos a partir de uma amostra composta de solo, coletada em uma área produtora de olerícola da região com histórico de utilização recorrente do oxyfluorfen (latitude 4°87'24,98" Sul; longitude 37° 38' 16,29" Oeste). Foram coletadas dez amostras simples de uma profundidade de 0 – 10 cm, em seguida, as mesmas foram homogeneizadas e retirou-se uma amostra composta, na qual foram realizadas as análises.

### **2.2 Isolamento dos microrganismos do solo e seleção de microrganismos tolerantes ao Oxyfluorfen**

Inicialmente foi pesado 1 g da amostra de solo, que foi adicionado em tubo de ensaio contendo 9 mL de água destilada e esterilizada, homogeneizado em agitador tipo vórtex, e do sobrenadante transferiu-se 1 mL para um novo tubo realizando-se uma diluição seriada (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). Logo após os tubos ficaram por 12 min em banho maria em uma temperatura de  $\pm 80$  °C, foram transferidos uma alíquota de 100  $\mu$ L para placas de Petri contendo meio Nutriente Ágar (NA) sólido, e espalhados com alça de Drigalski. As placas foram mantidas em estufa incubadora do tipo BOD (Biochemical Oxygen Demand), a  $30 \pm 2$  °C, por 48 horas.

Após o crescimento das colônias bacterianas, as mesmas foram repicadas para as placas de Petri com NA suplementado com 200 ppm de oxyfluorfen comercial (Goal BR®) (BILLET et al., 2021), as placas foram mantidas em estufa incubadora do tipo BOD, a  $30 \pm 2$  °C, por 48 horas. Os isolados que apresentaram crescimento foram repicados para isolamento de culturas puras através da técnica de esgotamento de inóculo em superfície em meio NA e preservados pelo método de Castellani.

### **2.3 Caracterização morfológica e bioquímica dos microrganismos tolerantes ao Oxyfluorfen**

Os isolados microbianos foram caracterizados morfolologicamente e bioquimicamente, a fim de identificar de forma presuntiva o gênero. Os testes e provas bioquímicas utilizadas

nesse processo foram: morfologia das colônias, coloração pelo método de Gram, produção de endósporos, motilidade, teste da catalase, via metabólica da glicose O/F, fermentação da lactose, teste do VM, teste de VP, utilização do citrato como fonte única de carbono, descarboxilação da arginina, descarboxilação da ornitina, descarboxilação da lisina, desaminação da fenilalanina, hidrólise da gelatina, redução do nitrato, produção de indol, produção de sulfeto de hidrogênio, produção de pioverdina e produção de piocianina (BENSON, 2002; PROCOP et al., 2018).

As bactérias foram cultivadas, inicialmente, em meio NA, e mantidas em BOD a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , por 24 horas, de onde foram repicadas para os respectivos meios de cada teste. Para avaliação morfológica, as colônias isoladas foram observadas em microscópio estereoscópico (Carl Zeiss do Brasil) e avaliadas de acordo com suas características (tipo, coloração, elevação e borda) (BENSON, 2002).

## **2.4 Reagentes**

Os ensaios de degradação foram conduzidos usando o produto comercial Goal BR<sup>®</sup> (Dow AgroSciences), reagentes de grau analítico e HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência). O padrão de oxyfluorfen ( $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClF}_3\text{NO}_4$ , 98%) e o ácido fórmico ( $\text{HCOOH}$ , 50% em água) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda (Cotia, SP, Brasil). A acetonitrila ( $\text{CH}_3\text{CN}$ , 99,9%) adquirida da J. T. Baker<sup>®</sup> e a água ultrapura foi produzida por um equipamento de ultra purificação da Gehaka. Uma solução estoque de oxyfluorfen ( $2000 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi preparada em acetonitrila e armazenada em frasco âmbar a  $-18^\circ\text{C}$ , sendo utilizada na preparação das soluções de trabalho por diluições sucessivas.

## **2.5 Capacidade de degradação do oxyfluorfen comercial *in vitro***

As colônias de bactérias isoladas e identificadas anteriormente foram testadas quanto à capacidade de degradação do oxyfluorfen na formulação comercial Goal BR<sup>®</sup>. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado. Os tratamentos foram compostos pelos isolados selecionados na etapa descrita pela secção 2.2. Vinte isolados foram selecionados, totalizando 20 tratamentos e um controle sem a presença de isolados, com três repetições.

Frascos com 100 mL de meio mínimo líquido, suplementado com  $130 \text{ mg L}^{-1}$  i.a. da formulação comercial Goal BR<sup>®</sup>, foram inoculados com 0,1 mL de inóculo e incubados a  $30^\circ\text{C}$ , por 24h, 48h, 96h, 144h e 192h. Após o período de incubação, alíquotas de 10 mL

foram coletadas, em triplicata, acondicionadas em tubos Falcon. Para a extração do herbicida das amostras, foi adicionado ao todo 10 mL de acetonitrila, 100 µL de ácido acético e 1 mL de água destilada. Os tubos Falcon foram submetidos à agitação orbital (12 rpm) durante 15 min e 15 min em ultrassonicação. Logo após foi adicionado 1 g de NaCl e 2 g de MgSO<sub>4</sub>, e os tubos passaram por agitação em vórtex até homogeneização, e então submetidos a centrifugação. Posteriormente as amostras foram filtradas em membrana de 0,22 µm e armazenadas em vials de 1,5 mL.

## **2.6 Capacidade de degradação do oxyfluorfen comercial no solo**

Após a seleção dos isolados mais eficientes, eles foram testados quanto à capacidade de degradação do oxyfluorfen na formulação comercial Goal BR<sup>®</sup> aplicados ao solo. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, onde os isolados foram avaliados quanto a taxa de degradação e o tempo de degradação em relação às duas concentrações do herbicida. Foram utilizados cinco isolados, um mix contendo todos isolados e o controle sem a presença de isolados microbianos (ISO 04; ISO 14; ISO 26; ISO 28; ISO 31; 5 ISOs). Duas concentrações do herbicida foram aplicadas inicialmente no solo, 100 e 200 g i.a. kg<sup>-1</sup>. A degradação do oxyfluorfen foi avaliada em diferentes períodos após a aplicação do herbicida: 3, 5, 10, 15, 20, 30 e 40 dias,. Os isolados foram cultivados em caldo nutriente (450 mL água; 5,0 g NaCl; 1,5 g extrato de carne; 1,5 g extrato de levedura; 5,0 g peptona) por 48 horas até a densidade óptica (DO) de 600 nm.

Vasos com a capacidade de 0,5 dm<sup>3</sup> foram revestidos com saco plástico e preenchidos com 300 g de solo autoclavado. Posteriormente, realizou-se a aplicação do oxyfluorfen, em todos vasos, utilizando pipeta eletrônica, correspondendo a um volume de calda de 20 mL, nas respectivas doses de 100 e 200 g kg<sup>-1</sup>. Após 8 h foi adicionado em cada vaso contendo o solo uma alíquota de 9 mL dos isolados. O solo era irrigado conforme a necessidade.

As amostras de solo foram coletadas correspondendo respectivamente ao tempo de degradação (3 dias, 5 dias, 10 dias, 15 dias, 20 dias, 30 dias e 40 dias). Para quantificação do herbicida nas amostras do solo, foi pesado 5 g de solo, previamente homogeneizados, em tubos Falcons e foi adicionado uma mistura extratora, composta de 10 mL de acetonitrila e 2 mL de água destilada. Os tubos Falcon foram submetidos à agitação orbital (12 rpm) durante 15 min e 15 min em ultrassonicação. Logo após foi adicionado 1 g de NaCl e 2 g de MgSO<sub>4</sub>, e os tubos passaram por agitação em vórtex até homogeneização, e então submetidos a

centrifugação. Posteriormente as amostras foram filtradas em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  e armazenadas em vials de 1,5 mL.

## 2.7 Condições cromatográficas

O oxyfluorxen foi quantificado por um cromatógrafo líquido de ultra performance (UHPLC) da Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão. O UHPLC está equipado com uma coluna Restek (Pinnacle DB AQ C18 tamanho 50 x 2,1 mm, com partículas de 1,9  $\mu\text{m}$ ), duas bombas LC - 30AD, um desgaseificador DGU - 20A5R, um amostrador automático Sil - 30AC, um forno de coluna CTO - 30AC, um detector DAD (Nexera modelo X2 SPD-M30A) e um controlador CBM -20A. As condições cromatográficas otimizadas para obter a melhor resolução durante a análise foram fase móvel com eluição isocrática, contendo 70% da fase móvel B (Acetonitrila) e 30% da fase móvel A (água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico) com fluxo de 0,20 mL  $\text{min}^{-1}$ . O volume de injeção foi de 5  $\mu\text{L}$ , comprimento de onda máximo de 234 nm e as temperaturas do amostrador e do forno da coluna de 15 e 40  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente.

A identificação do oxyfluorfen foi feita comparando o tempo de retenção do herbicida, investigando as varreduras tridimensionais dos arranjos de diodos (variando o comprimento de onda de 190 a 700 nm) para os máximos de comprimento de onda. A linearidade foi avaliada a partir de dez níveis de calibração com concentrações variando de 0,5 a 150  $\text{mg L}^{-1}$  do oxyfluorfen, preparados por diluições sucessivas da solução estoque.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados baseados nos parâmetros da curva de calibração, sendo o LD e LQ 3 e 10 vezes, respectivamente, o valor da relação do desvio padrão do coeficiente linear da regressão com o coeficiente angular da curva analítica. A repetibilidade do método trabalhado foi demonstrada por meio do desvio padrão relativo (RSD), calculado para seis medições consecutivas em três níveis de concentração (1,50 e 150  $\text{mg L}^{-1}$ ) de soluções contendo o padrão de oxyfluorfen.

## 2.8 Análise estatística

Os dados obtidos para análise de degradação *in vitro* foram submetidos à análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) e à análise de homogeneidade da variância pelo teste de Levene (LEVENE, 1960) à 5% de probabilidade. Os dados de degradação do oxyfluorfen no solo nos diferentes tratamentos foram ajustados considerando três modelos de cinética de degradação: o modelo de pseudo-primeira ordem, o

modelo de pseudo-segunda ordem e o modelo Weibull. Atendendo as pressuposições, o modelo de pseudo-primeira ordem foi ajustado aos dados de degradação. A constante da taxa de degradação (k) do modelo de pseudo-primeira ordem foi comparado pelo intervalo de confiança obtido para cada modelo de cada isolado calculados pela Equação (1). A meia-vida do herbicida foi estimada pela equação inversa do modelo, conforme mostrado na Equação (2). A porcentagem de degradação máxima após 196 horas para cada isolado também foi calculada comparado ao tratamento controle (sem isolados). O tempo de meia-vida e a porcentagem máxima de degradação após 192 horas obtidos para cada repetição foram submetidas a ANOVA pelo teste F (p-valor<0,05). Quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott (p-valor<0,05). Os resultados do teste bioquímico obtido para cada isolado foram analisados pela Análise de Correspondência Múltipla para verificar a existência de correlações entre esses testes e a capacidade de degradação dos isolados.

$$\text{Equação 1: } C_t = C_0 * e^{-k*t}$$

Onde  $C_t$  representa a concentração no tempo  $t$ ,  $C_0$  representa a concentração inicial do herbicida,  $K$  representa a constante de taxa de declínio 1/horas e  $t$  o tempo.

$$\text{Equação 2: } t_{\left(\frac{1}{2}\right)} = \ln(2)/k$$

Onde,  $t(1/2)$  representa o tempo de meia-vida do herbicida e  $k$  representa a constante de taxa de declínio 1/horas.

Os dados obtidos para o ensaio em solo foram submetidos à análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) e à análise de homogeneidade da variância pelo teste de Levene (LEVENE, 1960) à 5% de probabilidade. Atendendo as pressuposições, o modelo de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem e Weibull foram ajustados aos dados. Os modelos foram comparados quanto ao seu ajuste aos dados, considerando os parâmetros de Raiz Quadrada do Erro Médio (sigla em inglês RMSE) e pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ). O modelo de melhor ajuste para os dados foi usado para comparar as diferenças entre os isolados, bem como o tratamento controle. Além disso, uma análise para modelos aninhados considerando o modelo completo (variação para todos os parâmetros do modelo para cada tratamento) e modelos reduzido (parâmetros fixos do modelo para todos tratamentos) foi realizada através da razão de variância ou teste F, realizado utilizando a

Equação (1) (Lindquist et al., 1996). Este procedimento estatístico avalia a diferença das somas dos quadrados dos resíduos (RSS) de modelos aninhados. O teste F é calculado da seguinte forma (Equação 3):

$$\text{Equação 3: } F = (\text{RSS}_{\text{Reduzido}} - \text{RSS}_{\text{Completo}}) / (\text{d.f. Reduzido} - \text{d.f. Completo}) / (\text{RSS}_{\text{Completo}} / \text{d.f. Completo}) \quad (1)$$

onde  $\text{RSS}_{\text{Reduzido}}$  e  $\text{RSS}_{\text{Completo}}$  representam as somas dos quadrados dos resíduos minimizados dos parâmetros estimados para o modelo completo (passo 1) e o modelo reduzido (passo 2, 3 ou 4; passos 1 a 4 são descritos a seguir), respectivamente;  $\text{d.f. Reduzido}$  e  $\text{d.f. Completo}$  representam os graus de liberdade dos modelos completo e reduzido, respectivamente. Em termos práticos, quando o valor de P do teste F é maior que 0.05, não rejeitamos a hipótese nula e um modelo reduzido deve ser usado (sem diferença entre os valores dos parâmetros entre os isolados e controle). No entanto, se P do teste F for menor que 0.05, rejeitamos a hipótese nula e o modelo completo deve ser utilizado (valores diferentes dos parâmetros para cada isolado e controle). O princípio do teste F para análise de regressão não linear foi calculado para cada modelo usando o comando `nls ANOVA` no software R (RITZ; STREIBIG, 2008).

