

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**BIODEGRADAÇÃO DE GLIFOSATO POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE
SOLOS CULTIVADOS COM MACIEIRA COM DIFERENTES HISTÓRICOS
DE APLICAÇÃO DESTE HERBICIDA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARÍLIA SCOPEL ANDRIGHETTI

PORTO ALEGRE, RS, BRASIL
AGOSTO – 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**BIODEGRADAÇÃO DE GLIFOSATO POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE
SOLOS CULTIVADOS COM MACIEIRA COM DIFERENTES HISTÓRICOS
DE APLICAÇÃO DESTE HERBICIDA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARÍLIA SCOPEL ANDRIGHETTI
(Bióloga – UNIPLAC)

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente como requisito
para a obtenção do Grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

PORTO ALEGRE, RS, BRASIL
AGOSTO – 2011

CIP - Catalogação na Publicação

Scopel Andrighetti, Marília
Biodegradação de glifosato por bactérias isoladas
de solos cultivados com macieira com diferentes
históricos de aplicação deste herbicida / Marília
Scopel Andrighetti. -- 2011.
109 f.

Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub.
Coorientador: Gilmar Ribeiro Nachtigall.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Biodegradação de herbicida. I. Záchia Ayub,
Marco Antônio, orient. II. Ribeiro Nachtigall,
Gilmar, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof^o Dr. Marco Antônio Záchia Ayub pela oportunidade oferecida, pela confiança no trabalho e pela ótima orientação.

Ao meu co-orientador, pesquisador da EMBRAPA Uva e Vinho Dr. Gilmar Ribeiro Nachtigall pelo acolhimento, pelas palavras de otimismo e pela excelente orientação.

À EMBRAPA Uva e Vinho pela disponibilidade de infra-estrutura.

À Universidade de Caxias do Sul pelo empréstimo de equipamentos.

À EMBRAPA Meio Ambiente pelo auxílio nas análises cromatográficas, em especial, ao laboratorista Marley Mendonça Tavares.

Ao pesquisador da EMBRAPA Uva e Vinho Dr. Silvio André Meirelles Alves pelo apoio durante a realização do mestrado. À laboratorista Faustina V. de Lima pelo auxílio indispensável para realização do trabalho, por todo ensinamento, carinho, incentivo e amizade.

Aos meus colegas de mestrado Lílian, Daniel, Karina e Aleksandro pela amizade e pelos inesquecíveis momentos.

À Prof^a Taísa Dal Magro da UCS pelos ensinamentos de análises estatísticas, pelo apoio, carinho, pela atenção e amizade.

Ao meu namorado, Valter Brehm Amarante, por seu amor, carinho, companheirismo, compreensão, apoio, pelo incentivo e por entender a minha ausência em muitos momentos importantes para nós. A toda sua família por ter me acolhido e apostado no meu sucesso.

Aos meus pais e meus irmãos que sempre acreditaram em mim e nunca mediram esforços para que eu pudesse conquistar meus objetivos, e sempre estiveram do meu lado nos momentos de alegria e de angústia. Muito obrigada a todos de coração. Eu amo vocês!

Biodegradação de glifosato por bactérias isoladas de solos cultivados com macieira com diferentes históricos de aplicação deste herbicida.¹

Autor: Marília Scopel Andrighetti

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

Co-orientador: Dr. Gilmar Ribeiro Nachtigall

RESUMO

O uso de herbicidas na agricultura para controle de plantas daninhas pode causar efeitos nocivos sobre processos biológicos do solo e organismos não-alvo. O glifosato é um herbicida sistêmico, pós-emergente, não-seletivo do grupo dos organofosforados, sendo amplamente usado em diversas culturas agrícolas e em áreas não cultivadas, podendo causar consequências negativas para microrganismos benéficos do solo. O objetivo desse trabalho foi analisar o impacto causado à microbiota pela adição de glifosato aos solos cultivados com macieira e isolar, selecionar e identificar bactérias destes solos historicamente expostos ao glifosato, com capacidade de biodegradar o herbicida. A biodegradação do glifosato foi avaliada monitorando a liberação de CO₂ pelos microrganismos durante 32 dias. Foram quantificados resíduos de glifosato e seu metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA) no início e no final do período através de extração seguida de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foram avaliadas a atividade microbiana e a quantidade de bactérias ao longo deste período. As bactérias isoladas foram selecionadas e submetidas à avaliação da biodegradação em biorreatores. Identificação das cepas selecionadas foi feita através da amplificação do gene 16S rDNA. Os resultados mostraram que o glifosato foi degradado pelos microrganismos do solo durante o período avaliado com formação do metabólito AMPA. O glifosato diminuiu o número de bactérias e aumentou a atividade microbiana. As bactérias selecionadas que apresentaram capacidade de degradar até 99,9% deste herbicida foram identificadas como *Microbacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* sp. e *Arthrobacter* sp.

1. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (96 p.). Agosto, 2011.

Glyphosate biodegradation by bacteria isolated from soil cultivated with apple with different herbicide application histories.

Author: Marília Scopel Andrighetti

Supervisor: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

Co-advisor: Dr. Gilmar Ribeiro Nachtigall

ABSTRACT

The use of herbicides in agriculture to control weeds can cause harmful effects on soil biological processes and non-target organisms. Glyphosate is a systemic herbicide, post-emergent, non-selective group of organophosphate, widely used in various agricultural crops and uncultivated areas, it may cause negative consequences for beneficial soil microorganisms. The aim of this study was to analyze the impact of the microbiota by the addition of glyphosate to soils planted with apple and isolate, select and identify bacteria of soils historically exposed to glyphosate, with the ability to biodegrade the herbicide. Glyphosate biodegradation was evaluated by monitoring the release of CO₂ by microorganisms for 32 days. We quantified residues of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid (AMPA) at the beginning and end of the period by extraction followed by analysis by high performance liquid chromatography (HPLC). We evaluated the microbial activity and the amount of bacteria over this period. Bacterial isolates were selected and subjected to assessment of biodegradation in bioreactors. Identification of selected strains was performed by amplification of 16S rDNA. The results showed that glyphosate was degraded by soil microorganisms during the study period with the formation of AMPA. Glyphosate reduced the number of bacteria and increased microbial activity. The bacteria selected that showed ability to degrade this herbicide to 99,9 % were identified as *Microbacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* sp. and *Arthrobacter* sp.

1. Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (96 p.). August, 2011.

