

Comissão 3.5 - Poluição, remediação do solo e recuperação de áreas degradadas

BIODEGRADAÇÃO DE GLIFOSATO PELA MICROBIOTA DE SOLOS CULTIVADOS COM MACIEIRA⁽¹⁾

Marília Scopel Andrighetti⁽²⁾, Gilmar Ribeiro Nachtigall⁽³⁾, Sonia Cláudia Nascimento de Queiroz⁽⁴⁾, Vera Lúcia Ferracini⁽⁴⁾ & Marco Antônio Záchia Ayub⁽²⁾

RESUMO

O glifosato é um herbicida sistêmico, pós-emergente, não seletivo do grupo dos organofosforados, sendo amplamente usado em pomares de macieira no sul do Brasil, podendo causar consequências negativas para microrganismos benéficos do solo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de biodegradação do glifosato pela microbiota de solos de pomares de macieira, com diferentes históricos de aplicação do produto. Para isso, amostras de solos da região de Vacaria, RS, foram utilizadas, cuja biodegradação do glifosato foi avaliada monitorando a liberação de CO₂ pelos microrganismos durante 32 dias, bem como quantificando os resíduos de glifosato e seu metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), no início e no final do período pela extração seguida de análise por cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados evidenciaram que houve degradação do glifosato pelos microrganismos edáficos durante o período avaliado com formação do metabólito AMPA. O glifosato diminuiu o número de bactérias do solo, porém favoreceu o aumento da atividade microbiana. As bactérias presentes nos solos com histórico de menor tempo de aplicação do herbicida apresentaram maior capacidade de degradação do produto, quando comparadas àquelas existentes em solos com maior período de aplicação de glifosato.

Termos de indexação: glifosato, biodegradação, herbicidas, AMPA, microrganismos.

⁽¹⁾ Recebido para publicação em 11 de julho de 2012 e aprovado em 17 de julho de 2014.

⁽²⁾ Estudante de Mestrado, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Caixa Postal 354. CEP 90050-170 Porto Alegre (RS). E-mail: marília.scopel@hotmail.com, mazayub@ufrgs.br

⁽³⁾ Pesquisador, Embrapa Uva e Vinho. Caixa Postal 1513. CEP 95200-000 Vacaria (RS). E-mail: gilmar@cnpuv.embrapa.br

⁽⁴⁾ Pesquisador, Embrapa Meio Ambiente. Caixa Postal 69. CEP 13820-000 Jaguariúna (SP). E-mail: sonia@cnpma.embrapa.br, vera@cnpma.embrapa.br

SUMMARY: BIODEGRADATION OF GLYPHOSATE BY MICROBIOTA OF SOILS OF APPLE TREE FIELDS

Glyphosate is a systemic post-emergent herbicide of the non-selective organophosphate group widely used in apple orchards in the South of Brazil. It may have adverse effects on beneficial soil microorganisms. The aim of this study was to evaluate the biodegradability of glyphosate by soil microbiota in apple orchards with different histories of application of the product. For that purpose, soil samples from the region of Vacaria, Rio Grande do Sul, were used, with the biodegradation of glyphosate being evaluated by monitoring the release of CO₂ by microorganisms over 32 days, as well as quantifying the residues of glyphosate and its metabolite, aminomethylphosphonic acid (AMPA), at the beginning and end of the period through extraction followed by analysis by high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that there was glyphosate degradation by soil microorganisms during the period evaluated, with formation of the metabolite AMPA. Glyphosate decreased the number of soil bacteria, but favored increased microbial activity. The bacteria present in soils with lower herbicide exposure showed more degradability of the product when compared to those found in soils with a greater period of glyphosate application.

Index terms: glyphosate, biodegradation, herbicide, AMPA, microorganisms.

INTRODUÇÃO

A produção de maçã concentrada na Região Sul do Brasil é responsável por 98,5 % da produção nacional; o principal Estado produtor é Santa Catarina com 20.930 ha, seguido do Rio Grande do Sul com 14.000 ha e Paraná com 2.000 ha. Em Santa Catarina, a produção de maçã está concentrada nas mesorregiões oeste catarinense e serrana, enquanto no Rio Grande do Sul, na mesorregião nordeste rio-grandense (Nachtigall, 2011). O uso de herbicidas para controle de plantas daninhas em pomares de macieira no sul do Brasil é uma técnica de uso generalizado e frequente, verificando-se, em determinadas situações de uso contínuo, a existência de resistência de gramíneas aos herbicidas aplicados ao pomar, como a constatação de resistência do azevém ao glifosato verificada por Vargas et al. (2005). Além disso, podem ocorrer efeitos nocivos sobre processos biológicos do solo e organismos não alvos. Ainda não existem informações regionais disponíveis sobre os efeitos do uso prolongado do glifosato em pomares de macieira, bem como sobre os efeitos potenciais desse nos microrganismos do solo da região.

O solo é composto por inúmeras associações microbianas, sendo considerado um sistema vivo, dinâmico, heterogêneo e em transformação. Essas associações são sensíveis a modificações químicas e físicas como adições de pesticidas ou de substâncias biologicamente ativas que podem interferir no equilíbrio microbiano (Moreira & Siqueira, 2006).

A degradação microbiana é o processo-chave que influencia na dinâmica do resíduo do pesticida no ambiente, incluindo a sua persistência no solo e a sua susceptibilidade de lixiviação (Tejada, 2009). O uso intensivo de herbicidas tornou-se uma questão de preocupação ambiental por causa dos efeitos perigosos desses produtos químicos sobre os processos biológicos do solo e dos organismos não alvos (Zabaloy et al., 2008).

O termo biodegradação refere-se à degradação microbiológica direta ou indireta de um composto orgânico, sendo considerada a principal via de deterioração desses produtos no solo (Prata, 2002). Os microrganismos utilizam esse composto como substrato pela ação de suas enzimas e podem ainda transformá-lo em nutrientes e energia para a sobrevivência deles (Maier, 2000). A completa biodegradação ou mineralização envolve a oxidação dos compostos intermediários, que podem ser mais ou menos tóxicos que o composto inicial, em moléculas mais simples como água, CO₂, entre outras (Spadotto et al., 2004). O catabolismo e o metabolismo microbianos são os principais meios de mineralização (Zabaloy et al., 2008; Tarouco, 2009). Segundo Zobiole et al. (2010), repetidas aplicações de glifosato podem interferir nas bactérias da rizosfera de soja como *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Bradyrhizobium*, prejudicando o crescimento delas.