O critério AICc (AIC corrigido para tamanho finito de amostra), indicado para seleção de modelos não aninhados (SUGIURA, 1978; HURVICH; TSAI, 1991), também foi calculado para seleção do melhor modelo utilizando a Equação (4):

$$\text{Equação 4: } \text{AICc} = -2 * \log(l) + 2K * (n / (n - K - 1)) \quad (2)$$

onde  $l$  é a função de verossimilhança,  $K$  é o número de parâmetros estimados no modelo e  $n$  é o tamanho da amostra do modelo. De acordo com o critério AICc, o melhor modelo é aquele que possui o menor valor de AICc. Os valores de AICc para cada modelo foram estimados utilizando o comando `AICc` do pacote `AICcmodavg` no software R.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1. Isolamento e caracterização dos isolados microbianos tolerantes ao oxyfluorfen**

Inicialmente foram isolados do solo 35 microrganismos. Após a seleção no meio NA suplementado com oxyfluorfen, apenas 20 isolados foram capazes de crescer na presença da formulação comercial. As colônias isoladas, eram morfológicamente diferentes, apresentando características distintas como coloração, formato da borda, presença de brilho, halo e rugosidade.

Os resultados dos testes morfológicos e bioquímicos aplicados aos isolados obtidos são mostrados na Tabela 1. Quanto à morfologia das células, treze isolados (65%) foram caracterizados como bacilos móveis, Gram-positivos, sendo dez isolados (50%) formadores de endósporo, predominando a morfologia bacilar. Os outros sete isolados (35%) foram caracterizados como cocos e leveduras, sendo dois isolados cocos, Gram-positivos, sem produção de endósporo e cinco isolados foram caracterizados como leveduras. Apenas um isolado apresentou ser bacilo, Gram-negativo e sem a presença do endósporo.

Para a caracterização das leveduras foi levado em consideração a morfologia da colônia, que embora sejam morfológicamente semelhantes aos das bactérias existem diferenças, uma vez que as células de leveduras são diferenciadas das de bactérias pela forma, presença de brotamento e tamanho.

**Tabela 1.** Caracterização morfológica e bioquímica dos isolados (+: reação positiva; -: reação negativa; O: metabolismo oxidativo; F: metabolismo fermentativo; A: metabolismo assacarolítico; VM: vermelho de metila; VP: Voges-Proskauer; Lia: lisina; Fen: fenilalanina; Arg: arginina; G: redução do nitrato à azoto).

Código	Gram	Formato	Endósporo	Motilidade	Catalase	O/F/A	Citrato	Lactose	VM	VP	Indol	Sulfeto	LIA	Omitina	PAP	Fen.	Arg.	Urease	Nitrato	Gelatinase
ISO 1	+	Bacilo	+	+	+	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	G	-
ISO 2	+	Bacilo	-	+	+	A	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	G	+
ISO 4	+	Bacilo	+	+	+	O	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	G	-
ISO 8	+	Bacilo	+	-	+	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	G	-
ISO 9	+	Bacilo	-	-	+	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	G	-
ISO 11	+	Bacilo	+	+	+	A	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
ISO 12	+	Bacilo	+	-	+	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	G	-
ISO 14	+	Bacilo	+	+	+	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
ISO 15	+	Bacilo	+	+	+	A	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
ISO 16	+	Bacilo	+	+	+	O	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	G	-
ISO 18	L	Levedura	-	+	+	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
ISO 22	-	Bacilo	-	+	+	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	G	-
ISO 25	+	Cocos	-	-	*	A	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	*
ISO 26	L	Levedura	-	+	-	A	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	G	-
ISO 28	+	Cocos	-	+	+	A	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
ISO 31	+	Bacilo	+	+	+	O	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	G	-
ISO 32	+	Bacilo	+	+	+	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
ISO 33	L	Levedura	-	-	+	A	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	G	+
ISO 34	L	Levedura	-	-	+	O	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	G	-
ISO 35	L	Levedura	-	-	+	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	G	-

Cerca de 60% dos microrganismos isolados apresentaram metabolismo assacarolítico e 40% dos isolados apresentaram metabolismo oxidativo, nenhum isolado apresentou metabolismo fermentativo. Em relação aos testes de reação enzimática, a maioria dos isolados demonstraram reação positiva para urease (65%) e catalase (90%) comparado a reação negativa para essa enzima. Para a gelatinase, a maioria dos isolados reagiram negativamente para essa enzima (65%) em relação à reação positiva.

No teste do citrato levando em consideração as bactérias apenas dois isolados apresentaram resposta positiva para o teste. Todos os isolados foram capazes de descarboxilar a arginina. No teste do nitrato apenas nos isolados 11, 15, 28 e 32 reduziram nitrato a nitrito. Os isolados 14, 18 e 25 apresentaram resposta negativa e os demais isolados reduziram o nitrato a nitrito, e em seguida a gás nitrogênio.

No teste de avaliação da capacidade de fermentação da lactose, apenas os isolados 2, 26, 33 e 34 apresentaram resultados positivos. O teste de VP, apenas 5 isolados apresentaram resultados positivos. Apenas o isolado 25 foi capaz de descarboxilação da lisina. Já para o teste de descarboxilação da fenilalanina apenas o isolado 22 apresentou descarboxilação

Todas as bactérias apresentaram respostas negativa para o teste da produção de piovertina e piocianina, excluindo a possibilidade de algum isolado ser do gênero *Pseudomonas* sp. Os resultados de todos os isolados para o teste de VM, produção de indol, sulfeto de hidrogênio, ornitina foram negativos. Foram observados os mesmos resultados, em estudos que realizaram esses testes na caracterização de *Bacillus* e *Micrococcus* (SHARMA et al., 2010; MOHAMED et al., 2011; ABEDINZADEH; ETESAMI; ALIKHANI, 2019; CHENG et al., 2019; AL-DHABAAN, 2019, WANG et al., 2021; GUZMÁN-MORENO et al., 2022). Baseado na caracterização bioquímica e morfológica, os isolados obtidos no referido estudo foram classificados como pertencentes ao gênero *Bacillus*, e leveduras, *Shingomonas* sp., *Shingobacterium* sp. e *Micrococcus* sp. (Tabela 2).

**Tabela 2.** Isolados obtidos no estudo e seus respectivos gêneros

Isolado	Classificação taxonômica	Isolado	Classificação Taxonômica
ISO 1	<i>Bacillus</i> sp.	ISO 18	Levedura
ISO 2	<i>Bacillus</i> sp.	ISO 22	<i>Shingomonas</i> sp./ <i>Shingobacterium</i> sp.
ISO 4	<i>Bacillus</i> sp.	ISO 25	*
ISO 8	<i>Bacillus</i> sp.	ISO 26	Levedura
ISO 9	<i>Bacillus</i> sp.	ISO 28	<i>Micrococcus</i> sp.
ISO 11	<i>Bacillus</i> sp.	ISO 31	*
ISO 12	<i>Bacillus</i> sp.	ISO 32	*
ISO 14	<i>Bacillus</i> sp.	ISO 33	Levedura
ISO 15	<i>Bacillus</i> sp.	ISO 34	Levedura
ISO 16	<i>Bacillus</i> sp.	ISO 35	Levedura.

\* Isolado não identificado

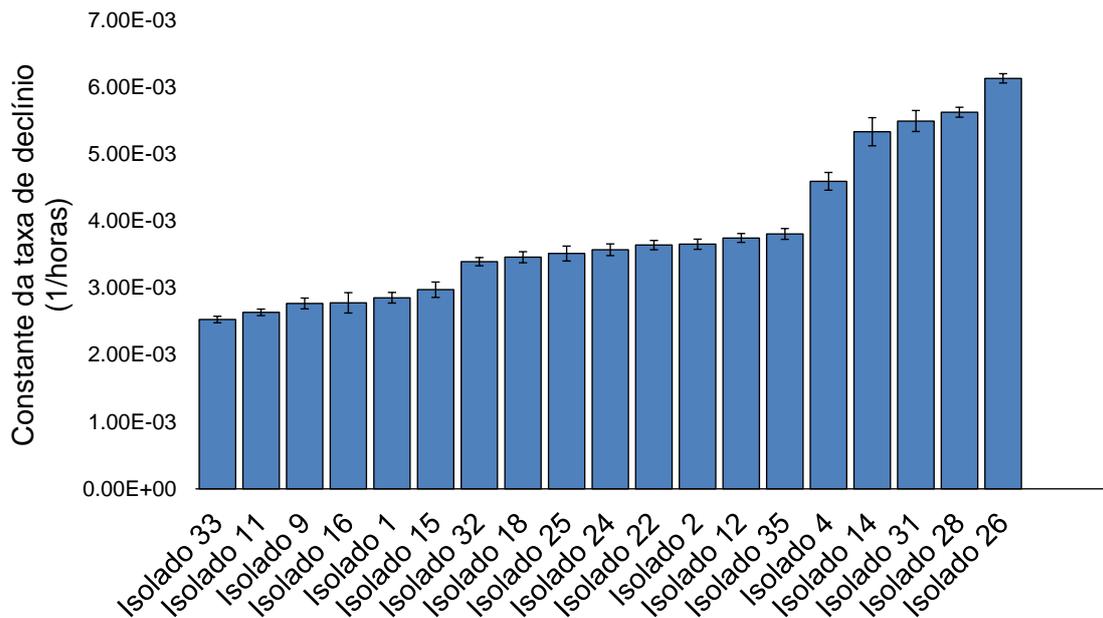
### 3.2. Capacidade de degradação dos isolados microbianos para o oxyfluorfen *in vitro*

O tratamento de controle apresentou uma taxa de degradação do herbicida oxyfluorfen de  $1.10E-03$ . O valor do parâmetro  $C_0$  foi de 126.1. Esse tratamento demonstrou alta significância estatística para os parâmetros do modelo de degradação, com um p-valor muito baixo ( $2.50E-07$ ) para "k" e um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0.97 (Tabela 3, Figura 1), sugerindo que os dados ajustaram ao modelo de pseudo-primeira ordem. O  $C_0$  também variou entre os diferentes tratamentos isolados. Os valores de " $C_0$ " foram distribuídos em um intervalo de aproximadamente 118.6 a 136.3. A taxa média de degradação do herbicida oxyfluorfen ("k") também variou consideravelmente entre os isolados. Os valores de "k" foram distribuídos em um intervalo de aproximadamente  $2.40E-03$  a  $6.10E-03$  (Tabela 3, Figura 1), indicando que para alguns isolados, a taxa de degradação pode ser 3 vezes superior a outros isolados. Independentemente do isolado, todos promoveram um valor de k superior ao tratamento controle.

**Tabela 03.** Parâmetros do modelo pseudo-primeira ordem obtidos a partir dos dados de degradação do oxyfluorfen.

Tratamentos	Parâmetros	Estimativa	Erro padrão	t	p-valor	P > t	R <sup>2</sup>
Controle	C0	126.1	1.62	78.04	2.0E-16	***	0.97
	k	1.10E-03	0	8.49	2.5E-07	***	
Isolado 1	C0	128.9	1.41	91.33	2.0E-16	***	0.98
	k	2.90E-03	0	22.24	1.8E-13	***	
Isolado 2	C0	130.4	2.23	58.37	2.0E-16	***	0.99
	k	3.70E-03	0	16.95	1.2E-11	***	
Isolado 4	C0	134	4	33.52	2.9E-16	***	0.98
	k	4.60E-03	0	11.24	5.2E-09	***	
Isolado 8	C0	126.2	2.36	53.39	2.0E-16	***	0.99
	k	2.40E-03	0	11.26	5.1E-09	***	
Isolado 9	C0	118.6	3.12	38.07	2.0E-16	***	0.98
	k	2.80E-03	0	9.06	1.0E-07	***	
Isolado 11	C0	124.4	1.79	69.3	2.0E-16	***	0.99
	k	2.60E-03	0	15.88	3.2E-11	***	
Isolado 12	C0	126.1	2.23	56.59	2.0E-16	***	0.98
	k	3.70E-03	0	16.71	1.4E-11	***	
Isolado 14	C0	134.4	2.73	49.16	2.0E-16	***	0.99
	k	5.30E-03	0	17.91	5.2E-12	***	
Isolado 15	C0	124.2	2.46	50.43	2.0E-16	***	0.99
	k	3.00E-03	0	12.66	9.4E-10	***	
Isolado 16	C0	126	2.05	61.4	2.0E-16	***	0.98
	k	2.80E-03	0	14.65	1.1E-10	***	
Isolado 18	C0	125.7	2.04	61.73	2.0E-16	***	0.96
	k	3.50E-03	0	17.27	9.1E-12	***	
Isolado 22	C0	130	1.81	71.72	2.0E-16	***	0.97
	k	3.60E-03	0	20.78	5.3E-13	***	
Isolado 25	C0	125.4	2.17	57.81	2.0E-16	***	0.96
	k	3.50E-03	0	16.35	2.1E-11	***	
Isolado 26	C0	132.2	2.99	44.22	2.0E-16	***	0.98
	k	6.10E-03	0	17.22	9.5E-12	***	
Isolado 28	C0	136.3	5.13	26.57	1.2E-14	***	0.99
	k	5.60E-03	0	9.94	2.9E-08	***	
Isolado 31	C0	133.4	3.74	35.65	2.0E-16	***	0.99
	k	5.50E-03	0	13.18	5.2E-10	***	
Isolado 32	C0	124.6	2.01	61.92	2.0E-16	***	0.99
	k	3.40E-03	0	17.1	1.1E-11	***	
Isolado 33	C0	125.2	2.05	61.02	2.0E-16	***	0.99
	k	2.50E-03	0	13.54	3.5E-10	**	
Isolado 34	C0	128.7	2.2	58.52	2.0E-16	***	0.99
	k	3.60E-03	0	16.74	1.5E-11	***	
Isolado 35	C0	126.4	2.62	48.17	2.0E-16	***	0.97
	k	3.80E-03	0	14.38	1.4E-10	***	

C0 = Concentração inicial. k = constante de taxa de declínio (1/horas).