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Interações da microbiota do solo com pesticidas	4
2.2. Glifosato	9
2.3. Impacto ambiental de pesticidas no ambiente	14
2.4. Biodegradação de glifosato.....	17
2.5. Análise de glifosato e AMPA	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. Coleta de solos	30
3.2. Determinação do peso seco e capacidade de campo.....	32
3.3. Glifosato	33
3.4. Biodegradação de glifosato no solo	34
3.5. Quantificação de bactérias do solo	35
3.6. Atividade microbiana do solo	35
3.7. Seleção de bactérias resistentes ao glifosato	36
3.7.1. Manutenção das cepas.....	37
3.7.2. Identificação das cepas bacterianas selecionadas por amplicação do gene 16S rDNA.....	38
3.8. Biodegradação de glifosato, em biorreatores, por consórcio bacteriano.....	39
3.9. Determinação da degradação de glifosato por fatores abióticos.....	40
3.10. Extração e análise de glifosato e AMPA do solo	40
3.10.1. Preparação e condicionamento de coluna de troca catiônica.....	40
3.10.1.1. Extração.....	41
3.10.1.2. Limpeza do extrato por cromatografia em resina AG 50-W.....	42
3.11. Sistema cromatográfico.....	42
3.11.1. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	42
3.11.2. Determinação de glifosato e AMPA e reação pós-coluna.....	43
3.11.3. Detecção.....	43
3.12. Análise de glifosato e AMPA em amostras líquidas	45
3.13. Análise estatística dos dados.....	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47

4.1. Biodegradação de glifosato no solo	47
4.2. Quantificação de bactérias do solo	51
4.3. Atividade microbiana do solo	52
4.4. Seleção de bactérias resistentes ao glifosato	56
4.5. Identificação das cepas bacterianas selecionadas por amplicação do gene 16S rDNA.....	59
4.6. Perfil da biodegradação de glifosato, em biorreatores, por consórcio bacteriano	60
4.7. Análise de glifosato e AMPA no solo.....	64
4.8. Análise de glifosato e AMPA em amostras líquidas provenientes de biorreatores	69
5. CONCLUSÕES	71
6. PERSPECTIVAS.....	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
APÊNDICE 1	81
APÊNDICE 2.....	93
APÊNDICE 3.....	94
APÊNDICE 4.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Histórico de aplicação de glifosato nos solos estudados.	31
Tabela 2. Composição físico-química das amostras de solos coletadas	32
Tabela 3. Umidade de campo dos solos analisados.....	33
Tabela 4. Dióxido de carbono ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de solo) liberado por microrganismos do solo devido a biodegradação de glifosato.....	50
Tabela 5. Número de UFC nas amostras dos solos avaliados em diferentes períodos de incubação. Média de três repetições	52
Tabela 6. Quantificação de bactérias de todos os solos analisados em diferentes doses de glifosato.....	57
Tabela 7. Número de cepas morfológicamente diferentes isoladas dos solos estudados que cresceram em três concentrações de glifosato.....	57
Tabela 8. Resultado da coloração de Gram das cepas provenientes da concentração de $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de glifosato..	58
Tabela 9. Quantidade de glifosato (mg.Kg^{-1}) nas amostras de solos analisados no início e no final do período de incubação e porcentual de glifosato degradado pelos microrganismos do solo.	65
Tabela 10. Quantidade de AMPA (mg.Kg^{-1}) nas amostras de solos analisados no início e no final do período de incubação e incremento de AMPA devido a biodegradação de glifosato.....	65

Tabela 11. Equações de calibração de glifosato e AMPA para determinações cromatográficas no início e no final do período de incubação do solo.	67
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural do herbicida glifosato.	10
Figura 2. Rotas de degradação do herbicida glifosato.	22
Figura 3. Curva de calibração de soluções de glifosato padrão com concentrações entre 0,01 $\mu\text{g},\text{mL}^{-1}$ e 0,80 $\mu\text{g},\text{mL}^{-1}$ para amostras de biorreatores com 2,5 vvm.....	44
Figura 4. Curva de calibração de soluções de glifosato padrão com concentrações entre 0,02 $\mu\text{g},\text{mL}^{-1}$ e 0,40 $\mu\text{g},\text{mL}^{-1}$ para amostras de biorreatores com 0 vvm.....	44
Figura 5. Curva de calibração de soluções de AMPA padrão com concentrações entre 0,01 $\mu\text{g},\text{mL}^{-1}$ e 0,80 $\mu\text{g},\text{mL}^{-1}$ para amostras de biorreatores com 2,5 vvm.....	45
Figura 6. Curva de calibração de soluções de AMPA padrão com concentrações entre 0,02 $\mu\text{g},\text{mL}^{-1}$ e 0,40 $\mu\text{g},\text{mL}^{-1}$ para amostras de biorreatores com 0 vvm.....	45
Figura 7. Liberação de CO_2 acumulado nas amostras dos solos com adição de 2,52 mg i.a./Kg-1 solo de glifosato ao longo de 32 dias de incubação, a 28°C (\pm 2) no escuro	48
Figura 8. Liberação de CO_2 acumulado nas amostras de solo sem adição de glifosato ao longo de um período de incubação de 32 dias, a 28°C (\pm 2) no escuro.....	48

- Figura 9. Atividade microbiana das amostras de solos estudadas ao longo de 32 dias de incubação. CG = com aplicação de glifosato; SG = sem aplicação de glifosato.....54
- Figura 10. Perfil de detecção de glifosato (A) e AMPA (B) e da multiplicação bacteriana durante o cultivo do consórcio bacteriano em biorreator na seguinte condição: aeração 2,5 vvm e agitação de 300 rpm. (-▲-) concentração celular no meio de cultura com adição de glifosato ($300 \mu\text{g. mL}^{-1}$), (-□-) concentração de glifosato e AMPA em meio com inóculo celular, (-■-) concentração de glifosato e AMPA em meio sem inóculo celular... 61
- Figura 11. Perfil de detecção de glifosato (A) e AMPA (B) e do crescimento de bactérias durante o cultivo do consórcio bacteriano em biorreator na condição: aeração 0 vvm e agitação de 200 rpm. (-▲-) concentração celular no meio de cultura com adição de glifosato ($300 \mu\text{g. mL}^{-1}$), (-□-) concentração de glifosato e AMPA em meio com inóculo celular, (-■-) concentração de glifosato e AMPA em meio sem inóculo celular...63
- Figura 12. Cromatograma do padrão de glifosato e AMPA na concentração de $0,30 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Condição móvel: $0,005\text{M KH}_2\text{PO}_4$ a $0,7 \text{ mL.min}^{-1}$ 68
- Figura 13. Cromatograma do padrão de glifosato e AMPA na concentração de $0,80 \mu\text{g.mL}^{-1}$.Condição Móvel: $0,005\text{M KH}_2\text{PO}_4$ a $0,7 \text{ mL.min}^{-1}$ 70

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	Ácido aminometilfosfônico
AN	Meio ágar nutriente
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO ₂	Gás carbônico
DO	Densidade ótica
FDA	Hidrólise do diacetato de fluoresceína
HPLC	High performance liquid chromatography
I.A.	Ingrediente ativo
LB	Meio Luria-Bertani
MERC	Mercaptoetanol
MM1	Meio mineral
OPA	O-ftalaldealdeído
pK	Potencial de dissociação
PA	Padrões analíticos
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UV	Ultravioleta
<i>g</i>	Aceleração da gravidade

1. INTRODUÇÃO

O solo é composto por inúmeras associações microbianas sendo considerado um sistema vivo, dinâmico, heterogêneo e em transformação. Estas associações são sensíveis a modificações químicas e físicas como adições de pesticidas ou de substâncias biologicamente ativas que podem afetar o equilíbrio microbiano.