A rota de degradação de glifosato mais comum envolve a conversão de glifosato a ácido aminometilfosfônico (AMPA) como principal metabólito, pela ação de enzimas como as oxidoredutases e transaminases e do ácido glioxílico, que clivam a molécula do glifosato em ligações diferentes daquela existente entre C e P, assim essa ligação é conservada (Obojska, et al., 2002; Tejada, 2009).

Em decorrência da ampla utilização do glifosato, muitos estudiosos desenvolveram métodos de extração e análise desse composto, que permitem a detecção e quantificação deles em amostras ambientais (Tarouco, 2009). Muitos dos métodos relatados na literatura para determinar e separar o glifosato são cromatográficos. A técnica mais utilizada para detectar o glifosato é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), porém, pela ausência de cromatóforos, é necessária a derivação do composto para produção de compostos que interajam com radiação eletromagnética, aplicando-se radiação colorimétrica por UV ou detecção fluorimétrica (Jan

et al., 2009). Essa técnica apresenta vantagens importantes como pequenos coeficientes de variação, recuperações e limites de detecção adequados (Amarante & Santos, 2002).

Dentro desse contexto, este trabalho objetivou avaliar a biodegradação de glifosato pela microbiota de solos cultivados com macieira com diferentes históricos de aplicação do herbicida.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado com amostras de solo de pomares de macieira, em Vacaria, RS (28° 30' 00" S, 50° 42' 21" W e 955 m de altitude), onde predominam solos classificados pela Embrapa (1999) como Latossolo Bruno aluminico câmbico. O clima da região é temperado, segundo classificação de Köppen (Cfb 1), com temperatura média anual de 14,4 °C e precipitação pluvial média anual de 2.468 mm. As amostras de solo foram coletadas em pomares de macieira de três propriedades particulares e na Estação Experimental de Fruticultura de Clima Temperado da Embrapa Uva e Vinho. As características físico-químicas de todos os solos coletados estão apresentadas no quadro 1. Na propriedade 1, foram realizadas coletas em área com histórico de um ano de aplicação do glifosato, que corresponde ao solo 1. Na propriedade 2, as coletas foram feitas em solo com histórico de sete anos de uso do herbicida (solo 2). Já na propriedade 3, as coletas foram realizadas em áreas com 15 anos (solo 3) e 23 anos (solo 4) de uso do herbicida. Na área da Embrapa,

as amostras foram coletadas em uma área com histórico de 29 anos de uso de glifosato (solo 5) e em um pomar orgânico sem aplicação do herbicida (solo 6), que constituiu a amostra-controle (Quadro 2).

Em cada área, foram coletadas amostras de solos, na profundidade de 0-10 cm, nas linhas de plantas nos pomares, local de aplicação do herbicida, em 10 pontos diferentes para cada solo coletado. As amostras dos solos foram secas à temperatura ambiente, sendo em seguida peneiradas em malhas de 2 mm. Subamostras de 10 g de solo foram secas em estufa à temperatura de 105 °C por 24 h. A umidade do solo das amostras foi determinada pelas diferenças dos pesos dos solos antes e após a secagem em estufa. O valor da capacidade de campo, para todas as amostras de solo utilizadas para correção da umidade do solo no experimento de biodegradação, foi de 0,43 cm³ cm⁻³ (Conceição et al., 2010).

O herbicida utilizado foi o glifosato em sua fórmula comercial (Roundup WG®, Monsanto, Brasil), na dose recomendada para a cultura da maçã (3,5 kg ha⁻¹), correspondendo a 720 g de ingrediente ativo, de modo que a quantidade aplicada de ingrediente ativo do herbicida nas amostras de solo foi de 2,52 mg kg⁻¹ de glifosato.

O método utilizado para avaliar a biodegradação do glifosato foi descrito por Bartha & Pramer (1965), que quantifica o dióxido de carbono (CO₂) desprendido na respiração microbiana do solo. Para isso, a dose de glifosato foi aplicada de modo uniforme às amostras de solo, mantidas em sacos plásticos, de onde alíquotas de 200 g de cada amostra de solo foram retiradas e

Quadro 1. Composição físico-química das amostras de solo coletadas nas propriedades e histórico de aplicação (em parênteses)

Atributo	Propriedade					
	1 (1 ano)	2 (7 anos)	3 (15 anos)	3 (23 anos)	4 (29 anos)	PO ⁽¹⁾
Argila (%)	46	34	48	39	53	56
pH(H ₂ O) (1:1)	6.3	5.8	5.8	6.4	4.9	6.0
Índice SMP	6.8	6.0	6.0	6.7	6.0	6.3
P (mg dm ⁻³)	55	15	12	18	13	57
K (mg dm ⁻³)	256	249	284	321	171	218
S (mg dm ⁻³)	22	13	18	13	25	14
Zn (mg dm ⁻³)	23	9.1	26	35	8.0	12
Cu (mg dm ⁻³)	13	8.2	19	28	24	17
B (mg dm ⁻³)	3.5	3.0	2.2	2.5	1.4	2.9
Mn (mg dm ⁻³)	13	28	41	30	136	27
MO ⁽²⁾ (%)	4.6	4.1	5.0	5.2	4.7	5.5
Al ³⁺ (cmol _c dm ⁻³)	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	0.0
Ca ²⁺ (cmol _c dm ⁻³)	17.4	8.8	10.6	18.4	4.5	14.2
Mg ²⁺ (cmol _c dm ⁻³)	8.2	3.8	2.9	3.4	1.8	4.0
H+Al (cmol _c dm ⁻³)	1.7	4.4	4.4	2.0	4.4	3.1
CTC (cmol _c dm ⁻³)	28.0	17.6	18.7	24.6	11.3	21.9

⁽¹⁾ PO: pomar orgânico Embrapa (sem histórico de aplicação). ⁽²⁾ MO: matéria orgânica.

Quadro 2. Histórico de aplicação do glifosato nos solos estudados

Propriedade	Histórico de aplicação	Quantidade aplicada	Época de aplicação
1	1 ano - solo 1	6 L ha ⁻¹	jan/2010
2	7 anos - solo 2	6 L ha ⁻¹	jan/2010
3	15 anos - solo 3	6 L ha ⁻¹	jan/2010
3	23 anos - solo 4	6 L ha ⁻¹	jan/2010
4	29 anos - solo 5	6 L ha ⁻¹	jan/2010
4	Sem histórico - solo 6	-	-

aconditionadas em frascos herméticos. A umidade dessas alíquotas foi ajustada para 70 % da capacidade de campo do solo. Copos plásticos de 50 mL, contendo 20 mL de NaOH 0,5 mol L⁻¹, foram colocados nos frascos e incubados por 48 h a 28 °C. Após a incubação, os copos foram retirados dos frascos e acrescidos de 3 mL de uma solução de BaCl₂, fração mássica 30 %, três a quatro gotas de fenolftaleína, sendo a concentração de NaOH restante na amostra titulada com HCl 0,5 mol L⁻¹. Frascos contendo solo sem aplicação de herbicida foram utilizados como testemunha. O mesmo procedimento foi utilizado para frascos sem adição de solo (branco), para determinar a quantidade de CO₂ desprendido em razão da atividade microbiana.