Barras indicam o intervalo de confiança a 95% de significância.

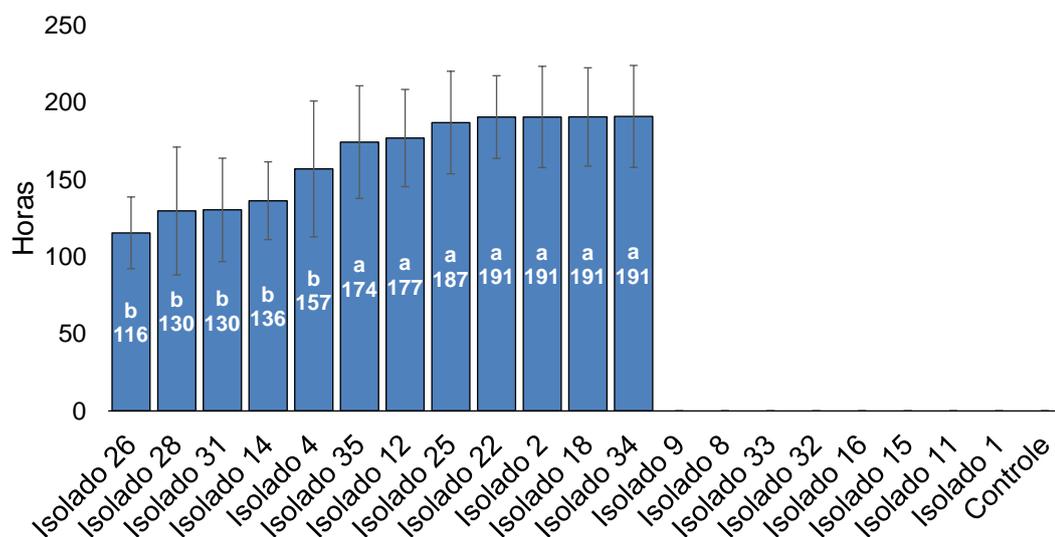
**Figura 1.** Constante de taxa de declínio (1/horas) do oxyfluorfen obtidos a partir do modelo de taxa única de primeira ordem para diferentes isolados bacterianos e o controle sem bactéria.

Em geral, os valores estimados de 'k' foram maiores nos tratamentos com isolados microbianos, indicando uma maior taxa de degradação do herbicida sob a influência desses microrganismos. Em contraste, o tratamento de controle apresentou uma taxa de degradação mais lenta. Os valores de R<sup>2</sup>, que indicam a qualidade do ajuste do modelo aos dados experimentais, foram altos em todos os tratamentos, variando entre 0.96 e 0.99. Isso sugere que o modelo de degradação de pseudo-primeira ordem foi uma boa representação da cinética de degradação do oxyfluorfen em todas as condições experimentais.

Além disso, os resultados dos testes de significância (t) e seus p-valores foram todos altamente significativos (p < 0.001), o que indica que as diferenças nas taxas de degradação entre os tratamentos são significativas. A presença de isolados microbianos aumentou significativamente a taxa de degradação do herbicida oxyfluorfen, sugerindo que esses microrganismos desempenham um papel fundamental na degradação desse composto no ambiente.

Os tempos de meia-vida para o oxyfluorfen na presença e ausência de isolados microbianos são mostrados na Figura 2. Alguns tratamentos não conseguiram atingir a meia-vida do oxyfluorfen dentro do período de 192 horas estipulado para o estudo. Esses tratamentos incluem os Isolados 1, 8, 9, 11, 15, 16, 32 e 33, bem como o grupo de controle.

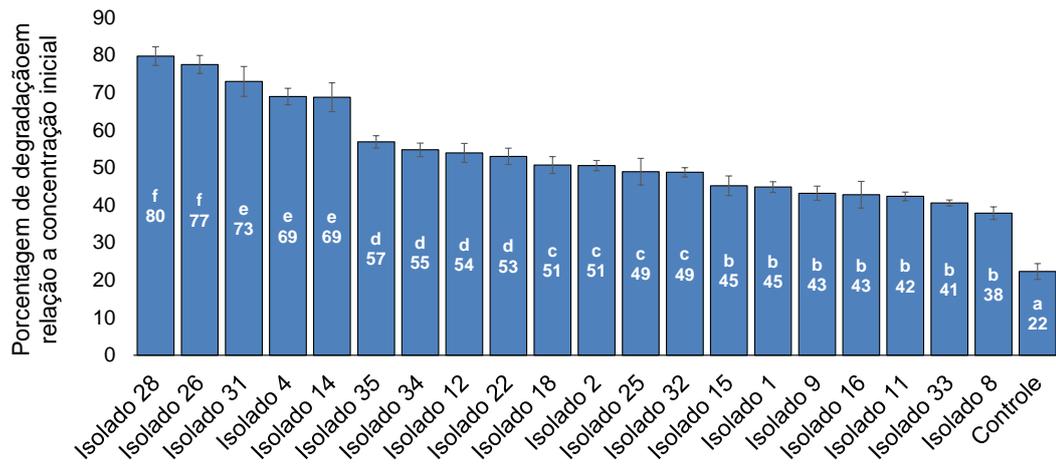
Os tratamentos com os isolados, 14, 26, 28 e 31 resultaram em tempos de meia-vida do oxyfluorfen iguais e mais curtos (entre 116 e 157 horas) comparado aos demais isolados avaliados. Os isolados 2, 12, 18, 22, 25 e 34 também alcançaram tempos de meia-vida para o oxyfluorfen menores que 192 horas, variando entre 174 a 191 horas, porém, sem diferença estatística entre eles.



Barras indicam o erro padrão das médias. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre as médias pelo teste Scott-knott (p-valor<0,05). \* Valores faltantes indicam que a meia-vida não foi alcançada

**Figura 2.** Meia-vida ( $t_{1/2}$ ) do oxyfluorfen estimada pela equação inversa do modelo de taxa única de primeira ordem em meios contendo isolados bacterianos e no controle.

Os resultados para porcentagem de degradação do oxyfluorfen após 192 horas (Figura 3) mostraram uma correlação com o tempo de meia-vida e taxa de degradação entre os isolados e o controle. Os tratamentos com os isolados 4, 14, 26, 28 e 31 alcançaram maior porcentagem de degradação do oxyfluorfen em relação à concentração inicial após 192 horas. Esses tratamentos também apresentaram tempos de meia-vida mais curtos, variando de 116 a 157 horas, e maiores taxas de degradação. Por outro lado, os tratamentos com os isolados 35, 2, 12, 18, 22, 25 e 34 apresentaram uma porcentagem de degradação menor e tempos de meia-vida mais longos comparados os isolados 4, 14, 26, 28 e 31. Os tratamentos que não alcançaram a meia-vida do oxyfluorfen mostraram menor porcentagem de degradação do herbicida após 192 horas, com valores variando entre 38 a 45, sem diferenças estatísticas entre si. O tratamento controle mostrou menor degradação do oxyfluorfen após 192 horas, com máxima degradação igual a 22% em relação a concentração inicial.



Barras indicam o erro padrão das médias. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre as médias pelo teste Scott-knott ao p-valor < 0,05.

**Figura 3.** Porcentagem de degradação do oxyfluorfen em relação a concentração inicial aplicada aos meios contendo isolados bacterianos e no controle após 196 horas.

Os isolados com maior taxa de degradação e porcentagem de herbicida degradado após 192 horas não pertenceram a um mesmo reino e gênero bacteriano. Esse resultado tem particular importância, uma vez que sugere que a habilidade de degradar o oxyfluorfen não está restrita a um único grupo taxonômico de microrganismos. Em vez disso, essa característica demonstra estar amplamente distribuída entre diferentes grupos de microrganismos, o que pode indicar uma convergência evolutiva em relação a esse fenômeno adaptativo, principalmente porque esses isolados foram obtidos de uma área com frequente aplicação de oxyfluorfen. Estudos realizados com um herbicida do mesmo grupo químico do oxyfluorfen mostraram que as bactérias *Pseudomonas* sp. FB8 e *Bacillus* sp. FE-1 foram usados para remediar solo contaminado com fomesafen (YANG et al., 2011; CUI et al., 2018). Em um estudo realizado por Munoz et al. (2011), demonstraram que a levedura *C. xestobii* degradou 60% do metolachlor adicionado após 4 dias de crescimento e converteu até 25% do composto em CO<sub>2</sub> após 10 dias.

A diversidade funcional para esse fenômeno entre os grupos de microrganismos pode ser explicada pela presença de diferentes vias metabólicas envolvidas na degradação do oxyfluorfen. Desta maneira, cada grupo de isolados identificados nesse estudo pode possuir enzimas e mecanismos específicos que lhes conferem a capacidade de degradar esse herbicida de forma eficiente. A diversidade bacteriana em relação à degradação de herbicidas é de grande interesse tanto para a biotecnologia quanto para a ecologia. A busca por microrganismos capazes de degradar compostos químicos persistentes, como herbicidas, tem sido uma estratégia promissora para remediar solos contaminados (CARLES et al., 2021;

SHANG et al., 2022; LEI et al., 2023), minimizando os efeitos negativos desses compostos sobre a biodiversidade e a saúde humana. Nesse contexto, a identificação de isolados microbianos com alta eficiência de degradação, pertencentes a diferentes gêneros, amplia as possibilidades de aplicação desses microrganismos em futuros projetos de biodegradação para o oxyfluorfen.

A Análise de Correspondência Múltipla (MCA) aplicada aos resultados bioquímicos obtidos a partir dos isolados resultou em uma variância acumulada para quatro dimensões igual a 70,7% (Anexo I). Desta maneira, as quatro primeiras dimensões foram usadas para análise “biplot” dos resultados bioquímicos e sua relação com a capacidade de degradação do oxyfluorfen. As variáveis VM, Sulfeto, Indol e Ortina foram removidas da análise devido aos casos não diferirem para esses testes entre os isolados.

Os testes bioquímicos Catalase\_N, LIA\_P e Nitrato\_N foram as variáveis que mais contribuíram para a formação da dimensão 1. As demais variáveis não apresentaram diferenças significativas quanto as suas contribuições para formação das dimensões 1 e 2 (Figura 4A). Na dimensão 3, as variáveis Gelatinase\_P e MOF\_N demonstraram maior contribuição para formação dessa dimensão comparado as demais variáveis (Figura 4B). Para a dimensão 4, apenas a variável Fenilalanina\_P demonstrou uma contribuição significativa para a formação da dimensão, diferenciando das demais variáveis (Figura 4C).

Apesar da existência de variáveis com maior e menor contribuição para as dimensões avaliadas, elas não foram capazes de separar claramente os isolados quanto sua capacidade de degradação do oxyfluorfen. Os isolados classificados como Alta (69 a 80% de degradação) e Baixa (38 a 45% de degradação) para degradação do herbicida agruparam em uma mesma região, considerando todas as combinações entre as quatro dimensões usadas na análise. Apenas para os isolados classificados como média para capacidade de degradação do oxyfluorfen mostraram algum nível de separação das demais classes, tais como reação Catalase\_N, Nitrato\_N, LIA\_P, Citrato\_P, Endosporo\_N e Motilidade\_N (Figura 4A, B e C).

Os resultados obtidos pela MCA indicam que a maioria dos testes bioquímicos aplicados para identificação dos isolados microbianos não podem ser usados como marcadores para diferenciar isolados com Alta e Baixa capacidade de degradação do oxyfluorfen. A maioria dessas variáveis ficaram distribuídas na região de intercessão entre os isolados com Alta e Baixa capacidade de degradação do herbicida, conseqüentemente, indicam que podem estar presentes em isolados com ambas as habilidades para degradar o oxyfluorfen.



Figura A, B e C representam o *biplot* entre as dimensões 1 e 2, 1 e 3 e 1 e 4.

**Figura 4.** Análise de correspondência múltipla entre os isolados para suas respostas aos testes bioquímicos e a capacidade de degradação do oxyfluorfen.

Para a classe de isolados para Média capacidade de degradação do oxyfluorfen, alguns testes bioquímicos demonstram uma tendência a pertencer a isolados desse grupo. A reação positiva para LIA e citrato (LIA\_P e Citrato\_P) e ausência de endósporo e motilidade (Endosporo\_N e Motilidade\_N) foram características que diferenciaram parte dos isolados com capacidade de degradação do herbicida entre 45 a 69% dos demais isolados.

Outra questão importante é que o padrão para reações negativas para catalase e nitrato (Catalase\_N e Nitrato\_N) podem sinalizar que os isolados não possuem alta capacidade para degradar o oxyfluorfen, uma vez que elas foram posicionadas em regiões mais distantes e quadrantes opostos aos isolados com alta capacidade de degradação. Herbicidas fluorados pertencentes ao grupo difeniléteres, como oxyfluorfen, tem comumente como uma das fases de degradação a redução do grupo nitro com a acetilação concomitante da amina resultante (KEUM et al., 2008; HUANG et al., 2017). Consequentemente, a ausência de enzimas nos isolados ligadas ao processo de redução do nitrato a nitrito pode reduzir a capacidade de degradação do herbicida.

A reação negativa para catalase como uma característica não presente nos isolados com alta capacidade de degradação do oxyfluorfen pode estar correlacionada com a função dessa enzima no processo de mitigação dos danos causados pela produção de espécies reativas de oxigênio, efeito comum já observados células microbiológicas na presença desse herbicida. Por exemplo, a tolerância de uma cepa de *Pseudomonas* ao saflufenacil, um herbicida também inibidor da enzima protoporfirinogênio oxidase, foi atribuída a capacidade dessa cepa em elevar a atividade enzimática das enzimas antioxidantes catalase, ascorbato peroxidase e guaiacol peroxidase para redução do peróxido induzido pela presença do herbicida no meio (ROVIDA et al., 2021). Em outro estudo, SHEEBA et al. (2011) atribuíram a maior tolerância da bactéria *P. foveolarum* em meios contendo oxyfluorfen em comparação com a bactéria *N. muscorum* ao forte sistema de defesa antioxidante observado para a *P. foveolarum*. Desta maneira, a presença de catalases nos isolados capazes de degradar o oxyfluorfen pode atuar na redução dos efeitos tóxicos desse herbicida até que a molécula seja transformada em metabólitos não-tóxicos ao microrganismo.