A cada ano tem sido verificado o aumento da produção, comercialização e aplicação de pesticidas em todo mundo. Os pesticidas são trazidos ao ambiente com a intenção de apresentar efeitos tóxicos sobre um ou mais organismos considerados indesejados, sendo utilizados com o propósito de erradicar vetores de doenças, ervas daninhas e pragas, aumentar a qualidade e a produtividade dos produtos agrícolas, diminuir perdas de alimentos armazenados e reduzir custos com mão-de-obra. Os herbicidas tem sido os pesticidas mais utilizados mundialmente, visto que inovações tecnológicas como os alimentos transgênicos, não impedem o crescimento de plantas daninhas, além de ser uma tecnologia de baixo custo.

Nos últimos anos tem aumentado a preocupação em conhecer o comportamento e o destino dos pesticidas no meio ambiente em função do uso intensivo destes produtos na agricultura e pela formação de grandes

quantidades de resíduos. Por possuir uma grande área agricultável, o Brasil atualmente é considerado o maior consumidor de pesticidas do mundo, sendo que a categoria dos herbicidas é a mais utilizada.

O controle de plantas daninhas em pomares de maçã é realizado quase que exclusivamente por meio de herbicidas devido à alta eficiência, à facilidade de aplicação e ao custo relativamente baixo. O glifosato é um herbicida sistêmico, pós-emergente, não-seletivo, pertencente ao grupo químico dos organofosforados e das glicinas substituídas que visa o controle de ervas daninhas em áreas agrícolas e também não cultivadas. O glifosato pode ter consequências negativas para muitos microrganismos benéficos do solo.

A introdução de pesticidas no solo pode exercer uma pressão de seleção nos organismos, alterar a dinâmica bioquímica acarretando mudanças na função do ecossistema, e na biomassa microbiana.

Microrganismos como bactérias e fungos conseguem utilizar as moléculas dos pesticidas como fonte de carbono, nitrogênio, fósforo e energia sendo por este motivo considerados os principais degradadores destes produtos no ambiente terrestre e aquático. A ação dos microrganismos do solo sobre herbicidas constitui-se num sistema de grande importância, pois a degradação microbiológica contribui para a dissipação da molécula no ambiente.

O termo biodegradação se refere à degradação microbiológica de um composto orgânico no solo através de transformações deste em composto menos tóxico, pela sua inativação ou pela completa mineralização até CO_2 e

água entre outros, sendo considerada a principal forma de descontaminação do solo. A biodegradação de pesticidas tem despertado interesse científico pela necessidade em reduzir o impacto ambiental.

Muitos estudos que tratam da utilização de microrganismos para degradação de compostos químicos têm sido descritos na literatura nos últimos anos e apresentam bons resultados. Porém, muito ainda tem que se descobrir sobre estes processos objetivando sua otimização.

O cultivo da macieira é uma atividade relativamente recente no Brasil. No início da década de 70 a produção de maçã era pequena, mas com incentivos fiscais e apoio à pesquisa, o Sul do país aumentou a produção em quantidade e qualidade. Com isso, a economia do município de Vacaria/RS baseia-se na fruticultura, sendo o maior produtor do estado e o segundo do país. Visando aumento da produtividade, grande quantidade de pesticidas é utilizada. Porém, não existem informações regionais disponíveis sobre os efeitos do uso prolongado do glifosato, ou sobre os efeitos potenciais deste nos microrganismos do solo da região. Neste contexto o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a biodegradação de glifosato por bactérias isoladas de solos cultivados com macieira com diferentes históricos de aplicação do herbicida. Os objetivos específicos foram avaliar a biodegradação do glifosato através da liberação de gás carbônico (CO_2), da atividade microbiana, da quantificação da biomassa e de resíduos de glifosato e seu principal metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA) no início e no final da incubação do solo. Isolar, selecionar e identificar bactérias destes solos que apresentaram capacidade de crescer em meios de cultivo contendo este pesticida.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Interações da microbiota do solo com pesticidas

O solo é um componente complexo, vivo, dinâmico e em transformação. É um sistema heterogêneo, descontínuo e estruturado, formado por micro-habitats com diferentes características químicas, físicas e comunidades biológicas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Muitos produtos químicos que não ocorrem na natureza chamados de xenobióticos são lançados no solo. Estes produtos antropogênicos têm diversas aplicações, sendo utilizados na agricultura como pesticidas e adubos e, podem modificar o ambiente do solo.

Os pesticidas são compostos químicos ou biológicos destinados ao uso na produção, estocagem e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de floretas e outros ecossistemas, bem como de ambientes urbanos, hídricos e industriais, tendo como finalidade o controle ou a erradicação de insetos, microrganismos e ervas daninhas, entre outros agentes que causam prejuízos ao homem (BRASIL, 1989).

Uma vasta proporção da aplicação de pesticidas atinge o solo onde interage com constituintes orgânicos e minerais deste e sofre transformações químicas e biológicas. A degradação microbiana é o processo chave que afeta

a dinâmica do resíduo do pesticida no ambiente, incluindo sua persistência no solo e a susceptibilidade de lixiviação (TEJADA, 2009).

O uso intensivo de herbicidas tornou-se uma questão de preocupação ambiental por causa dos efeitos perigosos destes produtos químicos sobre processos biológicos do solo e organismos não-alvo (ZABALLOY et al., 2008).

A persistência dos resíduos de herbicidas no solo e seu movimento no sistema água-solo é um aspecto chave no seu comportamento no ambiente. Os herbicidas são primeiramente transladados do solo às águas superficiais pelas águas da chuva. As quantidades perdidas no solo e transportadas a águas superficiais dependem de vários fatores, incluindo as características do solo, topografia, climatologia, práticas agrícolas e as propriedades químicas e ambientais de cada herbicida. As reações químicas e o deslocamento físico influem na persistência destes químicos no solo, mas com diferentes implicações ambientais (SÁNCHEZ et al., 2005).

Experimentos em laboratório têm sido utilizados para investigar efeitos de pesticidas sobre microrganismos do solo, frequentemente preocupados com efeitos de aplicação de um único composto. Porém, em condições de campo, o que se observa é a aplicação repetida de um ou mais pesticidas no mesmo solo durante muitos anos, deixando metabólitos e resíduos e podendo causar efeitos danosos à microbiota do solo (HART & BROOKES, 1996).

Muitas enzimas podem ser usadas como um potente indicador da qualidade do solo porque elas são sensíveis ao estresse ecológico e a práticas

de manejo da terra. Enzimas podem reagir a mudanças no manejo do solo mais rapidamente do que outras variáveis e, portanto, podem ser úteis como indicadores precoces de mudanças biológicas. Fosfatases, por exemplo, são enzimas envolvidas na hidrólise de fósforo orgânico em diferentes formas de fósforo inorgânico, processo que acontece na degradação de glifosato por microrganismos (TEJADA, 2009). Cada vez mais estudos consideram os microrganismos como uma fonte de enzimas de degradação de xenobióticos (SUTHERLAND et. al., 2000). Bactérias e fungos edáficos têm sido relatados como os principais degradadores de pesticidas (MONTEIRO, 2001).