A quantificação do CO₂ desprendido foi realizada nos períodos de 2, 4, 8, 16, 24 e 32 dias após a incubação do solo, realizando a abertura do frasco hermético e retirando-se o copo plástico contendo NaOH 0,5 mol L⁻¹ para ser titulado em cada período descrito anteriormente. A quantificação do CO₂ foi calculada pela seguinte fórmula (IBAMA, 1990):

$$\mu\text{g C-CO}_2 = [(\text{mL HCl}_{\text{gasto}} \text{ branco}) - (\text{mL HCl}_{\text{gasto}} \text{ tratamento})] \times M \times 22 \quad (1)$$

em que M é a molaridade do HCl, determinada a cada coleta por titulação com NaOH 0,5 mol L⁻¹.

Para definir a comunidade bacteriana do solo, foi utilizada a técnica de contagem de colônias bacterianas viáveis. Foi pesado 1 g de cada amostra de solo e adicionado em *erlenmeyer* (50 mL), contendo 9 mL de água estéril e submetido à agitação de 200g por 30 min, à temperatura ambiente. Uma alíquota de 1 mL foi retirada da suspensão bacteriana de cada amostra e colocada em tubos de ensaio e adicionados 9 mL de solução salina (fração mássica) 0,9 %. Esse procedimento foi repetido até obter as diluições 10⁻³ a 10⁻⁷ e plaqueadas em meio ágar nutriente (AN) (contendo, em g L⁻¹, peptona 5, extrato de carne 3, ágar 15) em triplicata, vedadas e incubadas por 48 h a 28 °C. Após este período, foram feitas observações da presença de unidades formadoras de colônia (UFC). O número de bactérias foi avaliado no início (zero), aos 16 dias e ao final da incubação do solo (32 dias).

A atividade microbiana foi avaliada de acordo com a técnica de hidrólise de diacetato de fluoresceína

(FDA), em que esse substrato foi hidrolisado principalmente por esterases, lipases e desidrogenases (Schnürer & Rosswall, 1982). Assim, subamostras de 1 g de solo foram retiradas dos frascos herméticos, onde esses solos estavam incubados, em cada tempo avaliado, e acondicionadas em tubos de centrífuga; nesses, foram adicionados 20 mL de tampão fosfato de sódio 60 mmol L⁻¹, em triplicata. Esses tubos foram incubados sob agitação a 180g e 28 °C, durante 15 min. Após esse período, 100 µL de solução-estoque de FDA foram adicionados a todos os frascos, com exceção dos controles, e incubados novamente por 105 min a 28 °C e 180g. A reação enzimática foi finalizada pela adição de 20 mL de acetona, centrifugada por 5 min a 6.000g; filtrou-se o sobrenadante em papel-filtro Whatman nº 4. As soluções resultantes da filtração foram avaliadas em espectrofotômetro (490 nm). A atividade microbiana foi determinada pela quantidade de FDA hidrolisado, com auxílio das curvas-padrão obtidas de cada amostra. Para definir a curva-padrão, foram utilizadas as seguintes concentrações de fluoresceína: 0,25; 0,75; 2,0; 3,74; e 7,48 µg mL⁻¹. A atividade microbiana foi avaliada nos tempos 0, 17 e 32 dias de incubação do solo, para acompanhar o comportamento dos microrganismos na presença da molécula herbicida durante todo o período de incubação.

As concentrações de glifosato e AMPA nos experimentos de degradação foram avaliadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para isso, amostras de solo retiradas do experimento de incubação aos 0 e 32 dias (triplicatas) foram secas a 40 °C por 48 h e trituradas; 20 g dessas amostras foram colocadas em tubos de centrífuga de 250 mL e acrescentados 80 mL de solução 0,25 mol L⁻¹ de NH₄OH e 0,1 mol L⁻¹ de KH₂PO₄. Os frascos foram agitados em incubadoras durante 90 min, a 65 rpm, e centrifugados por 20 min a 3.000g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de centrífuga, sendo efetuada uma segunda extração do resíduo sólido com 80 mL da solução 0,25 mol L⁻¹ de NH₄OH e 0,1 mol L⁻¹ de KH₂PO₄. O pH do sobrenadante foi ajustado para 2 com HCl 6 mol L⁻¹, e centrifugados novamente por 10 min a 2.500g. O sobrenadante foi transferido para um balão de fundo redondo de 500 mL, com auxílio de um funil analítico contendo lã de vidro. Esse procedimento foi repetido para o sobrenadante da

segunda extração no tubo de centrífuga. O volume foi reduzido em aproximadamente 5 mL sob vácuo, numa temperatura de 60 °C. O extrato obtido foi transferido para um tubo de centrífuga de 50 mL com lavagens de HCl 0,01 mol L⁻¹. O pH do extrato do solo foi ajustado para 1,8-2,0 com NH₄OH concentrado e centrifugado a 4.000g por 10 min. O sobrenadante foi passado para um tubo graduado, e o volume ajustado para aproximadamente 10 mL com HCl 0,01 mol L⁻¹.

Foi introduzida na coluna cromatográfica uma pasta preparada com 50 g de resina AG 50-W e HCl 0,01 mol L⁻¹, sem deixar secar. A coluna foi condicionada com mais 200 mL de HCl 0,01 mol L⁻¹ a um fluxo de 2,5 mL min⁻¹.

Para evitar perda de glifosato por saturação da coluna, foram transferidos 5 mL do extrato de solo para a coluna. Em todas as etapas, o fluxo utilizado foi de 2,5 mL min⁻¹. A coluna foi lavada com porções de 5 mL de HCl 0,01 mol L⁻¹, totalizando um volume de 45 mL, desprezando o eluído. A amostra eluída foi recolhida em um balão de fundo redondo de 500 mL e adicionadas cinco porções de 55 mL de HCl 0,01 mol L⁻¹ (total 275 mL).