Os isolados com maior capacidade para degradação do oxyfluorfen nos ensaios *in vitro* foram selecionados nos estudos para avaliar a capacidade desses microrganismos na degradação do herbicida no solo. Os dados de degradação do oxyfluorfen no solo nos diferentes tratamentos foram ajustados considerando três modelos de cinética de degradação:

o modelo pseudo-primeira ordem, o modelo pseudo-segunda ordem e o modelo Weibull (Anexos III, IV, V e VI).

Para a amostra Controle, os valores estimados para o modelo pseudo-primeira ordem foram  $c_0=7.90E+01$  e  $k=1.30E-02$ , com valor de  $R^2$  igual a 0.57 e valor de RMSE foi de 1.77 para concentração inicial de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de herbicida. Na concentração inicial de  $200 \text{ mg kg}^{-1}$ , os valores estimados para o modelo pseudo-primeira ordem foram  $C_0=1.6E+02$  e  $k=1.1E-02$ , com valor de  $R^2$  igual a 0.52 e valor de RMSE foi de 3.36. Para esse mesmo tratamento, o modelo de pseudo-segunda ordem estimou os valores  $C_0=8.20E+01$  e  $k=2.30E-04$  para concentração inicial de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $c_0=1.6E+02$  e  $k=9.1E-05$  para  $200 \text{ mg kg}^{-1}$ , com valores de  $R^2$  e RMSE variando entre 0,52 a 0,61 e 3,22 a 3.26, respectivamente. Esses resultados sugerem que os dados de degradação não se ajustaram aos modelos de pseudo-primeira e pseudo-segunda. Para o modelo Weibull, os valores estimados para o Controle foram  $c_0=1.00E+02$ ,  $\lambda=4.80E+02$  e  $\beta=2.00E-01$  para concentração inicial de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $c_0=2.0E+02$ ,  $\lambda=2.1E+03$  e  $\beta=1.6E-01$  para  $200 \text{ mg kg}^{-1}$ . O modelo Weibull obteve um valor de  $R^2$  de 0.96 e RMSE de 0.52 (Anexos V e VI).

### **3.3. Capacidade de degradação dos isolados microbianos para o oxyfluorfen no solo**

Os dados com a presença dos isolados no solo apresentaram comportamento semelhante ao controle para o ajuste dos modelos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem e Weibull quando adicionado uma concentração inicial de oxyfluorfen igual a  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ . Para o modelo pseudo-primeira ordem, os valores estimados dos parâmetros  $c_0$  (concentração inicial) variaram entre  $7.20E+01$  e  $7.90E+01$ , e os valores de  $k$  (taxa de degradação) variaram entre  $1.20E-02$  e  $1.30E-02$ . Os valores de  $R^2$  variaram entre 0.35 e 0.57, e o RMSE variou entre 1.77 e 2.32. No modelo pseudo-segunda ordem, os valores estimados para  $c_0$  variaram entre  $7.50E+01$  e  $8.20E+01$ , e os valores de  $k$  variaram entre  $2.30E-04$  e  $2.60E-04$ . Os valores de  $R^2$  variaram entre 0.48 e 0.71, e o RMSE variou entre 1.66 e 2.23. Para o modelo Weibull, os valores estimados para  $c_0$  foram consistentes em  $1.00E+02$ . O parâmetro  $\lambda$  (tempo característico) variou entre  $4.80E+02$  e  $4.90E+04$ , e o parâmetro  $\beta$  (forma) variou entre  $6.10E-02$  e  $2.00E-01$ . Os valores de  $R^2$  variaram entre 0.94 e 0.97, e o RMSE variou entre 0.48 e 0.71 (Anexos V e VI).

Para a concentração inicial de oxyfluorfen igual a  $200 \text{ mg kg}^{-1}$ , o ajuste dos modelos também demonstrou comportamento semelhante a condição inicial de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de

herbicida no solo. Para o modelo pseudo-primeira ordem, os valores estimados dos parâmetros  $c_0$  (concentração inicial) variaram entre  $1.5E+02$  e  $1.6E+02$ , e os valores de  $k$  (taxa de degradação) variaram entre  $1.0E-02$  e  $1.2E-02$ . Os valores de  $R^2$  variaram entre 0.39 e 0.52, e o RMSE variou entre 3.64 e 4.18. No modelo pseudo-segunda ordem, os valores estimados para  $c_0$  variaram entre  $1.6E+02$  e  $1.6E+02$ , e os valores de  $k$  variaram entre  $9.1E-05$  e  $1.2E-04$ . Os valores de  $R^2$  variaram entre 0.49 e 0.61, e o RMSE variou entre 3.22 e 4.03. Para o modelo Weibull, os valores estimados para  $c_0$  foram consistentes em  $2.0E+02$ . O parâmetro  $\lambda$  variou entre  $2.1E+03$  e  $1.6E+04$ , e o parâmetro  $\beta$  variou entre  $9.4E-02$  e  $1.6E-01$ . Os valores de  $R^2$  variaram entre 0.95 e 0.98, e o RMSE variou entre 0.67 e 1.35 (Anexos V e VI).

Em geral, o modelo Weibull apresentou os maiores valores de  $R^2$  e os menores valores de RMSE, indicando um melhor ajuste aos dados experimentais em comparação com os modelos pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem. O melhor ajuste dos modelos Weibull ocorreu devido ao padrão de degradação observado do oxyfluorfen no solo para todos os tratamentos. Mesmo para o controle, houve uma rápida dissipação da molécula nos primeiros dias após a aplicação desse herbicida, tanto para doses de 100 e 200 mg  $ka^{-1}$ . Apesar do solo ter sido esterilizado, e a via microbiana ser uma via importante para dissipação de herbicidas, como o oxyfluorfen, outras vias não microbiológicas podem atuar na degradação dessa molécula.

O oxyfluorfen ao grupo dos difenil éteres fluorados, que possui uma estrutura química contendo um grupo trifluorometila e um átomo de cloro ligados ao mesmo anel aromático. Essa estrutura é conhecida por sua capacidade de sofrer fotodegradação quando exposta à luz solar ou outras fontes de radiação ultravioleta (YING et al., 1999). SCRANO et al. (2004) observaram que a fotodegradação foi responsável pela redução do tempo de meia-vida do oxyfluorfen em dois solos de duas províncias da Grécia (Preveza and Malgara soils) comparado a condições sem a presença de luz. Segundo esses autores, o tempo de meia-vida reduziu em até 48% quando a dissipação desse herbicida ocorreu sob luz solar, e até 55% quando aplicado luz através de uma lâmpada de arco de xenônio em relação ao tratamento no escuro. Apesar do papel da fotodegradação na dissipação do oxyfluorfen ser considerado significativo, a capacidade de sorção do solo para esse herbicida pode reduzir consideravelmente a ação da luz sobre a degradação dessa molécula (SCRANO et al., 2004), inibindo em alguns casos a ocorrência desse fenômeno (CALDERÓN et al., 2015). Para o

solo usado em nossos estudos, a rápida degradação do oxyfluorfen no solo esterilizado sugere que a sorção não foi suficiente para impedir a fotodegradação da molécula.

Os modelos Weibull de melhor ajuste para os tratamentos controle e isolados, tanto na concentração inicial de 100 mg kg<sup>-1</sup> quanto de 200 mg kg<sup>-1</sup>, foram comparados quando a similaridade para os parâmetros C0, lambda ( ) e beta ( ) pelo teste ANOVA e Akaike. De maneira geral, o modelo reduzido de parâmetros únicos para C0 e lambda, variando apenas para beta, foi considerado similar ao modelo com 3 parâmetros variáveis (C0, lambda e beta), tanto para concentração inicial de 100 mg kg<sup>-1</sup> (p-valor = 0,42) e 200 mg kg<sup>-1</sup> (p-valor = 0,85) (Anexos VII e VIII). Outros modelos com parâmetros reduzidos também foram considerados similares ao modelo com variação para todos os parâmetros, porém, o modelo com variação apenas para o parâmetro beta foi superior segundo critério Akaike. O modelo para variação do parâmetro beta demonstrou menor valor de AIC, tanto para concentração inicial de 100 mg kg<sup>-1</sup> (1161,45) quanto para 200 mg kg<sup>-1</sup> (0,00) (Tabela 4).

**Tabela 4.** Teste Akaike para seleção de modelos parcimoniosos e melhor ajuste aos dados de degradação do oxyfluorfen para uma concentração inicial no solo de 100 e 200 mg kg<sup>-1</sup>.

Concentração inicial 100 mg kg <sup>-1</sup>						
Número de parâmetros variáveis	K	AICc	Delta_AICc	AICcWt	Cum.Wt	LL
Apenas beta*	10	1161.45	0	0.55	0.55	-570.21
c0 e beta	16	1161.86	0.41	0.45	1	-563.61
Lambda e beta	10	1173.78	12.33	0	1	-576.37
c0 e lambda	16	1174.91	13.46	0	1	-570.14
Todos parâmetros	22	1176.26	14.82	0	1	-563.61
Apenas lambda	16	1186.69	25.25	0	1	-576.03
Apenas c0	10	1189.26	27.81	0	1	-584.11
Todos parâmetros iguais	4	1223.87	62.43	0	1	-607.85
Concentração inicial 200 mg kg <sup>-1</sup>						
Número de parâmetros variáveis	K	AICc	Delta_AICc	AICcWt	Cum.Wt	LL
Apenas beta*	10	1409.82	0,00	0.86	0.86	-694.39
Apenas lambda	10	1414.15	4.33	0.1	0.96	-696.56
Lambda e beta	16	1415.9	6.08	0.04	1	-690.64
c0 e beta	16	1423.37	13.55	0	1	-694.37
c0 e lambda	16	1427.48	17.67	0	1	-696.43
Todos parâmetros	22	1430.31	20.49	0	1	-690.64
Apenas c0	10	1432.97	23.15	0	1	-705.97
Todos parâmetros iguais	4	1467.54	57.73	0	1	-729.68

\*Modelo de melhor desempenho segundo critério Akaike para parcimônia e acurácia.

O valor não-significativo entre o modelo para variação nos parâmetros c0, lambda e beta e o modelo reduzido apenas para variação em beta sugere que o modelo reduzido pode representar o comportamento do tratamento controle e dos isolados para degradação do

oxyflourfen. Mesmo que outros modelos reduzidos tenham obtido valor não-significativo pela ANOVA comparado ao modelo completo, a menor pontuação do modelo com variação apenas para beta indica que esse modelo é aquele com maior parcimônia e acurácia entre os demais modelos avaliados. Desta maneira, existe diferenças significativas apenas para o parâmetro beta entre os modelos de degradação obtidos para os tratamentos controle e isolados. Esse parâmetro representa a inclinação do modelo, ou seja, a velocidade (taxa) de degradação da molécula ao longo do tempo. Modelos com menores valores de beta possuem maior velocidade de degradação em relação a modelos com maiores valores para esse parâmetro (JANKOVIĆ et al., 2014).

O tratamento controle obteve os maiores valores de beta comparado aos isolados, tanto para a concentração inicial de oxyfluorfen adicionada ao solo de 100 mg kg<sup>-1</sup> (1.52E-01 ±1.09E-02) como para 200 mg kg<sup>-1</sup> (1.33E-01 ±9.45E-03). A ordem crescente para o valor de beta entre os isolados na concentração de 100 mg kg<sup>-1</sup> foi isolado 14 (1.06E-01), isolado 4 (1.16E-01), 5 isolados (1.23E-01), isolado 26 e isolado 31 (1.33E-01) e isolado 28 (1.36E-01). Para a concentração de 200 mg kg<sup>-1</sup>, a ordem crescente para esse parâmetro foi isolado 14 (1.01E-01), isolado 4 e isolado 26 (1.06E-01), 5 isolados (1.09E-01), isolado 28 (1.12E-01) e isolado 31 (1.17E-01) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Valores dos parâmetros obtidos para o modelo reduzido Weibull ajustados aos dados de degradação do oxyfluorfen no solo para os tratamentos durante 40 dias de avaliação após a aplicação inicial de 100 e 200 mg kg<sup>-1</sup> do herbicida

Modelo reduzido: $C(t) \sim c_0 * \exp(-(epoca/lambda)^{beta}[trat])$					
Concentração inicial de 100 mg kg <sup>-1</sup>					
	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )	
c0	1.00E+02	5.95E-01	168.159	<2e-16	***
Lambda	1.46E+03	4.53E+02	3.216	0.0015	**
Beta:Controle	1.52E-01	1.09E-02	14.041	<2e-16	***
Beta:isolado 14	1.06E-01	7.89E-03	13.437	<2e-16	***
Beta:isolado 26	1.33E-01	9.57E-03	13.879	<2e-16	***
Beta:isolado 28	1.36E-01	9.80E-03	13.914	<2e-16	***
Beta:isolado 31	1.33E-01	9.55E-03	13.874	<2e-16	***
Beta:isolado 4	1.16E-01	8.48E-03	13.631	<2e-16	***
Beta: 5 isolados	1.23E-01	8.95E-03	13.753	<2e-16	***
Concentração inicial de 200 mg kg <sup>-1</sup>					
	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )	
c0	2.00E+02	1.04E+00	193.082	<2e-16	***
Lambda	5.06E+03	2.03E+03	2.493	0.0134	*
Beta:Controle	1.33E-01	9.45E-03	14.055	<2e-16	***
Beta:isolado 14	1.01E-01	7.32E-03	13.814	<2e-16	***
Beta:isolado 26	1.06E-01	7.65E-03	13.873	<2e-16	***

Beta:isolado 28	1.12E-01	8.02E-03	13.928	<2e-16	***
Beta:isolado 31	1.17E-01	8.40E-03	13.973	<2e-16	***
Beta:isolado 4	1.06E-01	7.64E-03	13.872	<2e-16	***
Beta:5 isolados	1.09E-01	7.82E-03	13.9	<2e-16	***

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1; C<sub>(t)</sub> = concentração no tempo t; c0 = Concentração inicial estimada; época = época de avaliação; lambda e beta = parâmetros da equação; [trat] = indica o parâmetro variável do modelo para os tratamentos .