Os microrganismos têm papel fundamental na manutenção da fertilidade do solo e decomposição da matéria orgânica (ARAÚJO, 2002). A maior atividade biológica do solo situa-se na camada superficial de 0 a 20 cm de profundidade, pois aí ocorre o acúmulo da matéria orgânica do solo pela deposição de material vegetal e pelo efeito das raízes. Herbicidas aplicados nas folhas das plantas podem entrar no solo através da translocação e exsudação das raízes em sua forma original ou transformada (MONTEIRO, 1996; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Desidrogenases existem como uma parte integrante de células intactas e representam atividades oxidativas da microbiota do solo, enquanto a hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) pode ser catalizada por lipases intra e extracelulares, esterases e proteases produzidas por microrganismos (ZABALOY et al., 2008).

Reações enzimáticas oxidativas, redutivas e hidrolíticas resultam na transformação bioquímica dos xenobióticos, envolvendo mecanismos como o

catabolismo em que o substrato absorvido pelo microrganismo é quebrado em moléculas menores gerando energia, conseqüentemente, a biomassa microbiana aumenta às custas do substrato que diminui consideravelmente; e o cometabolismo, microrganismos transformam o composto sem dele retirar energia para seu crescimento, necessitando de outro composto biodegradável como fonte de carbono e energia (ALEXANDER, 1981). Neste último, a transformação é feita por um único microrganismo que não ganha energia ou nenhum benefício para seu crescimento, ao contrário do catabolismo (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

A adição de materiais orgânicos reduzidos e prontamente disponíveis no solo tende a contribuir com o aumento da atividade microbiana e conseqüentemente, com o aumento da degradação de pesticidas, principalmente por cometabolismo (PRATA, 2002).

A presença de microrganismos no solo pode ser facilmente influenciada por inúmeros fatores, como propriedades físico-químicas, matéria orgânica, umidade, temperatura, pH, sistemas de manejo e outros. Portanto, variações em populações específicas de microrganismos são esperadas sempre que se introduz alguma prática agrícola que altere significativamente os fatores citados (MONSATO, 2011)

A duração da disponibilidade de pesticidas no solo pode ser influenciada por uma série de processos bióticos e abióticos, a maioria dos quais interagem de forma tão extensa que a contribuição de qualquer uma destas variáveis se torna difícil de identificar. A capacidade degradativa da comunidade microbiana do solo é o fator determinante mais significativo da

estabilidade do resíduo no solo. A capacidade degradadora de muitos solos tem aumentado significativamente devido a aplicações repetidas de pesticidas, sendo que muitas vezes esta atividade pode ser induzida por apenas uma aplicação da dose recomendada do pesticida. O isolamento de microrganismos que degradam e utilizam pesticidas como única fonte de carbono pode indicar as cepas envolvidas na aceleração da degradação, com bactérias gram-negativas e actinomicetos isolados mais comumente (SUETT et al., 1996).

A degradação de pesticidas é conhecida como a transformação desses produtos em outros menos tóxicos como CO₂, água, compostos inorgânicos e orgânicos de ocorrência comum no ambiente (MONTEIRO, 1996). Pode ocorrer por via química ou biológica no solo, ou pela combinação das duas, sendo que a degradação microbiana é a via mais importante (FOMSGAAD, 1997). O único processo que obtém uma completa remoção de resíduos de pesticidas do ambiente é conhecido como mineralização, sendo facilitada pela ação de microrganismos (SØRENSEN et al., 2006). Microrganismos do solo podem realizar degradação de pesticidas e podem utilizar o xenobiótico como uma fonte de carbono, energia e outros nutrientes que promovem o crescimento microbiano. Diferentes mecanismos de biodegradação, juntamente com causas abióticas de alterações contribuem para redução de efeitos tóxicos e determinam a persistência do pesticida (GOMEZ et al., 2008). Ocasionalmente, esta degradação pode resultar em componentes mais tóxicos do que a molécula original do pesticida (LAVORENTI, 1996).

Quando aplicados em quantidades recomendadas, os pesticidas não têm efeitos adversos na microbiota nativa do solo, podendo ocorrer um aumento desta população pela disponibilidade do nutriente aos microrganismos, o que implica na degradação destes compostos (ARAÚJO, 2002).

Gomez et al. (2008) avaliaram o tamanho da microbiota do solo através do carbono da biomassa microbiana e atividade metabólica através da respiração e avaliação da atividade da enzima desidrogenase em solo com longo histórico de aplicação de glifosato e observaram diminuição no carbono da biomassa microbiana com aumento das doses aplicadas de glifosato, sugerindo um efeito inibitório do herbicida nos microrganismos edáficos. Contrariando os resultados da biomassa microbiana, a taxa de respiração não teve mudanças significativas.

Embora o uso intensivo de herbicidas pode causar efeitos adversos na microbiota do solo, em geral, os microrganismos exibem uma boa adaptabilidade em resposta ao impacto causado por xenobióticos, o que é evidenciado pelo restabelecimento da atividade metabólica. Os mecanismos pelos quais este pode acontecer envolvem substituições de espécies sensíveis por outras tolerantes, ou rápida re-colonização do ambiente depois do tratamento biocida.

2.2 Glifosato

Glifosato (N-fosfometil-glicina) é um herbicida sistêmico, pós-emergente, não-seletivo, solúvel em água, insolúvel em solventes orgânicos

comuns, pertencente ao grupo químico dos organofosforados e das glicinas substituídas. Apresenta fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ (Figura 1) e uma ligação estável entre carbono e fosfato o que oferece certa resistência química, térmica, fotolítica e enzimática à molécula (MOORE et al., 1983, PIPKE & AMRHEIN, 1988, HAYES et al., 2000; OBOJSKA et al., 2002). A degradação microbiana ocorre pela clivagem desta ligação liberando fosfato inorgânico produzindo sarcosina ou ácido aminometilfosfônico (AMPA). Considerado estável na presença de luz e em temperaturas elevadas ($60^{\circ}C$) (DICK & QUINN, 1995, TAROUCO, 2009; TEJADA, 2009; ZHAO et al., 2009). As constantes que indicam o grau de dissociação (pK) do herbicida em função do pH encontrados na literatura são: pK 1 = 0,8; pK 2 = 2,16; pK 3 = 5,46; pK 4 = 10,14 (AMARANTE, 2002).

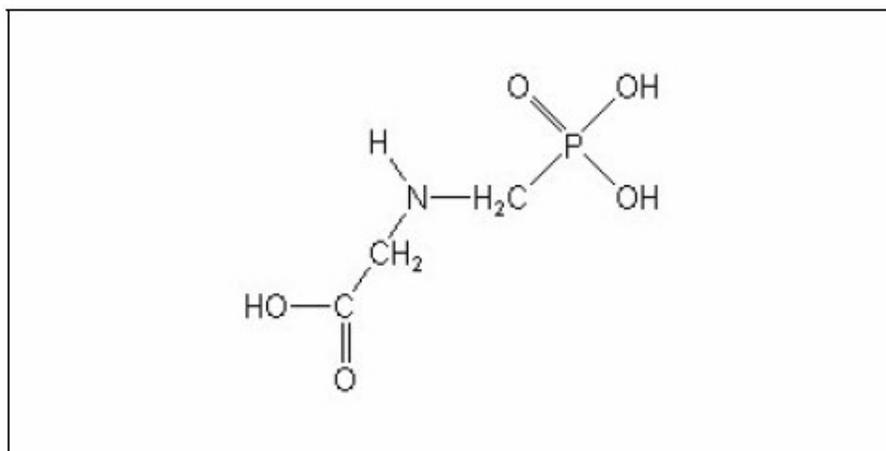


Figura 1: Fórmula estrutural do herbicida glifosato. Fonte: ANVISA (2011).