Após, foi evaporada à secura em evaporador rotatório a vácuo com banho mantido a 60 °C. O resíduo de glifosato e AMPA foi redissolvido em fase móvel (0,005 mol L⁻¹ de KH₂PO₄, 4 % metanol, pH ajustado para 2,1 com ácido fosfórico) e transferido para um tubo concentrador de 5 mL. A solução foi filtrada em membrana Millipore de 0,45 µm e analisada por CLAE com detector de fluorescência.

Para determinar o glifosato, foi necessária uma reação pós-coluna para glicina a 38 °C, seguida de derivatização com o-ftalaldialdeído e β-mercaptoetanol (OPA-MERC), num espiral de aço inoxidável (2 × 0,2 mm de diâmetro interno). Hipoclorito de cálcio contendo 0,02 g de Ca(ClO)₂, 1,36 g de KH₂PO₄, 11,6 g de NaCl e 0,4 g de NaOH dissolvido em 1 L de água deionizada foi o reagente oxidante.

O reagente OPA-MERC consistiu de 800 mg de o-ftalaldialdeído dissolvidos em 10 mL de metanol, 2 mL de β-mercaptoetanol e 25 g de ácido bórico dissolvido em 1 L de água deionizada. Duas bombas peristálticas foram usadas para obter um fluxo de 0,2 mL min⁻¹ para a solução oxidante e 0,5 mL min⁻¹ para solução de OPA.

Utilizou-se detector de fluorescência com comprimento de onda de excitação de 350 nm e de emissão de 440 nm para a detectar o glifosato e AMPA.

Os dados foram submetidos à análise de variância (p≤0,05). Em caso de significância, os fatores avaliados foram analisados por meio de comparação de médias pelo teste de Tukey (p≤0,05), pelo teste t (p≤0,05) (fatores qualitativos) e pela regressão (p≤0,05) (fatores quantitativos). O programa estatístico utilizado foi *Winstat*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise dos resultados da biodegradação do glifosato, percebeu-se que houve interação entre os fatores testados. Para a relação de tempo de incubação, os dados foram comparados por análise de regressão (Figura 1, Quadro 3); e, para a comparação da presença ou ausência de glifosato entre solos, utilizaram-se o teste de Tukey e o teste t (Quadro 4). Nos resultados obtidos por meio da liberação de CO₂ pelos microrganismos do solo, observou-se incremento da liberação desse gás em todos os solos analisados com o passar do tempo de incubação, independentemente da aplicação ou não de glifosato (Figura 1, Quadro 4). Em geral, houve maior liberação de CO₂ nos solos que receberam aplicação de glifosato, independentemente do tempo de incubação, do que nos que não receberam aplicação, evidenciando que o produto pode ser metabolizado pelos microrganismos edáficos. O solo com menor histórico de aplicação de glifosato (um ano) e o sem histórico de uso do produto apresentaram, de forma geral, a maior liberação de CO₂ (Figuras 1, Quadro 4). Esses resultados sugeriram que a microbiota do solo pode utilizar o glifosato como fonte de C, ocasionando incremento na respiração microbiana, medida pelo desprendimento de CO₂ dos solos analisados. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Araújo (2002), em seu estudo sobre biodegradação de glifosato em diferentes tipos de solos brasileiros com e sem histórico de aplicação do herbicida, que observou quantidades de CO₂ liberados por solos com aplicação de glifosato variando de 15 a 30 % superiores do que

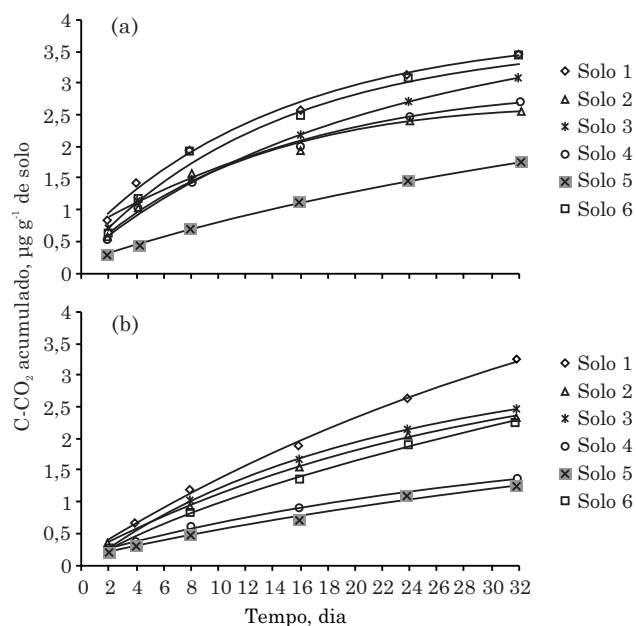


Figura 1. Liberação de CO₂ acumulado nas amostras dos solos com adição de 2,52 mg kg⁻¹ de glifosato (a) e sem adição de glifosato (b) ao longo de 32 dias de incubação, a 28±2 °C, no escuro.

nos solos-controle. A produção de CO₂ está diretamente relacionada com a decomposição do herbicida no solo (Wardle & Parkinson, 1990).

Para a análise dos resultados da respiração microbiana, representada pela liberação de CO₂ pelos microrganismos do solo, considerou-se que todo o CO₂ liberado foi proveniente da degradação do glifosato, já que foram subtraídas as quantidades liberadas de CO₂ provenientes do material orgânico do solo. Pode-

se observar que a maior degradação de glifosato ocorreu entre o 8º e o 16º dia de incubação para os solos com os menores históricos de aplicação do herbicida (um e sete anos) e para aquele sem histórico de uso; e, no 32º dia, para os demais solos estudados, com dados variando de 50 a 77 % (Figura 1, Quadro 4). Esses dados podem indicar que a atividade microbiana é alterada em razão do tempo de contato do herbicida no solo. Souza (1994) verificou que o glifosato sofre rápida decomposição inicial e que cerca de oito a 10 dias após a incubação do solo há uma estabilização na respiração microbiana, sugerindo que a partir desse período a degradação dele é baixa, porém contínua. Sendo o glifosato fortemente adsorvido pelos constituintes do solo, sua degradação é mais rápida logo após sua aplicação, pois os microrganismos edáficos conseguem usufruir somente a fração do herbicida que está disponível para degradação.