Apesar da diferença para a velocidade de degradação ao avaliar o parâmetro beta para o controle e os isolados, nenhum tratamento avaliado alcançou o tempo de meia-vida para o oxyfluorfen. Além disso, não houveram diferenças para a quantidade de oxyfluorfen extraída a partir dos solos após 40 dias de avaliação, independente da concentração inicial de herbicida aplicada ao solo (Tabela 6).

**Tabela 6.** Análise de variância entre os isolados para degradação do oxyfluorfen aos 40 dias após sua aplicação no solo em duas concentrações iniciais distintas

Análise de variância para concentração inicial de 100 mg kg <sup>-1</sup>					
	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	6	40.00	6.67	0.88	0.53
Bloco	3	14.65	4.88	0.64	0.60
Resíduo	18	137.14	7.62		
Total	27	191.78			
Coeficiente de variação (%)					
	5.18				
Teste de normalidade dos resíduos (valor-p)					
	0.35				
Teste de homogeneidade das variâncias: (valor-p)					
	0.10				
Análise de variância para concentração inicial de 200 mg kg <sup>-1</sup>					
	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	6	92.09	15.35	1.14	0.38
Bloco	3	62.06	20.69	1.54	0.24
Resíduo	18	242.05	13.45		
Total	27	396.20			
Coeficiente de variação (%)					
	3.30				
Teste de normalidade dos resíduos (valor-p)					
	0.49				
Teste de homogeneidade das variâncias: (valor-p)					
	0.73				

GL: Grau de liberdade; SQ: Soma dos quadrados; QM: Quadrado médio.ns: não significativo pelo teste F de variância ao p <0,05.

O aumento da dose não provocou uma mudança significativa na velocidade de degradação do oxyfluorfen pelos isolados. A concentração inicial de herbicidas pode afetar de maneira diferente os microrganismos e sua resposta quanto a taxa de degradação do poluente. Um estudo avaliando a capacidade do isolado *Proteiniclasticum sediminis* BAD-10<sup>T</sup> para degradação do acetochlor mostrou resultados similares aos desse estudo, evidenciado que o

tempo necessário para degradar metade do substrato ( $t_{1/2}$ ) foi proporcional à concentração de acetochlor (LIU et al., 2022). Por outro lado, MOHANTY et al. (2019) observaram que o aumento nas concentrações butachlor reduziu a eficiência da cepa microbiana *Pseudomonas putida* G3. Geralmente, o aumento nas concentrações iniciais de pesticidas pode aumentar os danos sobre organismos tolerantes, diminuindo sua eficiência metabólica para degradação (SHAHID et al., 2019; ZHANG et al., 2021). Esse efeito também foi observado por MOHANTY et al. (2019) uma vez que a imobilização da *Pseudomonas putida* G3 em grânulos de alginato de cálcio aumentou a tolerância e a eficiência de degradação da cepa bacteriana ao butaclor até 2000 mg L<sup>-1</sup>.

O menor valor de beta obtido para os isolados 14 e 4 sugerem que esses microrganismos, quando adicionados ao solo, podem acelerar a degradação do oxyfluorfen comparado aos demais isolados e ao controle. Os isolados 14 e 4 foram capazes de degradar 40% da concentração inicial de oxyfluorfen aplicado ao solo em, respectivamente, 2,8 e 7,4 dias na condição de 100 mg kg<sup>-1</sup>, e 9,8 e 13,6 dias para 200 mg kg<sup>-1</sup>. Para o controle, a degradação próxima a 40% da concentração inicial de oxyfluorfen foi alcançada apenas aos 40 dias após a aplicação do herbicida. A rápida degradação do oxyfluorfen não causa grandes impactos no setor agrícola devido à ausência de relatos sobre a ocorrência de *carryover* desse herbicida. No entanto, rápida degradação desse herbicida aplicado ao solo é um aspecto de grande relevância na perspectiva ambiental.

A rápida degradação do oxyfluorfen, principalmente nas condições com a presença dos isolados 14 e 4, pode reduzir sua persistência no solo, minimizando o risco de lixiviação e escoamento superficial desse herbicida para lençóis freáticos e mananciais. Em ambientes aquáticos, diferentes organismos não-alvo a esse herbicida já demonstraram sensibilidade a exposição subletal. Por exemplo, resíduos de oxyfluorfen em água foram capazes de alterar as respostas das atividades de enzimas antioxidantes até 21 dias após a exposição e aumentar o teor de ácido oleico (C18:1) no fígado de tilápias (*Oreochromis niloticus*) (PEIXOTO et al., 2006). Alterações bioquímicas significativas também foram observadas em *C. gariepinus*, acompanhadas por distúrbios patológicos nos tecidos hepático, renal, cerebral e testicular após a exposição a níveis sub-letais de oxyfluorfen (ABD EL-RAHMAN et al., 2019). O oxyfluorfen também danificou os podócitos glomerulares e induziu a apoptose dos túbulos proximais de peixes-zebra, prejudicando o funcionamento normal do corpo e ao sistema de filtração renal desse organismo (HUANG et al., 2022).

O mix dos isolados (5 isolados), não elevou a taxa de degradação do oxyfluorfen, bem como não aumentou a quantidade desse herbicida degradada após 40 dias da aplicação, em ambas concentrações iniciais adicionadas ao solo. Embora comunidades microbianas mistas tenham o potencial de aprimorar a degradação de pesticidas por meio de interações sinérgicas (VILLAVERDE et al., 2017; RAIMONDO et al., 2022; VANITHA et al., 2023;), a complexidade das interações microbianas e fatores ambientais pode afetar sua eficiência. O uso de uma mistura de microrganismos pode não necessariamente levar a um aumento na eficiência devido a vários fatores. Em primeiro lugar, os diversos microrganismos na mistura podem competir por recursos limitados, como nutrientes e fontes de energia, criando condições subótimas para alguns deles e reduzindo sua capacidade de degradar os pesticidas de forma eficaz (BIROLI et al., 2020; JAWED et al., 2019). Além disso, as interações dentro da comunidade microbiana mista podem ser antagônicas, com certos microrganismos produzindo substâncias que inibem o crescimento ou atividade de outros. Ainda, a degradação incompleta do pesticida por um isolado específico pode levar a metabólitos tóxicos a alguns indivíduos da comunidade microbiana, prejudicando o processo geral de degradação (BHATT et al., 2021; KHANPOUR-ALIKELAYEH et al., 2021).

A incapacidade dos isolados, mesmo os isolados 4 e 14 que tiveram maior taxa de degradação do oxyfluorfen, para reduzir as concentrações desse herbicida comparado ao controle pode estar associada a retenção da molécula ao solo. A sorção de herbicidas no solo indis põe a molécula a ação degradadora dos microrganismos ou demais vias de degradação não-biológicas (SU et al., 2019; ALVAREZ et al., 2021). Esse fato pode elevar a persistência dos herbicidas no solo e impedir a completa mineralização da molécula (JAMES et al., 2021; URSELER et al., 2022), efeito observado para oxyfluorfen em todos os tratamentos desse estudo. Desta maneira, a ocorrência de mecanismos capazes de promover a dessorção do herbicida adsorvido é necessária para que os isolados possam promover a completa degradação da molécula de oxyfluorfen (WU et al., 2019).

#### **4. CONCLUSÕES**

A utilização de microrganismos para a degradação do herbicida oxyfluorfen apresenta resultados promissores em termos de taxa e velocidade de degradação, bem como na diminuição da meia-vida do herbicida no solo. Dos 35 microrganismos do solo inicialmente isolados, apenas 20 são capazes de sobreviver em ambientes contaminados com o herbicida.

Esses isolados microbianos foram submetidos a testes de degradação *in vitro* do oxyfluorfen, e os resultados mostraram que a presença dos microrganismos aumentou significativamente a taxa de degradação do herbicida. Em média, os microrganismos selecionados apresentam uma taxa de degradação de 65%, evidenciando sua eficiência na biodegradação do composto químico. Apesar de uma diferenciação clara entre os isolados com alta e baixa capacidade de degradação do herbicida, a Análise de Correspondência Múltipla revela que os testes bioquímicos tem pouco potencial para diferenciar esses isolados e serem usados como marcadores para degradação do oxyfluorfen.

Os melhores isolados no teste *in vitro* não são capazes de aumentar a quantidade de oxyfluorfen degradada durante a bioaugmentação no solo estudado comparado a condição sem a presença desses isolados. O mix desses isolados também não melhora a eficiência para degradação do oxyfluorfen. Uma velocidade média de degradação de 0,032 mg kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> foi observada quando os isolados foram adicionados ao solo, representando uma redução considerável nos níveis de oxyfluorfen no ambiente ao longo do tempo. A maior velocidade de degradação do oxyfluorfen no solo na presença dos isolados 4 e 14 reduz em média 33,5 e 29,5 dias a persistência de 40% da concentração inicial do oxyfluorfen aplicada no ambiente edáfico comparado ao controle sem a bioaugmentação.

## 5. REFERÊNCIAS

ABATENH, Endeshaw et al. The role of microorganisms in bioremediation-A review. **Open Journal of Environmental Biology**, v. 2, n. 1, p. 038-046, 2017.

ABD EL-RAHMAN, Ghada I. et al. Assessment of hematological, hepato-renal, antioxidant, and hormonal responses of *Clarias gariepinus* exposed to sub-lethal concentrations of oxyfluorfen. **Aquatic Toxicology**, v. 217, p. 105329, 2019.

ALVAREZ, Dasiel Obregón et al. Sorption-desorption and biodegradation of sulfometuron-methyl and its effects on the bacterial communities in Amazonian soils amended with aged biochar. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 207, p. 111222, 2021.

BENSON, H. J. **Microbiological applications: laboratory manual in general microbiology**. 8th ed. Boston: McGraw-Hill, 2002.

BHATT, Pankaj et al. Biotechnological basis of microbial consortia for the removal of pesticides from the environment. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 3, p. 317-338, 2021.

BILLET, Loren et al. Complete genome sequences of four atrazine-degrading bacterial strains, *Pseudomonas* sp. strain ADPe, *Arthrobacter* sp. strain TES, *Variovorax* sp. strain 38R,

and Chelatobacter sp. strain SR38. **Microbiology Resource Announcements**, v. 10, n. 1, p. 10.1128/mra.01080-20, 2021.

BIROLI, Willian Garcia; DA SILVA, Bianca Ferreira; RODRIGUES-FILHO, Edson. Biodegradation of the fungicide Pyraclostrobin by bacteria from orange cultivation plots. **Science of the Total Environment**, v. 746, p. 140968, 2020.

CALDERON, Maria Jesus et al. Herbicide monitoring in soil, runoff waters and sediments in an olive orchard. **Science of the Total Environment**, v. 569, p. 416-422, 2016.

CALDERÓN, María Jesús et al. Influence of olive oil mill waste amendment on fate of oxyfluorfen in southern Spain soils. **CLEAN–Soil, Air, Water**, v. 43, n. 7, p. 1107-1113, 2015.

CARLES, Louis et al. Potential of preventive bioremediation to reduce environmental contamination by pesticides in an agricultural context: a case study with the herbicide 2, 4-D. **Journal of Hazardous Materials**, v. 416, p. 125740, 2021.

CUI, Ning et al. Microbial degradation of fomesafen and detoxification of fomesafen-contaminated soil by the newly isolated strain Bacillus sp. FE-1 via a proposed biochemical degradation pathway. **Science of the Total Environment**, v. 616, p. 1612-1619, 2018.

FAO. **World food and agriculture statistical yearbook 2022**. FAO, 2022. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/502.htm>. Acesso em: 8 de abril de 2023.

HUANG, Lirong et al. Oxyfluorfen exposure can cause acute kidney injury by promoting ROS-induced oxidative stress and inflammation in zebrafish. **Journal of Hazardous Materials**, v. 440, p. 129823, 2022.

HUANG, Xing et al. Microbial catabolism of chemical herbicides: microbial resources, metabolic pathways and catabolic genes. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 143, p. 272-297, 2017.

IBRAHIM, Amina Mohamed; SAYED, Dawlat A. Toxicological impact of oxyfluorfen 24% herbicide on the reproductive system, antioxidant enzymes, and endocrine disruption of *Biomphalaria alexandrina* (Ehrenberg, 1831) snails. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 8, p. 7960-7968, 2019.

JAMES, Trevor K. et al. Degradation of atrazine and bromacil in two forestry waste products. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 3284, 2021.

JANKOVIĆ, Bojan. Kinetic modeling of native Cassava starch thermo-oxidative degradation using Weibull and Weibull-derived models. **Biopolymers**, v. 101, n. 1, p. 41-57, 2014.

JAWED, Kamran; YAZDANI, Syed Shams; KOFFAS, Mattheos AG. Advances in the development and application of microbial consortia for metabolic engineering. **Metabolic engineering communications**, v. 9, p. e00095, 2019.

KEUM, Young Soo; LEE, Young Ju; KIM, Jeong-Han. Metabolism of nitrodiphenyl ether herbicides by dioxin-degrading bacterium *Sphingomonas wittichii* RW1. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 19, p. 9146-9151, 2008.

KHANPOUR-ALIKELAYEH, Elham; PARTOVINIA, Ali. Synergistic and antagonistic effects of microbial co-culture on bioremediation of polluted environments. **Microbial Rejuvenation of Polluted Environment**: Volume 2, p. 229-265, 2021.

LEI, Qiqi et al. Microbial degradation as a powerful weapon in the removal of sulfonylurea herbicides. **Environmental Research**, p. 116570, 2023.

LIU, Junwei et al. Anaerobic biodegradation and detoxification of chloroacetamide herbicides by a novel *Proteiniclasticum sediminis* BAD-10T. **Environmental Research**, v. 209, p. 112859, 2022.