Apresenta largo espectro de ação, o que possibilita um excelente controle de plantas daninhas anuais ou perenes, tanto de folhas largas como

estreitas (MONSANTO, 2011). O glifosato é absorvido pelas folhas e tecidos verdes das plantas e transportado via floema para raízes e rizomas (ARAÚJO, 2002). O modo de ação do glifosato é a inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) na via do ácido chiquímico bloqueando a síntese de aminoácidos aromáticos essenciais como fenilalanina, triptofano e tirosina e, precursores de outros compostos aromáticos críticos incluindo reguladores de crescimento das plantas e fitoalexinas (MOORE et al., 1983; SHINABARGER & BRAYMER, 1986; FITZGIBBON & BRAYMER, 1988; LIU et al., 1991; DE ANDRÉA et al., 2003; KREMER & MEANS, 2009; TAROUCO, 2009; TIAN et al., 2010).

A parte do produto que é retida nos tecidos vegetais contribui para reduzir sua disponibilidade no ambiente, e este produto somente irá atingir o solo quando a matéria seca dessas plantas daninhas for decomposta pelos organismos heterotróficos do solo e na maior parte das vezes não mais como glifosato (MONSANTO, 2011).

A propriedade herbicida dessa molécula foi descoberta pela Monsanto em 1970 e a primeira formulação comercial foi lançada nos Estados Unidos em 1974, com o nome comercial de Roundup®. Atualmente é o mais utilizado no mundo, responsável por cerca de 10% do total de defensivos agrícolas consumidos, sendo rotineiramente aplicado para controle de ervas daninhas em áreas cultivadas e não-cultivadas (GIMSING et al., 2004; PESCE et al., 2009), residenciais, industriais, florestais e em um grande número de culturas como café, maçã, soja, algodão, entre outros (MONSANTO, 2011).

Frequentemente é descrito apresentando pouca ou nenhuma atividade no solo devido ao rápido potencial de adsorção em partículas orgânicas e inorgânicas do solo. É um composto orgânico dipolar e, por isso, apresenta rápida e alta taxa de adsorção aos óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio e à matéria orgânica do solo. Por estes motivos é considerado ambientalmente seguro (GROSSBARD & HARRIS, 1979; PRATA, 2002; GIMSING et al., 2004; KREMER & MEANS, 2009), com alta biodegradabilidade e um risco baixo de lixiviação (ARAÚJO, 2002; SØRENSEN et al., 2006). A quantidade adsorvida pelas partículas do solo como argila e húmus, depende do teor de matéria orgânica, textura e nível de fósforo (ARAÚJO, 2002).

A inativação do glifosato no solo é rápida devido a fatores que não podem ser controlados no ambiente como: atividade microbiana, que acarreta aceleração da degradação do glifosato; altas concentrações de cátions metálicos; instabilidade da umidade do solo e grande variação da temperatura do solo (PRATA, 2002).

O glifosato é rapidamente degradado por microrganismos do solo, sendo que sua meia-vida média (tempo médio necessário para que metade da quantidade aplicada do produto seja degradada) é de 32 dias (GIESY et al., 2000; MONSANTO, 2011). Glifosato quando aplicado no solo, exibe baixa atividade herbicida devido a sua degradação microbiana e em maior grau pela sua adsorção aos constituintes do solo. Glifosato compete com fosfato inorgânico por sítios de sorção no solo (MORILLO et al., 1999).

Segundo Zobiole et al. (2010), o glifosato pode ter consequências negativas para muitos microrganismos benéficos do solo. As *Pseudomonas*

spp. são importantes bactérias multifuncionais do solo por serem capazes de produzir numerosos metabólitos secundários incluindo sideróforos, cianeto de hidrogênio, enzimas extracelulares e muitos antibióticos que aumentam a disponibilidade de nutrientes neste ambiente e suprimem a competição dos grupos microbianos. Em seus trabalhos concluíram que o glifosato alterou microrganismos selecionados da rizosfera quando aplicado na primeira e na segunda geração de soja transgênica resistente ao referido herbicida em vários estágios de crescimento. Demonstraram que glifosato aplicado em soja transgênica, independentemente do nível de tolerância para o herbicida, impacta a complexa interação dos grupos microbianos do solo, atividade bioquímica e crescimento das raízes levando a subseqüentes efeitos no crescimento, saúde e produtividade das plantas.

Castro Júnior (2006) concluiu que os microrganismos habitantes da rizosfera como o fungo do gênero *Fusarium* podem metabolizar glifosato nos exsudatos radiculares como uma fonte de fósforo, carbono e energia.

No ambiente agrícola, o glifosato não causa impacto significativo sobre as populações microbianas em função da grande diversidade dos microrganismos, da composição físico-química dos solos e da dose efetiva para exercer alguma ação sobre eles.

De acordo com a EPA (Environmental Protection Agency) o glifosato não possui propriedades carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas ou que causem qualquer problema reprodutivo. Afirmam que este herbicida tem baixa toxicidade e baixo risco para a vida selvagem na exposição direta ao glifosato e suas formulações. Não apresenta efeito neurotóxico crônico, sendo

considerado ineficaz contra o homem e animais (FORLANI et al., 1999). A classificação quanto ao potencial de periculosidade ambiental do glifosato é IV, que significa pouco ou muito pouco perigoso, sendo também pouco tóxico. Portanto, quando utilizado de acordo com as recomendações da bula, o produto em questão não representa risco ao meio ambiente (MONSANTO, 2011).

Segundo Amarante & Santos (2002) apesar de o herbicida ser citado como pouco tóxico, há evidências de efeitos deletérios em seres humanos devido à toxicidade ambiental, causando danos indiretos e também levando à resistência de algumas espécies de ervas que se adaptam após o uso prolongado do herbicida.

O herbicida glifosato foi o principal responsável pela adoção mundial de práticas agrícolas como o plantio direto e também possibilitou um grande avanço na produção mundial de alimentos com a introdução de culturas geneticamente modificadas, tolerantes ao glifosato (MONSANTO, 2011).

2.3 Impacto Ambiental de pesticidas no ambiente

Impacto ambiental pode ser considerado como qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente, causado por qualquer forma de matéria ou energia resultante das atividades humanas que direta ou indiretamente, afetam a saúde, a segurança e o bem estar da população; as atividades sociais e econômicas; a biota e a qualidade dos recursos ambientais (FRIGHETTO, 1997; SPADOTTO, 2002).