Considerando apenas os solos que receberam aplicações do herbicida, verificou-se, no final do período de incubação avaliado (32 dias), que, em geral, a taxa de liberação de CO₂ foi menor nas amostras provenientes de solos com maior tempo de aplicação do herbicida (Figuras 1, Quadro 4). Esses resultados podem indicar que o glifosato quando utilizado por longo período sobre o mesmo solo pode causar efeitos adversos à microbiota do solo. Acredita-se que a composição desses solos pode ter correlação com a degradação do glifosato pela microbiota do solo. Os resultados da análise físico-química do solo com o maior histórico de aplicação de glifosato (29 anos) (Quadro 1) evidenciaram quantidade considerável de argila na

Quadro 3. Equações da liberação de CO₂ acumulado nas amostras dos solos sem e com a adição de 2,52 mg kg⁻¹ de glifosato ao longo de 32 dias de incubação, a 28±2 °C, no escuro

Solo	Equação	R ²
Sem glifosato		
1	$\hat{y} = 0,16 + 0,12 x + 0,00094 x^2$	0,99
2	$\hat{y} = 0,15 + 0,11 x + 0,0012 x^2$	0,99
3	$\hat{y} = 0,021 + 0,13 x + 0,0017 x^2$	0,99
4	$\hat{y} = 0,15 + 0,056 x + 0,00061 x^2$	0,99
5	$\hat{y} = 0,14 + 0,043 x + 0,00024 x^2$	0,98
6	$\hat{y} = 0,14 + 0,089 x + 0,00068 x^2$	0,99
Com glifosato (2,52 mg kg ⁻¹)		
1	$\hat{y} = 0,67 + 0,16 x + 0,0024 x^2$	0,98
2	$\hat{y} = 0,44 + 0,13 x + 0,0021 x^2$	0,97
3	$\hat{y} = 0,67 + 0,11 x + 0,0011 x^2$	0,98
4	$\hat{y} = 0,40 + 0,14 x + 0,0020 x^2$	0,98
5	$\hat{y} = 0,19 + 0,067 x + 0,00058 x^2$	0,99
6	$\hat{y} = 0,46 + 0,17 x + 0,0025 x^2$	0,99

Quadro 4. Dióxido de carbono liberado por microrganismos do solo nas amostras de solo coletadas por causa da biodegradação do glifosato, em razão da presença e ausência de glifosato

Solo	Glifosato	Tempo (dia)					
		2	4	8	16	24	32
μg g ⁻¹ de C-CO ₂							
1	Presença	0,82* A	1,42* A	1,97* A	2,59* A	3,16* A	3,48 ^{ns} A
	Ausência	0,36 a	0,65 a	1,19 a	1,87 a	2,60 a	3,21 a
2	Presença	0,54* C	1,01* C	1,57* B	1,91* C	2,41* B	2,61 ^{ns} B
	Ausência	0,35 ab	0,57 a	0,91 ab	1,50 ab	2,05 b	2,28 b
3	Presença	0,72* AB	1,29* AB	1,50* B	2,13* BC	2,68* AB	3,11* AB
	Ausência	0,23 c	0,50 ab	1,04 a	1,60 ab	2,13 ab	2,44 b
4	Presença	0,53* C	0,99* C	1,50* B	1,97* C	2,47* B	2,71* B
	Ausência	0,24 bc	0,35 b	0,62 bc	0,87 c	1,13 c	1,34 c
5	Presença	0,31* D	0,43 ^{ns} D	0,73 ^{ns} C	1,09* D	1,47* C	1,75* C
	Ausência	0,21 c	0,32 b	0,50 c	0,67 c	1,11 c	1,23 c
6	Presença	0,64* BC	1,17* BC	1,84* AB	2,43* AB	3,02* A	3,36* A
	Ausência	0,28 abc	0,50 ab	0,86 abc	1,31 b	1,92 b	2,27 b
CV (%) ⁽¹⁾		10,45					

Médias seguidas de letras idênticas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p≤0,05); as maiúsculas e minúsculas comparam solos na presença e ausência de glifosato, respectivamente, na coluna. * significativo e ^{ns} não significativo pelo teste t (p≤0,05), na comparação de presença de glifosato e controle, dentro de cada solo. ⁽¹⁾ CV: coeficiente de variação.

sua composição, o que pode causar adsorção da molécula herbicida e, conseqüentemente, diminuir a sua disponibilidade aos microrganismos do solo. Observou-se o menor valor de pH em água tornando a solução desse solo ácida, o que influencia a disponibilidade e toxicidade de determinados elementos minerais como Mn e Al, podendo prejudicar a microbiota do solo (Leite & Araújo, 2007). Segundo Moreira & Siqueira (2006), Al e Mn atingem níveis tóxicos em valores de pH menores que 5,0 e estão menos disponíveis em valores altos ou baixos de pH. Esses autores ainda afirmaram que fungos são mais adaptados a valores de pH menores que 5,0 e bactérias a valores de pH entre 6 e 8. Para Moraes Neto (2009), íons Al na solução do solo contribuem para a acidez do solo pela sua tendência hidrolisante, em que nessa reação entre o Al e a água ocorre a liberação de hidrogênio (H^+). Os íons H^+ , assim liberados, possibilitam um valor de pH muito baixo na solução do solo. A acidez do solo e as condições fisiológicas que a acompanham resultam da deficiência de cátions metálicos adsorvidos (especialmente Ca, Mg e K) em relação ao H^+ . Esperava-se que a microbiota desses solos tivesse grande afinidade à molécula do herbicida, proporcionando a sua maior degradação.

Tejada (2009) realizou um trabalho para estudar a degradação e os efeitos sobre as propriedades biológicas, em laboratório, em dois solos após a adição de glifosato, diflufenican e glifosato e diflufenican. Os resultados apresentaram que a degradação do glifosato ocorre em um curto período de tempo e que o alto teor de argila aumenta o período de degradação do glifosato, possivelmente em razão do processo de adsorção dessa molécula orgânica com íons metálicos.

Gomez et al. (2008), avaliando o efeito de doses crescentes de glifosato sobre a biomassa, atividade metabólica e quociente metabólico da microbiota do solo sob condições contraladas, obtiveram como resultado das análises da taxa diária de respiração microbiana do solo diferenças significativas ao longo do tempo; porém, nenhuma diferença foi encontrada entre as diferentes doses de glifosato utilizadas no experimento.

Para as variáveis UFC e atividade microbiana, houve interação entre os fatores testados. A comparação entre solos e dias foi avaliada pelo teste de Tukey; e a presença e ausência de glifosato, pelo teste t (Quadro 5). De forma geral, notou-se que nos solos que receberam aplicação do herbicida, a quantidade de bactérias diminuiu no decorrer do período de incubação (Quadro 5). Pelo histórico de aplicação do produto e por acreditar que as bactérias presentes estavam adaptadas ao herbicida, esperou-se que a quantidade de bactérias nos solos com longo histórico de aplicação aumentasse. Somente o solo com maior histórico de aplicação do glifosato (29 anos) manteve a quantidade de bactérias constante, porém não aumentou o número de UFC. A maioria dos

resultados apresentou que o glifosato pode exercer efeito negativo às bactérias do solo.