MAQBOOL, Zahid et al. Perspectives of using fungi as bioresource for bioremediation of pesticides in the environment: a critical review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 16904-16925, 2016.

**MINISTERIO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Oxyfluorfen, 2023.** Disponível em: < [https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons) >. Acesso em: 08 abril 2023.

MOHAMED, Afrah T. et al. Degradation of oxyfluorfen herbicide by soil microorganisms biodegradation of herbicides. **Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 274-279, 2011.

MOHANTY, Satya Sundar; JENA, Hara Mohan. Degradation kinetics and mechanistic study on herbicide bioremediation using hyper butachlor-tolerant *Pseudomonas putida* G3. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 125, p. 172-181, 2019.

MUNOZ, Ana et al. Biodegradation and mineralization of metolachlor and alachlor by *Candida xestobii*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 2, p. 619-627, 2011.

NISHIMURA, K. et al. Biodegradation of triazine herbicides on polyvinylalcohol gel plates by the soil yeast *Lipomyces starkeyi*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 58, p. 848-852, 2002.

PEIXOTO, F. et al. Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 85, n. 2, p. 91-96, 2006.

**PESTICIDE PROPERTIES DATA BASE – PPDB.** Oxyfluorfen, 2023. Disponível em: < <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/502.htm> > Acesso em: 08 de abril de 2023.

PRITCHARD, M. K.; WARREN, G. F.; DILLEY, R. A. Site of action of oxyfluorfen. **Weed Science**, v. 28, n. 6, p. 640-645, 1980.

PROCOP, G. W. et al. **Diagnóstico microbiológico | texto e atlas.** 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

RAIMONDO, Enzo E. et al. Bioaugmentation of Biomixtures with Consortia of Actinobacteria and Fungi for Improving Pesticides Removal. **In: Mycoremediation Protocols.** New York, NY: Springer US, 2022. p. 221-235.

ROVIDA, Amanda Flávia da Silva et al. Herbicides tolerance in a *Pseudomonas* strain is associated with metabolic plasticity of antioxidative enzymes regardless of selection. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 673211, 2021.

SCRANO, Laura et al. Surface retention and photochemical reactivity of the diphenylether herbicide oxyfluorfen. **Journal of environmental quality**, v. 33, n. 2, p. 605-611, 2004.

SHAHID, Mohammad et al. In vitro investigation to explore the toxicity of different groups of pesticides for an agronomically important rhizosphere isolate *Azotobacter vinelandii*. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 157, p. 33-44, 2019.

SHANG, Na et al. Biodegradation of diphenyl ether herbicide lactofen by *Bacillus* sp. YS-1 and characterization of two initial degrading esterases. **Science of The Total Environment**, v. 806, p. 151357, 2022.

SHARMA, Anket et al. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. **SN Applied Sciences**, v. 1, p. 1-16, 2019.

SHARMA, Priyanka et al. Efficient biotransformation of herbicide diuron by bacterial strain *Micrococcus* sp. PS-1. **Biodegradation**, v. 21, p. 979-987, 2010.

SHEEBA, Singh VP; SRIVASTAVA, Prabhat Kumar; PRASAD, Sheo Mohan. Differential physiological and biochemical responses of two cyanobacteria *Nostoc muscorum* and *Phormidium foveolarum* against oxyfluorfen and UV-B radiation. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 74, n. 7, p. 1981-1993, 2011.

SINGH, Baljinder; SINGH, Kashmir. Microbial degradation of herbicides. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 2, p. 245-261, 2016.

SONDHIA, S. Persistence of oxyfluorfen in soil and detection of its residues in rice crop. **Toxicological and Environ Chemistry**, v. 91, n. 3, p. 425-433, 2009.

SU, Wangcang et al. Adsorption and degradation of imazapic in soils under different environmental conditions. **PLoS one**, v. 14, n. 7, p. e0219462, 2019.

TOPAZ, Tom et al. Pesticide load dynamics during stormwater flow events in Mediterranean coastal streams: Alexander stream case study. **Science of the Total Environment**, v. 625, p. 168-177, 2018.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017

TUDI, Muyesaier et al. Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. **International journal of environmental research and public health**, v. 18, n. 3, p. 1112, 2021.

URSELER, Noelia et al. Atrazine behavior in an agricultural soil: adsorption–desorption, leaching, and bioaugmentation with *Arthrobacter* sp. strain AAC22. **Journal of Soils and Sediments**, v. 22, p. 93-108, 2022.

VANITHA, T. K. et al. Microbial degradation of organochlorine pesticide: 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid by axenic and mixed consortium. **Bioresource Technology**, v. 382, p. 129031, 2023.

VILLAVARDE, J. et al. Bioremediation of diuron contaminated soils by a novel degrading microbial consortium. **Journal of environmental management**, v. 188, p. 379-386, 2017.

WU, Chi et al. Sorption, degradation and bioavailability of oxyfluorfen in biochar-amended soils. **Science of The Total Environment**, v. 658, p. 87-94, 2019.

YANG, Fengshan et al. Isolation, identification, and soil remediation of fomesafen-degrading strain FB8. *Wei Sheng wu xue bao*= **Acta Microbiologica Sinica**, v. 51, n. 9, p. 1232-1239, 2011.

YING, Guang-Guo; WILLIAMS, Brian. The degradation of oxadiazon and oxyfluorfen by photolysis. **Journal of Environmental Science & Health Part B**, v. 34, n. 4, p. 549-567, 1999.

ZHANG, Yuanqing et al. Effects of cloransulam-methyl and diclosulam on soil nitrogen and carbon cycle-related microorganisms. **Journal of Hazardous Materials**, v. 418, p. 126395, 2021.

ZHAO, Huanhuan et al. Characterization of a novel oxyfluorfen-degrading bacterial strain *Chryseobacterium aquifrigidense* and its biochemical degradation pathway. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, p. 6837-6845, 2016.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

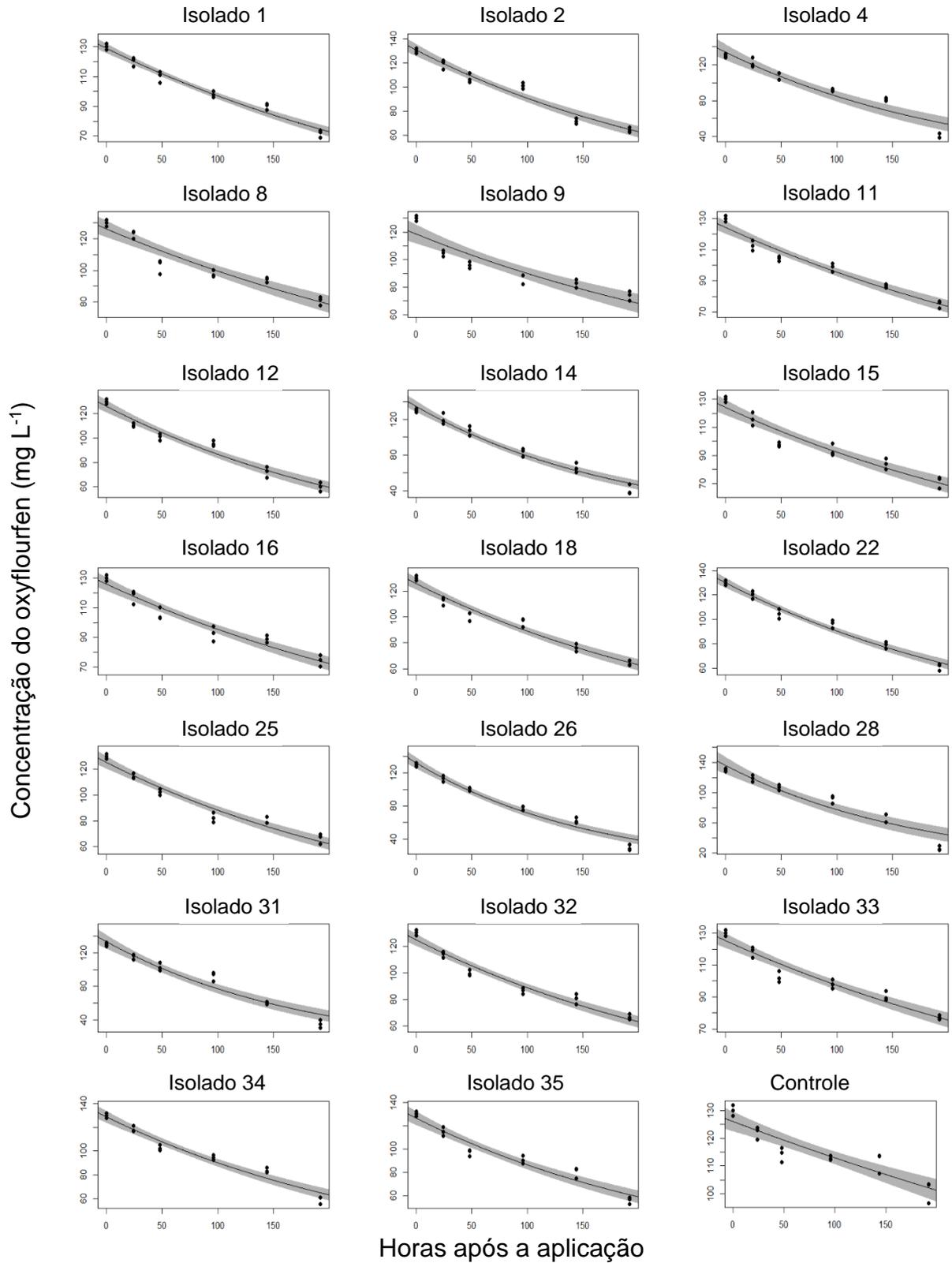
Os objetivos dessa pesquisa foram cuidadosamente delineados para selecionar isolados microbianos capazes de sobreviver em ambientes contaminados com oxyfluorfen, avaliar seu potencial de degradação *in vitro* e identificar possíveis marcadores bioquímicos indicativos de alta capacidade de degradação do herbicida. Apesar de caracterizar 20 isolados sobreviventes, uma diferenciação clara baseada apenas em testes bioquímicos mostrou-se desafiadora, enfatizando a necessidade de uma exploração adicional de marcadores alternativos ou abordagens moleculares abrangentes.

No entanto, o estudo demonstrou que a presença de isolados microbianos no solo aumentou significativamente a taxa de degradação do oxyfluorfen. Vale ressaltar que a fotodegradação também contribuiu para a rápida dissipação do herbicida. A heterogeneidade observada nas vias metabólicas microbianas pode explicar a diversidade na capacidade funcional de degradação do herbicida entre diferentes grupos microbianos.

A pesquisa oferece informações valiosas sobre o potencial da bioaugmentação microbiana para projetos de biorremediação do oxyfluorfen. A identificação de isolados de diferentes gêneros que exibem alta eficiência na degradação do herbicida apoia a ideia de utilizar uma variedade de microrganismos em tais empreendimentos. No entanto, investigações adicionais são necessárias para identificar indicadores bioquímicos mais específicos e elucidar os mecanismos subjacentes à degradação microbiana do oxyfluorfen.

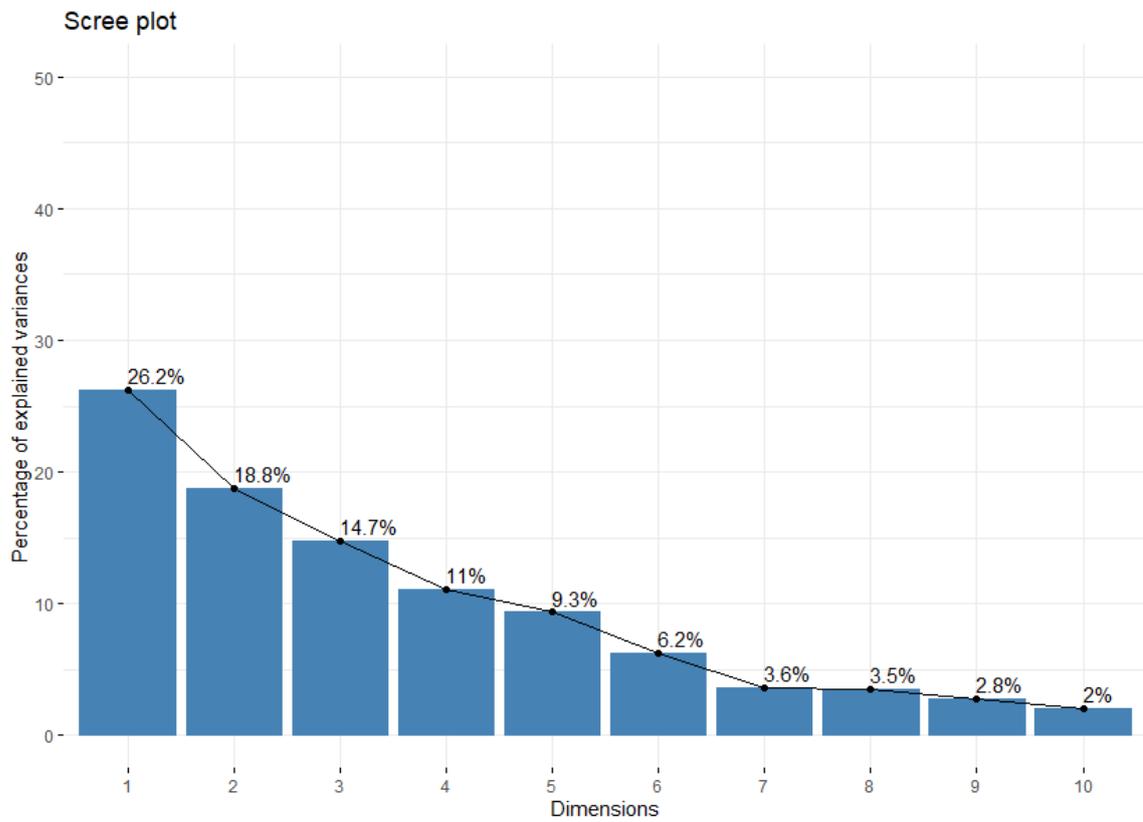
No geral, este estudo contribuiu para o avanço de práticas agrícolas sustentáveis, oferecendo um meio viável de enfrentar os desafios ambientais associados ao uso de herbicidas. Ao aproveitarmos o poder dos microrganismos para degradar o oxyfluorfen, podemos buscar uma paisagem agrícola mais ecologicamente equilibrada, garantindo tanto a prosperidade econômica quanto a segurança alimentar, ao mesmo tempo em que preservamos o meio ambiente natural para as gerações futuras. As implicações desta pesquisa instigam formuladores de políticas e partes interessadas a considerar os benefícios potenciais de estratégias de biorremediação no contexto do desenvolvimento agrícola sustentável.