Segundo Chaim (2004), o uso incorreto de pesticidas acaba causando sérios impactos ambientais como intoxicações ou doenças no homem, resistência da praga ao produto, contaminações de solo e água, morte de inimigos naturais e organismos não-alvo, entre outros.

A introdução de pesticidas no ambiente agrícola pode provocar efeitos indesejáveis por exercer uma pressão de seleção nos organismos, alterar a dinâmica bioquímica, acarretando mudanças na função do ecossistema, e a biomassa microbiana. Como os microrganismos têm atuação fundamental na transformação e liberação de nutrientes para as plantas, a disponibilidade de nutrientes pode ser alterada e a fertilidade do solo comprometida (SPADOTTO, et al., 2004; SPADOTTO, 2006).

Os efeitos ambientais de um pesticida dependem intrinsecamente da sua ecotoxicidade a organismos terrestres e aquáticos e também da sua toxicidade ao ser humano. Além disso, dependem diretamente das concentrações atingidas nos diferentes compartimentos ambientais que dependem do modo e das condições de aplicação, da quantidade ou dose usada e do comportamento e destino do pesticida no meio ambiente. (SPADOTTO et al., 2004).

Devido à natureza, heterogeneidade, dinâmica e respostas adaptativas da comunidade microbiana, torna-se difícil determinar com exatidão os impactos causados pelo uso destes produtos na microbiota e nos processos biológicos do solo. Os efeitos negativos dos pesticidas devem ser avaliados por indicadores específicos, como a utilização de fontes de carbono e a medida da atividade enzimática da comunidade microbiana do solo na

avaliação dos impactos de poluentes no solo (FORTES NETO, 2007; ZABALOY et al., 2008).

A principal parcela de vendas de todos os pesticidas no sistema de produção agrícola de alta escala comercial no mundo industrializado é constituída pelos herbicidas (TAROUCO, 2009).

O uso de herbicidas pode causar impactos diretos e indiretos; locais, regionais ou globais; imediatos, de médio ou longo prazo; temporários, cíclicos ou permanentes; reversíveis ou irreversíveis. Em áreas agrícolas, podem ainda ser de fonte difusa, causados pela contaminação proveniente da aplicação regular, ou pontual, por derramamento durante o transporte e manuseio dos herbicidas. Os impactos podem ocorrer nos meios abiótico, biótico e sócio-econômico, portanto a avaliação de impactos ambientais dos herbicidas deve contemplar os aspectos ecológicos, sociais e econômicos mantendo relação com o conceito de sustentabilidade agrícola. Os impactos ambientais provocados pelo uso de herbicidas podem ainda ser intrínsecos, resíduos no solo, e extrínsecos, contaminação de águas superficiais e subterrâneas usadas para abastecimento de populações urbanas (SPADOTTO, 2002).

Em uma avaliação de impacto ecológico de produtos químicos no meio ambiente, devido à complexidade dos fatores envolvidos, a principal responsabilidade é saber selecionar quais os parâmetros mais sensitivos para se estimar os possíveis efeitos de um produto sobre o ecossistema em estudo (GUIMARÃES, 1987).

2.4 Biodegradação de glifosato

O termo biodegradação refere-se à degradação microbiológica direta ou indireta de um composto orgânico, sendo considerada a principal via de desaparecimento desses produtos no solo (MONTEIRO, 1996; PRATA, 2002; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Os microrganismos utilizam este composto como substrato pela ação de suas enzimas e podem ainda, transformá-lo em nutrientes e energia para sua sobrevivência (MAIER, 2000). A biodegradação é fundamental para a reciclagem de produtos químicos naturais e industriais no ambiente (WACKETT et al., 1999).

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). Embora parte desse processo seja ocasionada por reações químicas, como a hidrólise, a fotólise e a volatilização, o catabolismo e o cometabolismo microbianos são os principais meios de mineralização (SPADOTTO et al., 2004; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; ZABALOY et al., 2008; TAROUCO, 2009). O tipo e as condições do solo, bem como as propriedades da microbiota, podem influenciar a taxa de biodegradação e mineralização do produto além da disponibilidade do composto aos microrganismos (MAIER, 2000).

A transformação de pesticidas é constituída por processos distintos e complexos, os quais são influenciados por uma infinidade de fatores fazendo com que este processo seja específico para cada molécula (SOMASUNDARAM & COATS, 1990).

Fatores do ambiente tais como temperatura, umidade, vento e luz solar podem afetar a transformação dos herbicidas no solo (MONTEIRO, 1996). As propriedades do solo como pH, textura, quantidade de argila e de matéria orgânica, entre outras, podem influenciar diretamente na degradação de herbicidas (TEJADA, 2009). O pH desempenha importante papel na adsorção de glifosato em solos argilosos (ZHAO et al., 2009). O pH baixo que favorece a adsorção ao solo, reduz a biodisponibilidade do glifosato aos heterotróficos (OBOJSKA et al., 2002). A biodegradação em biorreatores proporciona um controle maior das características físicas do processo como, por exemplo, o pH, a temperatura, e a aeração, permitindo a otimização e redução do tempo de degradação da molécula herbicida (TAROUCO, 2009).

A ação dos herbicidas no ambiente é influenciada pelas condições climáticas e condições do solo, que passam a agir de forma combinada. Assim, a necessidade de se estudarem as diversas formas de interação desses produtos com o solo vem tornando-se imprescindível à compreensão dos diferentes caminhos tomados por esses produtos no meio (ARAÚJO, 2002).

O tamanho, a forma, a estrutura química, os grupos funcionais e a carga da molécula, são as principais características químicas do herbicida em relação à degradação. Estas determinam o grau de toxicidade, a rota metabólica, o comportamento no solo e a absorção pelos microrganismos. A existência de genes apropriados e expressos na comunidade microbiana é a condição essencial para que ocorra biodegradação (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Na maioria dos casos, a transformação da molécula durante sua exposição a um microrganismo, ou a toda microbiota do solo, não ocorre apenas por um único mecanismo. A molécula pode ser metabolizada por vários caminhos no ambiente resultando diferentes produtos oriundos da mesma molécula (SOUZA, 1998 in ARAÚJO, 2002).

O herbicida glifosato pertence ao grupo químico dos organofosforados que contém uma ligação estável entre carbono e fósforo (C-P), sendo altamente resistente a decomposição química e sua degradação é, portanto, um processo biológico que envolve a atividade da enzima liase na quebra da referida ligação (MOORE et al., 1983; GIMSING et al., 2004; KOOLS et al., 2004).

O glifosato pode estimular ou inibir o crescimento dos microrganismos do solo, dependendo do tipo de solo e da concentração de herbicida utilizada (GOMEZ et al, 2008). O destino do glifosato no solo é a completa degradação por microrganismos edáficos (SHINABARGER & BRAYMER, 1986).

A degradação do glifosato no solo é muito rápida (podendo variar bastante em função das condições ambientais) (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006) e é realizada por grande variedade de microrganismos que usam o produto como fonte de energia, carbono, fósforo e nitrogênio, por meio de duas rotas catabólicas (DICK & QUINN, 1995) (Figura 2).