Araújo (2002) não observou efeitos adversos na quantidade de bactérias em solos com histórico de aplicação durante o período de incubação nesses. Nos resultados de Castro Júnior et al. (2006), a adição de glifosato ao solo não exerceu efeito negativo na população de bactérias.

Observando os resultados das amostras analisadas no decorrer do período de incubação, notou-se que ocorreu aumento significativo da atividade microbiana analisada pela técnica FDA para a maioria dos solos analisados (Quadro 6). Os solos que receberam aplicação de glifosato antes da incubação evidenciaram atividade microbiana maior do que os solos sem aplicação, com exceção dos solos 1 e 4 que apresentaram diferença estatística entre o ensaio e o controle apenas no 17º dia de incubação. A partir desses resultados, supõe-se que o glifosato pode ter sido utilizado pelos microrganismos do solo como fonte de nutrientes.

O único solo em que os valores da atividade microbiana, obtidos ao longo do período de incubação, não diferiram estatisticamente foi o com histórico de sete anos de aplicação do glifosato e que não recebeu o herbicida antes da incubação (Quadro 6). O resultado evidenciou que o glifosato pode causar acréscimo considerável na atividade microbiana de solos que começaram a receber aplicações do herbicida recentemente. Esse resultado pode estar relacionado com o fato de a molécula ser utilizada como nova fonte de C pela comunidade microbiana do solo, sendo, portanto, degradada. As características físico-químicas desse solo também podem influenciar na atividade de microrganismos edáficos. O solo sem histórico de aplicação do herbicida e que também não foi contaminado com glifosato antes da incubação apresentou maior atividade aos 17 dias de incubação, decrescendo no final do período de incubação. Esse solo é rico em matéria orgânica, por causa da grande quantidade de cobertura vegetal presente, servindo como fonte de nutrientes para os microrganismos, o que pode explicar moderada atividade no início do período de incubação. Os microrganismos desse solo não utilizam a molécula de imediato e passam a utilizá-la ao longo do experimento; por isso, verificou-se alta atividade depois de 17 dias de incubação. Após a molécula de glifosato ter sido utilizada como fonte de C pelos microrganismos desse solo, notou-se decréscimo na atividade deles.

Esses resultados corroboraram os dados obtidos no experimento de biodegradação de glifosato, onde a liberação de CO_2 foi superior nos solos com aplicação do produto antes do período de incubação, quando comparado com solo sem aplicação. Os resultados da atividade microbiana dos solos utilizados nos ensaios de biodegradação são apresentados no quadro 6. Os solos com aplicação do herbicida antes da incubação

Quadro 5. Número de unidades formadoras de colônia (UFC) nas amostras dos solos avaliados em diferentes períodos de incubação. Média de três repetições

Solo	Tempo de incubação		
	2 dias	16 dias	32 dias
	UFC g ⁻¹ solo		
1	$2,2 \times 10^2$ *Ab	$1,1 \times 10^2$ B*b	$3,5 \times 10^1$ C ^{ns} ab
Controle	$5,0 \times 10^1$ Ac	$5,8 \times 10^1$ Aa	$1,9 \times 10^1$ Bb
2	$1,0 \times 10^2$ A*c	$3,4 \times 10^1$ B ^{ns} c	$3,6 \times 10^1$ B ^{ns} ab
Controle	$5,3 \times 10^1$ ABc	$7,0 \times 10^1$ Aa	$2,6 \times 10^1$ Bb
3	$1,0 \times 10^2$ A*c	$4,7 \times 10^1$ B*c	$3,7 \times 10^1$ B ^{ns} ab
Controle	$8,2 \times 10^1$ Ac	$1,9 \times 10^1$ Ab	$2,0 \times 10^1$ Ab
4	$3,4 \times 10^2$ A*a	$2,1 \times 10^2$ A*a	$3,5 \times 10^1$ B ^{ns} ab
Controle	$1,0 \times 10^2$ Ab	$4,3 \times 10^1$ Bab	$2,6 \times 10^1$ Bb
5	$6,6 \times 10^1$ A ^{ns} d	$3,4 \times 10^1$ B ^{ns} c	$4,1 \times 10^1$ AB ^{ns} ab
Controle	$4,9 \times 10^1$ Ac	$4,4 \times 10^1$ Aa	$2,8 \times 10^1$ Ab
6	$1,3 \times 10^2$ *Ac	$9,3 \times 10^1$ B*b	$6,9 \times 10^1$ B ^{ns} a
Controle	$1,7 \times 10^2$ Aa	$6,2 \times 10^1$ Ba	$7,8 \times 10^1$ Ba
CV (%) ⁽¹⁾		19,50	

Médias seguidas de letras idênticas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As letras maiúsculas comparam dias, na linha, e as minúsculas comparam solos, na coluna, para presença de glifosato e controle; * e ^{ns}: significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste t ($p \leq 0,05$) na comparação de presença de glifosato e controle. ⁽¹⁾ CV: coeficiente de variação.

evidenciaram valores significativamente superiores, para a maioria dos solos, aos valores encontrados em seus controles ao final de 32 dias de incubação. Porém, esses diferem quanto ao histórico de aplicação, pois os resultados de liberação de CO₂ demonstraram que solos com menor histórico de uso do produto apresentaram maior liberação; nos ensaios de atividade microbiana exibiram maior atividade em solos com maior histórico de uso do herbicida. Talvez porque a microbiota nos solos com longo contato com a molécula herbicida estejam constantemente utilizando-a como fonte de C.