## ANEXOS

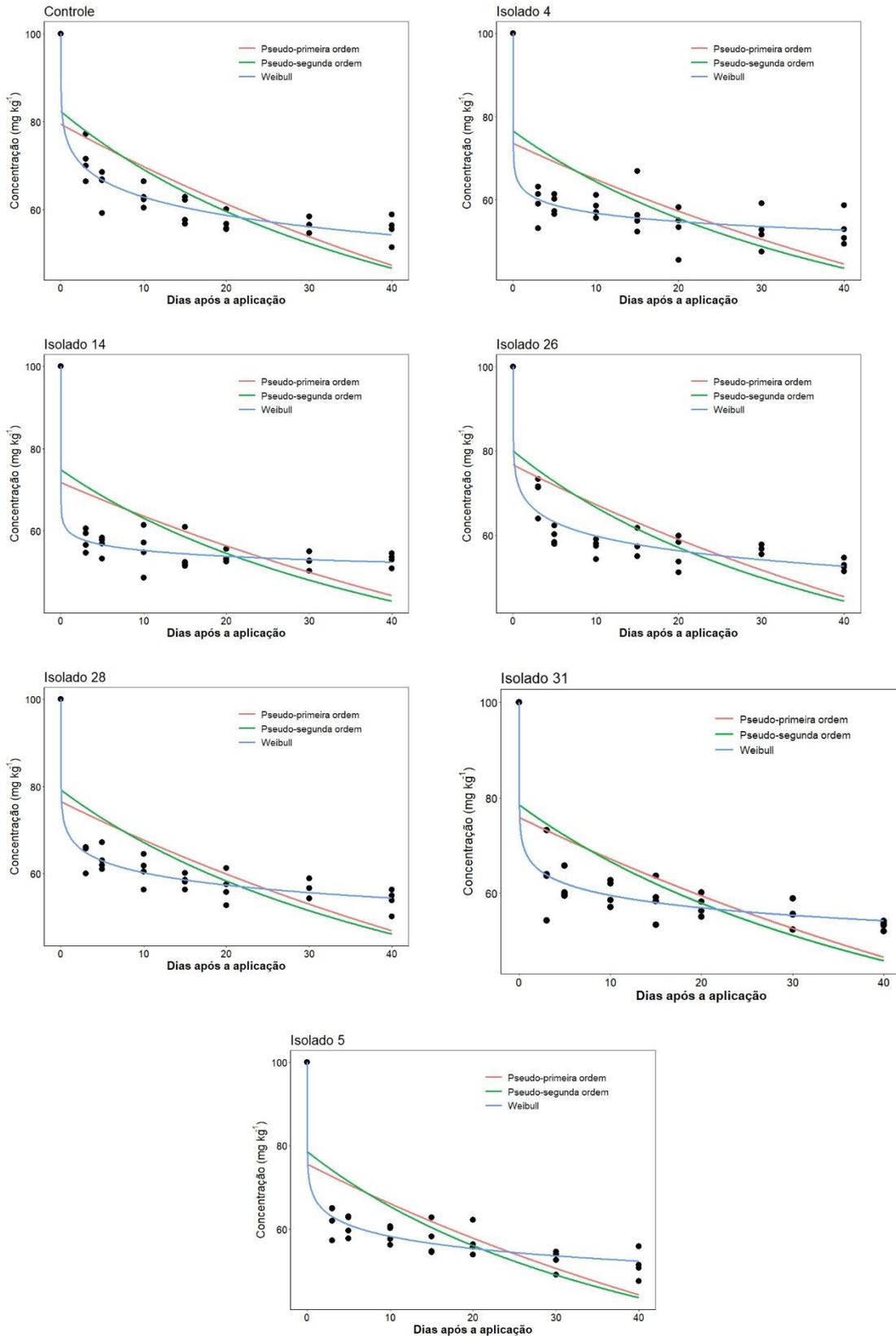


Área sombreada em cinza indica o intervalo de confiança do modelo a 95% de significância.

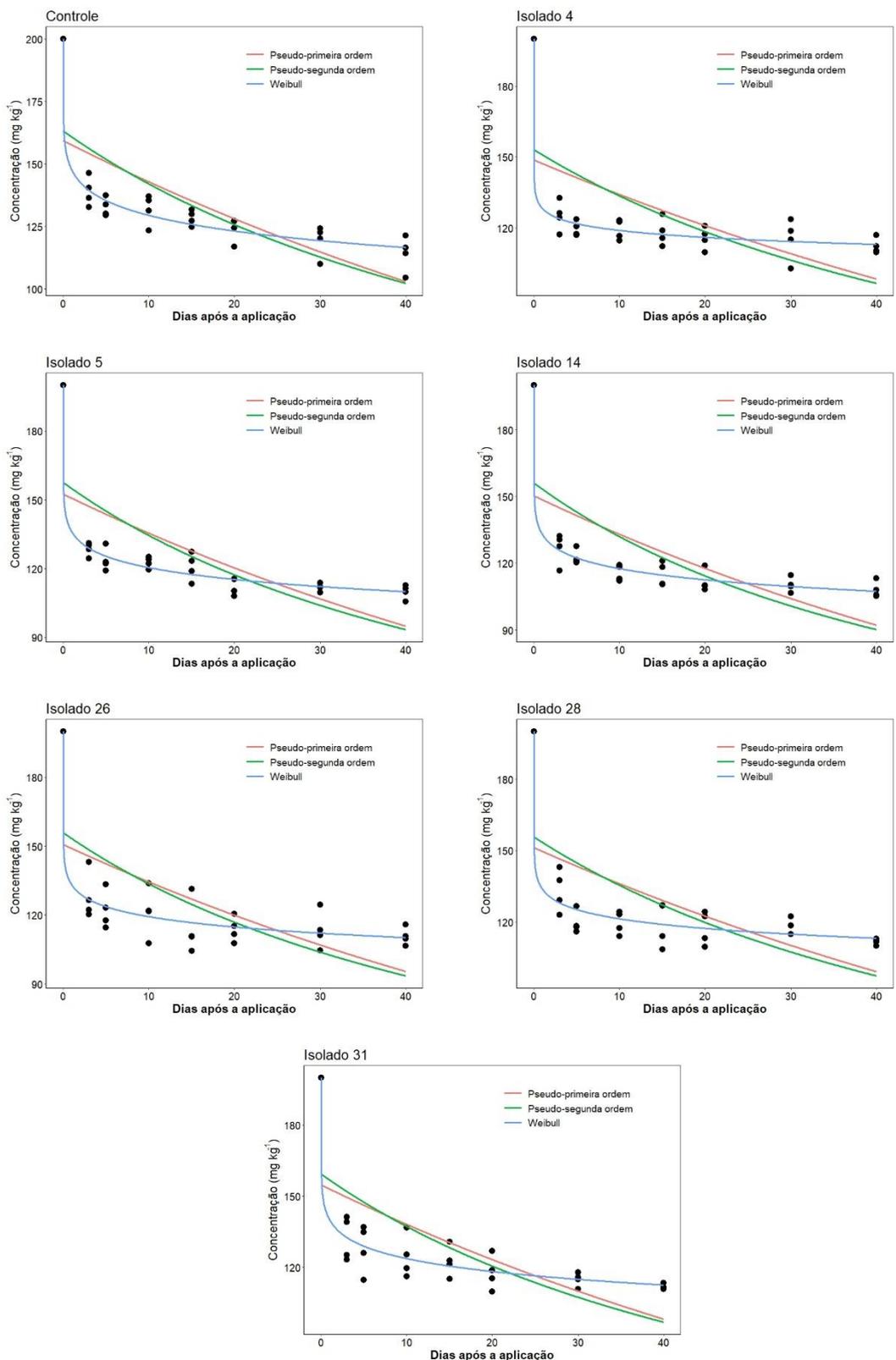
**Anexo I.** Curvas de concentração do oxyfluorfen ( $\text{mg L}^{-1}$ ) em meios contendo isolados bacterianos 24, 48, 96, 144 e 192 horas após a aplicação inicial de  $130 \text{ mg L}^{-1}$  do herbicida.



**Anexo II.** Porcentagem da variação explicada por cada dimensão obtida a partir da Análise de Correspondência Múltipla entre os isolados para suas respostas aos testes bioquímicos.



**Anexo III.** Modelos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem e Weibull ajustados para os dados de degradação do oxyfluorfen avaliados aos 3, 5, 10, 15, 20, 30 e 40 dias após a aplicação de 100 mg kg<sup>-1</sup> do herbicida no solo em diferentes tratamentos.



**Anexo IV.** Modelos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem e Weibull ajustados para os dados de degradação do oxyfluorfen avaliados aos 3, 5, 10, 15, 20, 30 e 40 dias após a aplicação de 200 mg kg<sup>-1</sup> do herbicida no solo em diferentes tratamentos.

**Anexo V.** Parâmetros dos modelos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem e Weibull ajustados para os dados de degradação do oxyfluorfen avaliados aos 3, 5, 10, 15, 20, 30 e 40 dias após a aplicação de 100 mg kg<sup>-1</sup> do herbicida no solo em diferentes tratamentos.

Isolado		Pseudo-primeira ordem		Pseudo-segunda ordem		Weibull		
		c0	k	c0	k	c0	lambda	beta
Controle	Estimate	7.9E+01	1.3E-02	8.2E+01	2.3E-04	1.0E+02	4.8E+02	2.0E-01
	Std.	3.0E+00	2.3E-03	3.1E+00	3.8E-05	1.5E+00	2.0E+02	2.3E-02
	RMSE	1.77		1.66		0.52		
	R <sup>2</sup>	0.57		0.71		0.96		
Isolado 4	Estimate	7.4E+01	1.3E-02	7.7E+01	2.5E-04	1.0E+02	6.4E+03	8.9E-02
	Std.	3.7E+00	3.1E-03	4.0E+00	5.6E-05	2.0E+00	1.2E+04	2.7E-02
	RMSE	2.23		2.15		0.71		
	R <sup>2</sup>	0.39		0.51		0.94		
5 Isolados	Estimate	7.6E+01	1.3E-02	7.9E+01	2.6E-04	1.0E+02	1.1E+03	1.3E-01
	Std.	3.4E+00	2.8E-03	3.7E+00	5.0E-05	1.4E+00	7.6E+02	2.0E-02
	RMSE	2.03		1.93		0.51		
	R <sup>2</sup>	0.49		0.61		0.97		
Isolado 14	Estimate	7.2E+01	1.2E-02	7.5E+01	2.5E-04	1.0E+02	4.9E+04	6.1E-02
	Std.	3.9E+00	3.3E-03	4.2E+00	6.1E-05	1.3E+00	1.2E+05	1.8E-02
	RMSE	2.32		2.23		0.48		
	R <sup>2</sup>	0.35		0.48		0.97		
Isolado 26	Estimate	7.7E+01	1.3E-02	8.0E+01	2.5E-04	1.0E+02	6.4E+02	1.6E-01
	Std.	3.4E+00	2.7E-03	3.6E+00	4.7E-05	1.7E+00	3.9E+02	2.6E-02
	RMSE	2.01		1.90		0.61		
	R <sup>2</sup>	0.49		0.64		0.95		
Isolado 28	Estimate	7.7E+01	1.2E-02	7.9E+01	2.3E-04	1.0E+02	1.7E+03	1.3E-01
	Std.	3.3E+00	2.6E-03	3.5E+00	4.4E-05	1.2E+00	1.1E+03	1.8E-02
	RMSE	1.94		1.85		0.43		
	R <sup>2</sup>	0.48		0.60		0.97		
Isolado 31	Estimate	7.6E+01	1.2E-02	7.9E+01	2.3E-04	1.0E+02	2.5E+03	1.2E-01
	Std.	3.4E+00	2.7E-03	3.6E+00	4.7E-05	1.7E+00	2.6E+03	2.4E-02
	RMSE	2.02		1.94		0.59		
	R <sup>2</sup>	0.45		0.56		0.95		

c0= Concentração inicial estimado pelo parâmetro; k= taxa de degradação; lambda= parâmetro de escala; beta= parâmetro de forma ou inclinação.

**Anexo VI.** Parâmetros dos modelos de pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem e Weibull ajustados para os dados de degradação do oxyfluorfen avaliados aos 3, 5, 10, 15, 20, 30 e 40 dias após a aplicação de 200 mg kg<sup>-1</sup> do herbicida no solo em diferentes tratamentos.