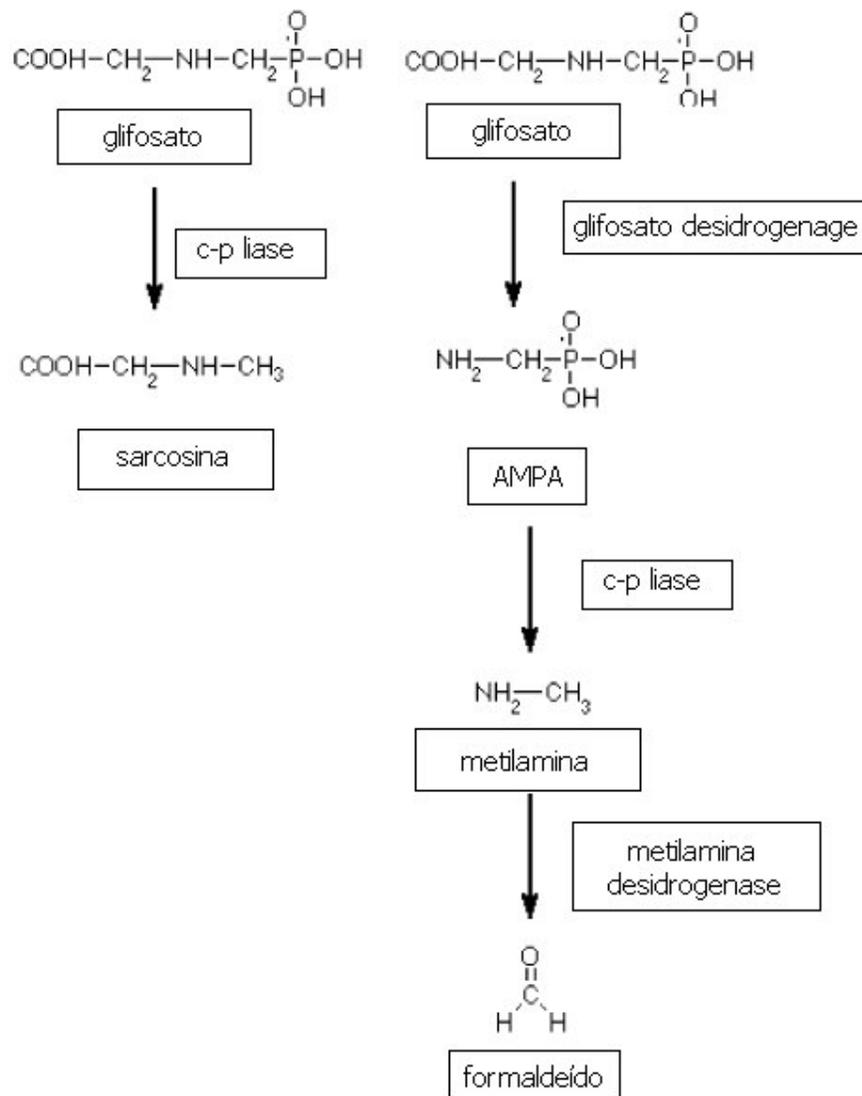


Figura 2. Rotas de degradação do herbicida glifosato. Fonte: AMARANTE & SANTOS (2002).

Em uma delas ocorre clivagem direta da ligação C-P da molécula de glifosato; resultado da atividade da enzima liase C-P, produzindo sarcosina como metabólito intermediário (LIU et al., 1991; TEJADA, 2009), que pode ser degradada à aminoácido glicina e então a carbono que é incorporado em alguns aminoácidos como serina, cisteína, metionina e histidina e nas purinas

(PIPKE et al., 1987). Entre os microrganismos que realizam a degradação do herbicida por esta rota estão *Pseudomonas* sp., *Arthrobacter* sp., *Agrobacterium radiobacter*, *Rhizobium meliloti* (WACKETT et al., 1987; LIU et al., 1991).

A outra rota 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 carbono e fósforo, assim esta ligação é conservada (OBOJSKA, et al., 2002; TEJADA, 2009). Uma lenta degradação de AMPA em relação ao glifosato tem sido relatada, possivelmente por causa da forte ligação que este metabólito tem com o solo. Eventualmente, ocorre decomposição do AMPA em água, dióxido de carbono, amônia e fosfato (FORLANI et al., 1999; ARAÚJO, 2002; GOMEZ et al., 2008). Pode ocorrer ainda, a desfosforilação do AMPA através da ação da enzima C-P liase originando metilamina e formaldeído (LERSB et al., 1990). *Arthrobacter atrocyaneus*, *Achromobacter* sp. e *Flavobacterium* sp. são alguns microrganismos que realizam a degradação de glifosato formando AMPA (BALTHAZOR & HALLAS, 1986; PIPKE & AMRHEIN, 1988; FORLANI et al., 1999; OBOJSKA, et al., 2002).

A capacidade de degradar glifosato está difundida entre as bactérias do solo, e muitas cepas de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Bacillus* e *Arthrobacter* são capazes de crescer com fosfatos como única fonte de fósforo, nitrogênio e carbono (KRZYSKO & LUPICKA, 1997).

Muitas espécies de bactérias e fungos vêm sendo isoladas por sua capacidade de degradar glifosato, a maioria dos estudos se refere ao princípio ativo glifosato, desconsiderando o efeito dos adjuvantes das formulações comerciais sobre o desenvolvimento dos microrganismos (KARPOUZAS & SINGH, 2006).

Eberbach (1998) estabeleceu que o estágio inicial da degradação do glifosato ocorre quase exclusivamente na fase não adsorvida do solo então carbono, nitrogênio e fósforo da molécula de glifosato podem ser rapidamente disponibilizados para microrganismos.

A dinâmica e a heterogeneidade dos microrganismos do solo são dependentes de fatores tão diversos como características do solo, variações climáticas, práticas agrícolas e ainda a taxa e a frequência de aplicação do pesticida influenciam significativamente na biodegradação do glifosato (SUETT et al., 1996).

A população e a atividade dos microrganismos do solo são alteradas com a presença de herbicidas, devido ao aumento da fonte de carbono e outros nutrientes que favorecem o crescimento microbiano (ARAÚJO, 2002).

A atividade microbiana é de suma importância nos processos de eliminação de produtos químicos do ambiente (MONTEIRO, 1997; SANTOS et al., 2009). A formulação dos pesticidas pode influenciar a degradação, como é o caso de formulações granulares que são mais persistentes do que os concentrados emulsionáveis e ainda afetar a mobilidade dos ingredientes ativos no solo, modificando a quantidade de pesticidas disponíveis para degradação (MONTEIRO, 1997).