As atividades enzimáticas microbianas são consideradas indicadores sensíveis a mudanças no ambiente, causadas por fatores naturais ou induzidos pelo homem. As desidrogenases são associadas às células viáveis e podem fornecer informações sobre o estado fisiológico dos microrganismos. Foi demonstrado que a atividade da desidrogenase aumentou como um resultado da aplicação de glifosato no solo no início da incubação, independentemente das doses de glifosato (Gomez et al., 2008). Entretanto, a atividade microbiana influencia o comportamento do herbicida no solo. Para Haney et al. (2000), a aplicação de glifosato no solo aumenta a biomassa microbiana e a atividade enzimática do solo. Zabaloy et al. (2008) observaram aumento temporário na atividade enzimática (FDA) da comunidade bacteriana do solo, duas semanas depois da adição do glifosato. Esses autores detectaram mínima mudança na diversidade metabólica da cultura bacteriana e nenhum efeito sobre substrato, em razão das aplicações de glifosato no longo prazo. Como resultado de exposição prévia

da comunidade microbiana nesses solos, a mesma pode ter se adaptado rapidamente às taxas de entrada do herbicida. Segundo os autores, todos os resultados do estudo evidenciaram claramente que os herbicidas exercem poucos efeitos na microbiota do solo, em doses 10 vezes maiores que a recomendada para campo. Araújo et al. (2003) observaram efeitos positivos em curto e longo prazos do glifosato (2,16 mg kg⁻¹) sobre a atividade microbiana, pelo aumento da atividade FDA nos solos. Muitos estudos demonstraram que a atividade da desidrogenase aumenta no solo quando o teor de AMPA aumenta (Tejada, 2009). Andréa et al. (2003) utilizaram a formulação comercial e relataram que, após repetidas aplicações de glifosato (Nortox®), a biomineralização desse diminuiu, indicando decréscimo na atividade microbiana.

A concentração de glifosato e AMPA variou entre os solos testados; dessa forma, esses foram comparados pelo teste de Tukey (Quadro 7). Os resultados obtidos neste trabalho, após o período de incubação de 32 dias, apresentaram que a quantidade de glifosato diminuiu no solo. A maior taxa de degradação foi observada no solo 1, onde 98,5 % do glifosato foi degradado pelos microrganismos, enquanto a menor quantidade de glifosato degradada foi observada no solo 5, com 51,8 % (Quadro 7).

O metabólito AMPA foi encontrado nas amostras de solo ao término da incubação demonstrando ser o principal produto da degradação de glifosato (Quadro 7). A maior concentração de AMPA, após 32 dias de incubação, foi encontrada no solo 2 (52 vezes maior do

que no início da incubação) e a menor, no solo 6 (1 vez maior). Esses resultados estão em conformidade com aqueles obtidos nos experimentos de biodegradação de glifosato por avaliação da liberação de CO₂ e atividade

microbiana, em que se observou a diminuição do glifosato ao longo de 32 dias de incubação, evidenciando que a microbiota presente nesses solos é capaz de degradar o herbicida.

Quadro 6. Atividade microbiana das amostras de solos estudadas ao longo de 32 dias de incubação, na presença e ausência de glifosato

Solo	Glifosato	Tempo de incubação		
		1 dia	17 dias	32 dias
1	Presença	0,94 ^{ns} Ce	1,36* Bd	5,86 ^{ns} Ab
	Ausência	0,83 Bc	0,96 Bd	5,83 Aa
2	Presença	2,39* Cc	6,16* Bb	8,17* Aa
	Ausência	0,91 Ac	0,96 Ad	0,78 Ad
3	Presença	1,48 ^{ns} Cd	7,52* Ba	8,31* Aa
	Ausência	1,17 Cc	3,99 Bb	4,79 Ab
4	Presença	2,31 ^{ns} Cc	3,50* Bc	4,40 ^{ns} Ad
	Ausência	2,11 Bb	2,13 Bc	4,39 Ab
5	Presença	4,10* Ca	6,20* Ab	5,33* Bc
	Ausência	3,08 Ba	4,77 Aa	4,83 Ab
6	Presença	3,19* Bb	3,18 ^{ns} Bc	4,50* Ad
	Ausência	2,69 Ba	3,52 Ab	1,82 Cc
CV (%) ⁽¹⁾		5,99		

Médias seguidas de letras idênticas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As letras maiúsculas comparam tempo, na linha, e as minúsculas comparam solos, na coluna, para presença de glifosato e controle. * e ns: significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste t ($p \leq 0,05$) na comparação de presença de glifosato e controle. ⁽¹⁾ CV: coeficiente de variação.

A presença de pequenas concentrações de glifosato e AMPA foi detectada nas amostras de solo-controle (Quadro 7). Provavelmente, o surgimento dessas concentrações de glifosato e de seu metabólito AMPA ocorra por causa das constantes aplicações do herbicida nesses solos. No solo 6, a presença de glifosato não foi detectada, o que se justifica por ser um pomar de macieira conduzido no sistema orgânico, que não recebe aplicações do herbicida. Porém, uma insignificante concentração de 0,07 mg kg⁻¹ de AMPA foi detectada. Supôs-se que esse solo já tenha recebido aplicações do herbicida antes da implantação do sistema orgânico, o que sugeriu a grande recalcitrância desse metabólito. Analisando os resultados encontrados após o período de 32 dias de incubação, verificou-se que o glifosato foi degradado para o seu principal metabólito AMPA e que o método de extração e análise utilizado viabilizou a sua detecção no extrato. Resultados semelhantes foram observados por Veiga et al. (2001) e Araújo (2002), em que a concentração de glifosato diminuía ao mesmo tempo que a do AMPA aumentava com o passar do tempo, após a aplicação do glifosato. Possivelmente, em uma condição de tempo de incubação do solo superior ao utilizado (32 dias), a concentração do metabólito tivesse sofrido redução, conforme observado por Veiga et al. (2001).

Quadro 7. Quantidades de glifosato e de ácido aminometilfosfônico (AMPA) nas amostras de solos analisadas no início e no final do período de incubação, percentual de glifosato degradado pelos microrganismos do solo e incremento de AMPA em razão da biodegradação de glifosato

Glifosato			AMPA			
Solo	Período de incubação		Degradação	Período de incubação		Incremento ⁽¹⁾
	0 dia	32 dias		0 dia	32 dias	
	mg kg ⁻¹		%	mg kg ⁻¹		
1	1940,9 ab	28,9 c	98,5	71,2 b	221,27 d	2,1
Controle	0,07	-(²)	-	0,21	-	-(³)
2	2382,3 a	127,3 b	94,7	10,04 c	531,28 a	52,0
Controle	0,07	-	-	0,42	-	-
3	1875,6 ab	86,7 bc	95,4	23,91 bc	276,97 cd	10,6
Controle	0,24	-	-	0,61	-	-
4	1075,3 c	174,4 b	83,8	163,51 a	337,71 b	1,1
Controle	0,05	-	-	0,29	-	-
5	1783,7 abc	859,1 a	51,8	56,75 bc	310,16 bc	4,5
Controle	0,6	-	-	1,27	-	-
6	1451,1 bc	114,5 bc	92,1	157,81 a	321,55 bc	1,0
Controle	nd ⁽²⁾	-	-	0,07	-	-
CV (%) ⁽⁴⁾	9,96	9,39	-	16,80	4,22	-

Médias seguidas de letras idênticas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), em cada período, na coluna, na comparação de solos. ⁽¹⁾ Vezes que a quantidade de AMPA aumentou no final da incubação. ⁽²⁾ nd: não detectado. ⁽³⁾ Análise não realizada. ⁽⁴⁾ CV: coeficiente de variação.