		Pseudo-primeira ordem		Pseudo-segunda ordem		Weibull		
		c0	k	c0	k	c0	lambda	beta
Controle	Estimate	1.6E+02	1.1E-02	1.6E+02	9.1E-05	2.0E+02	2.1E+03	1.6E-01
	Std.	5.6E+00	2.1E-03	5.9E+00	1.6E-05	2.5E+00	1.3E+03	2.0E-02
	RMSE	3.36		3.22		0.88		
	R <sup>2</sup>	0.52		0.61		0.96		
Isolado 4	Estimate	1.6E+02	1.1E-02	1.6E+02	9.1E-05	2.0E+02	2.1E+03	1.6E-01
	Std.	5.6E+00	2.1E-03	5.9E+00	1.6E-05	2.5E+00	1.3E+03	2.0E-02
	RMSE	3.36		3.22		0.88		
	R <sup>2</sup>	0.52		0.61		0.96		
5 Isolados	Estimate	1.5E+02	1.2E-02	1.6E+02	1.1E-04	2.0E+02	3.0E+03	1.2E-01
	Std.	6.5E+00	2.6E-03	6.9E+00	2.2E-05	1.9E+00	1.9E+03	1.4E-02
	RMSE	3.87		3.71		0.67		
	R <sup>2</sup>	0.46		0.58		0.98		
Isolado 14	Estimate	1.5E+02	1.2E-02	1.6E+02	1.2E-04	2.0E+02	2.6E+03	1.1E-01
	Std.	6.8E+00	2.8E-03	7.3E+00	2.4E-05	2.0E+00	1.7E+03	1.4E-02
	RMSE	4.08		3.90		0.71		
	R <sup>2</sup>	0.44		0.57		0.98		
Isolado 26	Estimate	1.5E+02	1.1E-02	1.6E+02	1.1E-04	2.0E+02	5.9E+03	1.0E-01
	Std.	7.0E+00	2.8E-03	7.5E+00	2.4E-05	3.8E+00	9.5E+03	2.7E-02
	RMSE	4.183714		4.03008		1.348477		
	R <sup>2</sup>	0.402465		0.515304		0.935951		
Isolado 28	Estimate	1.5E+02	1.1E-02	1.6E+02	9.6E-05	2.0E+02	1.6E+04	9.4E-02
	Std.	6.7E+00	2.6E-03	7.2E+00	2.2E-05	3.1E+00	2.6E+04	2.3E-02
	RMSE	4.06		3.93		1.10		
	R <sup>2</sup>	0.39		0.49		0.95		
Isolado 31	Estimate	1.5E+02	1.1E-02	1.6E+02	1.0E-04	2.0E+02	2.9E+03	1.3E-01
	Std.	6.3E+00	2.5E-03	6.7E+00	2.0E-05	3.1E+00	2.8E+03	2.4E-02
	RMSE	3.79		3.64		1.11		
	R <sup>2</sup>	0.46		0.57		0.95		

c0= Concentração inicial estimado pelo parâmetro; k= taxa de degradação; lambda= parâmetro de escala; beta= parâmetro de forma ou inclinação.

**Anexo VII.** Teste de hipótese usando a ANOVA para similaridade entre os parâmetros dos modelos Weibull para degradação do oxyfluorfen no tratamento controle e com a presença de isolados com a aplicação de 100 mg kg<sup>-1</sup> do herbicida.

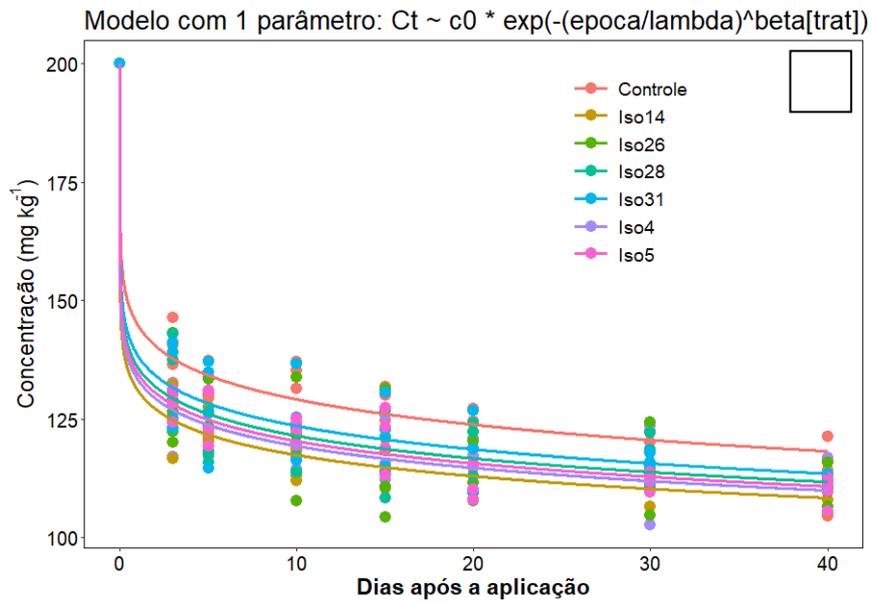
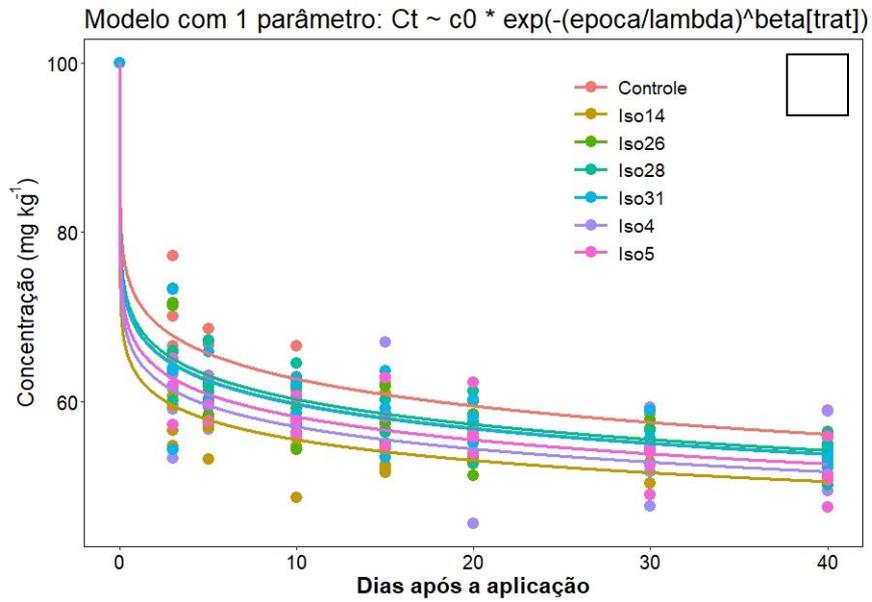
Todos parâmetros iguais entre os isolados e o controle						
Model 1: $\text{concd1} \sim c0[\text{trat}] * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda}[\text{trat}])^{\text{beta}[\text{trat}]})$						
Model 2: $\text{concd1} \sim c0 * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda})^{\text{beta}})$						
	Res.Df	Res.Sum.Sq	Df	Sum Sq	F value	Pr(>F)
1	203	2010.3				
2	221	2983.8	-18	-973.54	5.4616	2.35E-10 ***
Parâmetro lambda igual entre os isolados e o controle						
Model 1: $\text{concd1} \sim c0[\text{trat}] * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda}[\text{trat}])^{\text{beta}[\text{trat}]})$						
Model 2: $\text{concd1} \sim c0[\text{trat}] * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda})^{\text{beta}[\text{trat}]})$						
	Res.Df	Res.Sum.Sq	Df	Sum Sq	F value	Pr(>F)
1	203	2010.3				
2	209	2130.9	-6	-120.64	2.0304	0.06318 .
Parâmetro c0 igual entre os isolados e o controle						
Model 1: $\text{concd1} \sim c0[\text{trat}] * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda}[\text{trat}])^{\text{beta}[\text{trat}]})$						
Model 2: $\text{concd1} \sim c0 * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda}[\text{trat}])^{\text{beta}[\text{trat}]})$						
	Res.Df	Res.Sum.Sq	Df	Sum Sq	F value	Pr(>F)
1	203	2010.3				
2	209	2010.3	-6	-0.022962	4.00E-04	1
Parâmetro beta igual entre os isolados e o controle						
Model 1: $\text{concd1} \sim c0[\text{trat}] * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda}[\text{trat}])^{\text{beta}[\text{trat}]})$						
Model 2: $\text{concd1} \sim c0[\text{trat}] * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda}[\text{trat}])^{\text{beta}})$						
	Res.Df	Res.Sum.Sq	Df	Sum Sq	F value	Pr(>F)
1	203	2010.3				
2	209	2246	-6	-235.75	3.9677	0.0008923 ***
Parâmetro c0 e beta igual entre os isolados e o controle						
Model 1: $\text{concd1} \sim c0[\text{trat}] * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda}[\text{trat}])^{\text{beta}[\text{trat}]})$						
Model 2: $\text{concd1} \sim c0 * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda}[\text{trat}])^{\text{beta}})$						
	Res.Df	Res.Sum.Sq	Df	Sum Sq	F value	Pr(>F)
1	203	2010.3				
2	215	2252.9	-12	-242.59	2.0414	0.02241 *
Parâmetro lambda e beta igual entre os isolados e o controle						
Model 1: $\text{concd1} \sim c0[\text{trat}] * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda}[\text{trat}])^{\text{beta}[\text{trat}]})$						
Model 2: $\text{concd1} \sim c0[\text{trat}] * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda})^{\text{beta}})$						
	Res.Df	Res.Sum.Sq	Df	Sum Sq	F value	Pr(>F)
1	203	2010.3				
2	215	2414.1	-12	-403.77	3.3978	0.0001506 ***
Parâmetro c0 e lambda igual entre os isolados e o controle						
Model 1: $\text{concd1} \sim c0[\text{trat}] * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda}[\text{trat}])^{\text{beta}[\text{trat}]})$						
Model 2: $\text{concd1} \sim c0 * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda})^{\text{beta}[\text{trat}]})$						
	Res.Df	Res.Sum.Sq	Df	Sum Sq	F value	Pr(>F)
1	203	2010.3				
2	215	2132.2	-12	-121.89	1.0257	0.4265

Quando p-valor é maior que 0,05, os modelos e parâmetros são considerados similares. (\*), (\*\*), (\*\*\*) indicam que o teste foi significativo para um p-valor < 0.05, 0.01, 0.001.

**Anexo VIII.** Teste de hipótese usando a ANOVA para similaridade entre os parâmetros dos modelos Weibull para degradação do oxyfluorfen no tratamento controle e com a presença de isolados com a aplicação de 200 mg kg<sup>-1</sup> do herbicida.

Todos parâmetros iguais entre os isolados e o controle						
Model 1: $\text{concd1} \sim c0[\text{trat}] * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda}[\text{trat}])^{\text{beta}[\text{trat}]})$						
Model 2: $\text{concd1} \sim c0 * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda})^{\text{beta}})$						
	Res.Df	Res.Sum.Sq	Df	Sum Sq	F value	Pr(>F)
1	203	6248.9				
2	221	8855.3	-18	-2606.4	4.704	1.17E-08 ***
Parâmetro lambda igual entre os isolados e o controle						
Model 1: $\text{concd1} \sim c0[\text{trat}] * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda}[\text{trat}])^{\text{beta}[\text{trat}]})$						
Model 2: $\text{concd1} \sim c0[\text{trat}] * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda})^{\text{beta}[\text{trat}]})$						
	Res.Df	Res.Sum.Sq	Df	Sum Sq	F value	Pr(>F)
1	203	6248.9				
2	209	6460.8	-6	-211.9	1.1473	0.3363 .
Parâmetro c0 igual entre os isolados e o controle						
Model 1: $\text{concd1} \sim c0[\text{trat}] * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda}[\text{trat}])^{\text{beta}[\text{trat}]})$						
Model 2: $\text{concd1} \sim c0 * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda}[\text{trat}])^{\text{beta}[\text{trat}]})$						
	Res.Df	Res.Sum.Sq	Df	Sum Sq	F value	Pr(>F)
1	203	6248.9				
2	209	6248.9	-6	-0.01191	1.00E-04	1
Parâmetro beta igual entre os isolados e o controle						
Model 1: $\text{concd1} \sim c0[\text{trat}] * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda}[\text{trat}])^{\text{beta}[\text{trat}]})$						
Model 2: $\text{concd1} \sim c0[\text{trat}] * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda}[\text{trat}])^{\text{beta}})$						
	Res.Df	Res.Sum.Sq	Df	Sum Sq	F value	Pr(>F)
1	203	6248.9				
2	209	6580.6	-6	-331.68	1.7958	0.1015
Parâmetro c0 e beta igual entre os isolados e o controle						
Model 1: $\text{concd1} \sim c0[\text{trat}] * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda}[\text{trat}])^{\text{beta}[\text{trat}]})$						
Model 2: $\text{concd1} \sim c0 * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda}[\text{trat}])^{\text{beta}})$						
	Res.Df	Res.Sum.Sq	Df	Sum Sq	F value	Pr(>F)
1	203	6248.9				
2	215	6588.2	-12	-339.28	0.9185	0.5294
Parâmetro lambda e beta igual entre os isolados e o controle						
Model 1: $\text{concd1} \sim c0[\text{trat}] * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda}[\text{trat}])^{\text{beta}[\text{trat}]})$						
Model 2: $\text{concd1} \sim c0[\text{trat}] * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda})^{\text{beta}})$						
	Res.Df	Res.Sum.Sq	Df	Sum Sq	F value	Pr(>F)
1	203	6248.9				
2	215	7165.6	-12	-916.71	2.4817	0.004734 **
Parâmetro c0 e lambda igual entre os isolados e o controle						
Model 1: $\text{concd1} \sim c0[\text{trat}] * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda}[\text{trat}])^{\text{beta}[\text{trat}]})$						
Model 2: $\text{concd1} \sim c0 * \exp(-(\text{epoca}/\text{lambda})^{\text{beta}[\text{trat}]})$						
	Res.Df	Res.Sum.Sq	Df	Sum Sq	F value	Pr(>F)
1	203	6248.9				
2	215	6462	-12	-213.16	0.5771	0.8592

Quando p-valor é maior que 0,05, os modelos e parâmetros são considerados similares. (\*), (\*\*), (\*\*\*) indicam que o teste foi significativo para um p-valor < 0.05, 0.01, 0.001.



Modelo Weibull foi escolhido baseado nos resultados de ajuste de modelos mostrados em Anexos.

**Anexo IX.** Cinética de degradação para uma concentração inicial de 100 (A) e 200 (B) mg kg<sup>-1</sup> de oxyfluorfen no solo durante 40 dias após a aplicação do herbicida.