CONCLUSÕES

1. O herbicida glifosato foi degradado pela microbiota dos solos analisados, demonstrando adaptação da microbiota desses solos à presença desse herbicida.

2. O herbicida glifosato apresentou efeitos negativos na multiplicação de bactérias dos solos contaminados. Mesmo assim, os resultados evidenciaram que o glifosato foi utilizado como fonte de nutrientes pela microbiota como um todo (fungos, actinomicetos).

3. A microbiota presente nos solos com menor tempo de aplicação do herbicida glifosato demonstrou maior capacidade de degradação do que aquela existente nos com um período maior de aplicação.

4. O principal metabólito da degradação do glifosato foi identificado como sendo o AMPA.

LITERATURA CITADA

- AMARANTE, O.P. & SANTOS, T.C. Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato: Breve revisão. *Quím. Nova*, 25:420-428, 2002.
- ARAÚJO, A.S.F. Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solos.. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002. 83p (Dissertação de Mestrado)
- ARAÚJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R. & ABARKELI, R.B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*, 52:799-804, 2003.
- ANDRÉA, M.M.; PERES, T.B.; LUCHINI, L.C.; BAZARIN, S.; PAPINI, S.; MATALLO, M.B. & SAVOY, V.L.T. Influence of repeated applications of glyphosate on its persistence and soil bioactivity. *Pesq. Agropec. Bras.*, 38:1329-1335, 2003.
- BARTHA, R. & PRAMER, P. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. *Soil Sci.*, 100:68-70, 1965.
- CASTRO JÚNIOR, J.V.; SELBACH, P.A. & AYUB, M.A.Z. Avaliação do efeito do herbicida glifosato na microbiota do solo. *Pesticidas*, 16:21-30, 2006.
- CONCEIÇÃO, M.A.F.; CARGNINO, C.; NACHTIGALL, G.R. & FIORAVANÇO, J.C. Consumo de água e coeficiente de cultura (Kc) para macieiras em Vacaria - RS. Bento Gonçalves, Embrapa Uva e Vinho, 2010. (Comunicado Técnico, 103)
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. Rio de Janeiro - CNPS, 1999. 412p.
- GIESY, J.P.; DOBSON, S. & SOLOMON, K.R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Rev. Environ. Contamin. Toxicol.*, 167:35-120, 2000.
- GOMEZ, E.; FERRERAS, L.; LOVOTTI, L. & FERNANDEZ, E. Impact of glyphosate application on microbial biomass and metabolic activity in a Vertic Argiudoll from Argentina. *Eur. J. Soil Biol.*, 45:163-167, 2008.
- HANEY, R.L.; SENSEMAN, S.A.; HONS, E.M. & ZUBERER, D.A. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Sci.*, 48:89-93, 2000.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS RENOVÁVEIS - IBAMA. Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos. 2.ed. Brasília, 1990.
- JAN, M.R.; SHAH, J.; MUHAMMAD, M. & ARA, B. Glyphosate herbicide residue determination in samples of environmental importance using spectrophotometric method. *J. Hazard. Mater.*, 169:742-745, 2009.
- LEITE, L.F.C. & ARAÚJO, A.S. Ecologia microbiana do solo. Teresina, Embrapa Meio Norte, 2007. 24p. (Documentos/Embrapa Meio-Norte)
- MAIER, R.M. Microorganisms and organic pollutants. In: MAIER, R.M.; PEPPER, I.L. & GERBA, C.P., eds. *Environmental Microbiology*. San Diego, Academic Press, 2000. p.363-402
- MORAES NETO, S.P. Acidez, alcalinidade e efeitos da calagem no solo. Planaltina, DF, Embrapa Cerrados, 2009. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/112/>>. Acesso em: 10 out. 2013.
- MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2.ed. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2006. 729p.
- NACHTIGALL, G.R. O Projeto INOVAMAÇÃ. In: NACHTIGALL, G.R., ed. *Inovações tecnológicas para o setor da maçã: INOVAMAÇÃ*. Bento Gonçalves, Embrapa Uva e Vinho, 2011. p.13-22.
- OBOJSKA, A.; TERNANA, N.G.; LEJCZAK, B.; KAFARSKI, P. & MCMULLAN, P. Organophosphate utilization by the thermophile *Geobacillus caldxylosilyticus* T20. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:2081-2084, 2002.
- PRATA, F. Comportamento do glifosato no solo e deslocamento miscível de atrazina. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002. 161p. (Tese de Doutorado)
- SCHNÜRER, J. & ROSSWALL, T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43:1256-1261, 1982.
- SOUZA, A.P. Atividade de oxyfluorfen, 2,4-D e glifosato, em solos de diferentes texturas na presença e na ausência de composto orgânico. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 1994. 71p. (Dissertação de Mestrado)
- SPADOTTO, C.A.; GOMES, M.A.F.; LUCHINI, L.C. & DE ANDRÉA, M.M. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: Princípios e recomendações. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 2004. (Documentos, 42)
- TAROUÇO, C.P. Cinética e fisiologia da biodegradação de glifosato por bactérias isoladas de solos expostos a este herbicida. Porto Alegre, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009. 80p. (Dissertação de Mestrado)

- TEJADA, M. Evolution of soil biological properties after addition of glyphosate, diflufenican and glyphosate+diflufenican herbicides. *Chemosphere*, 76:365-373, 2009.
- VARGAS, L.; ROMAN, E.S.; RIZZARDI, M.A. & SILVA, V.C. Alteração das características biológicas dos biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) ocasionada pela resistência ao herbicida glyphosate. *Planta Daninha*, 23:153-160, 2005.
- VEIGA, F.; ZAPATA, M.L.; FERNANDEZ MARCOS, M.L. & ALVAREZ, E. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. *Sci. Total Environ.*, 271:135-144, 2001.
- WARDLE, D.A. & PARKINSON, D. Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. *Plant Soil*, 122:21-28, 1990.
- ZABALOY, M.C.; GARLAND, J.L. & GÓMEZ, M.A. An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2,4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. *Appl. Soil Ecol.*, 40:1-12, 2008.
- ZOBIOLE, L.H.S.; KREMER, R.J.; OLIVEIRA, R.S. & CONSTANTIN, J. Glyphosate affects microorganisms in rhizospheres of glyphosate-resistant soybeans. *J. Appl. Microbiol.*, 110:118-127, 2010.