Embora o glifosato seja uma molécula simples, potencialmente fácil de ser degradada, com meia-vida variando de dias (parte não-adsorvida às partículas do solo) a anos (fração adsorvida ao solo), é adsorvida ao complexo organo-mineral do solo (CARLISLE & TREVORS, 1988; EBERBACH, 1998; GOMEZ et al., 2008). A fração de glifosato que entra no solo pode ser fortemente adsorvida, principalmente em solos com alto teor de argila e matéria orgânica (GOMEZ et al., 2008). Forte adsorção por sólidos, tais como óxidos de alumínio e ferro podem de fato proteger compostos orgânicos como glifosato contra degradação microbiana, e processos de adsorção/dessorção podem controlar taxas de degradação. No solo a adsorção do glifosato é também influenciada pelo fosfato, porque estes competem por sítios de adsorção, então a aplicação de fosfato pode melhorar a biodisponibilidade e a mineralização do glifosato. (GIMSING et al., 2004). Após adsorção, a mineralização procede sem nenhuma fase lag, e parece ser um processo cometabólico que ocorre em ambas as condições aeróbia e anaeróbia (FORLANI et al., 1999). A adsorção restringe ao longo do tempo a disponibilidade do glifosato para degradação (EBERBACH, 1998).

Glifosato é considerado um herbicida inofensivo devido a sua rápida biodegradação e forte adsorção no solo e assim ter uma baixa propensão para mobilidade e contaminação de águas subterrâneas. Produtos químicos com alta afinidade pela matriz do solo são susceptíveis à lixiviação, e baixas concentrações de glifosato têm sido encontradas em aquíferos superficiais, contrariando a idéia que o herbicida possui mobilidade limitada no solo (ZHAO et al., 2009).

A taxa de mineralização de glifosato é dada pela análise da biomassa e atividade microbiana e determina a persistência deste no solo (GOMEZ et al., 2008). A persistência do herbicida no solo é resultado de processos de transformação (degradação, formação de metabólitos) e remoção (volatilização, escoamento superficial, etc) (PERNIN-GARNIER et al., 1995). Dentre os processos biológicos que determinam a persistência dos herbicidas no solo, a degradação microbiana constitui o de maior importância (RUEPPEL et al., 1977). Os fatores que influenciam a persistência e comportamento do herbicida no solo estão interrelacionados com a adsorção do pesticida e com a disponibilidade do mesmo para biodegradação (ARAÚJO, 2002). Conforme Zabaloy et al. (2008), glifosato tem uma persistência moderada no solo. Os complexos mais persistentes são resultantes de ligações covalentes do pesticida ao material químico do solo sendo conhecidos como resíduos ligados (MONTEIRO, 1996).

Aplicações repetidas de glifosato podem ter um impacto maior na comunidade microbiana do solo do que uma simples aplicação (LANCASTER et al., 2009).

O fenômeno da biodegradação acelerada é observado depois de repetidas aplicações de pesticidas no solo e resulta num processo natural de adaptação metabólica da comunidade microbiana. A biodegradação acelerada aumenta a população microbiana específica e sua atividade degradadora (MONTEIRO, 1996; ARAÚJO, 2002; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). A adaptação da população microbiana a compostos químicos no ambiente pode ser explicada pelo ajustamento de um componente específico da população,

que resulta em uma atividade competitiva e numa proliferação da mesma. Este fenômeno pode ser explicado pelo resultado da interação entre substâncias químicas, microrganismos e condições ambientais (SOMASUNDARAM & COATS, 1990). Pode acelerar o desaparecimento do produto, promovendo a destoxificação e evitando seu acúmulo no solo, porém, pode reduzir a eficácia do produto aplicado sobre os organismos-alvo (patógeno ou praga) (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Quanto mais tempo a molécula do pesticida permanecer no solo depois de sua aplicação, mais resistente se torna à degradação (MONTEIRO, 1996).

Devido ao fato de a biodegradação acelerada decorrer de processos catabólicos, a biomassa e/ou a atividade microbiana de microrganismos degradadores pode ser aumentada em solos com sucessivas aplicações de um determinado pesticida (PRATA, 2002). Microrganismos isolados de solos adaptados ao pesticida são capazes de crescer usando a molécula do pesticida como única fonte de carbono e energia e, além disso, induz rápida degradação do pesticida quando inoculado em solo não adaptado (SUETT et al., 1996).

Nesta degradação ocorre o aumento do crescimento de bactérias degradadoras conforme há desaparecimento do produto no solo. Outro aspecto interessante é a capacidade de adaptação dos microrganismos a esse produto, que é rapidamente biodegradado, diminuindo sua exposição ambiental e, conseqüentemente, os riscos. Estudos em solos brasileiros mostram que mesmo depois de anos de aplicação, não há acúmulo significativo de glifosato e que este não oferece impacto em bactérias, fungos e na atividade heterotrófica do solo (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Robertson & Alexander (1994) realizaram um estudo com intuito de avaliar a degradação acelerada de alguns herbicidas e observaram que o glifosato foi rapidamente e extensivamente mineralizado após a sua primeira aplicação.

2.5 Análise de glifosato e AMPA

Em decorrência da ampla utilização do glifosato, muitos estudiosos desenvolveram métodos de extração e análise deste composto que permitem a sua detecção e quantificação em amostras ambientais. Devido à complexa interação do glifosato com componentes do solo, a sua solubilidade em água e insolubilidade em solventes orgânicos, os métodos de extração também são complexos e dependentes do tipo e das características do solo (SPRANKLE et al., 1975; ARAÚJO, 2002; TAROUÇO, 2009). Melhores recuperações são observadas para solos orgânicos do que para solos argilosos e minerais, pois nestes existe competição pelos sítios iônicos do solo comprometendo a extração (AMARARANTE & SANTOS, 2002).

O glifosato possui alta polaridade e tendência em formar espécies iônicas e, por este motivo, a maioria das técnicas de extração do herbicida é realizada por meio de reações ácido-base, onde o composto que está ligado à partículas iônicas do solo através do grupo fosfato, passa a interagir com íons da solução. Nos processos de extração são utilizadas bases fortes como hidróxido de potássio e hidróxido de sódio; sais dessas bases, bases fracas ou ácidos fracos e, após, etapas de eluição/retenção em resinas de troca iônica (AMARANTE & SANTOS, 2002).

Muitos dos métodos relatados na literatura para determinação e separação de glifosato são cromatográficos. No método da cromatografia líquida, detecção de UV visível e de fluorescência são utilizadas para os derivados de glifosato. Os derivados de glifosato mostram alta sensibilidade e seletividade na determinação por cromatografia gasosa e líquida, mas os procedimentos de derivatização são muito complicados e ainda geram produtos instáveis. Cromatografia iônica e eletroforese capilar também são usados na determinação de glifosato em diferentes amostras (JAN et al., 2009).

Resto et al. (2006) afirmaram ser a cromatografia iônica um método cromatográfico eficiente na detecção de substâncias solúveis em água e iônicas.

Técnicas como a polarografia, a espectrofotometria, eletroforese capilar e a ressonância magnética nuclear, têm sido aplicadas na análise do herbicida mostrando que técnicas menos convencionais podem ser adequadamente aplicadas como alternativas de análise do composto em amostras ambientais (AMARANTE & SANTOS, 2002).

A técnica mais utilizada para a determinação de 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 (MORLIER & TOMKINS, 1996). Apresenta vantagens importantes como pequenos coeficientes de variação, recuperações e limites de detecção adequados (AMARANTE & SANTOS, 2002).

A segunda técnica mais descrita para determinação de glifosato é a cromatografia gasosa, realizada após derivação de glifosato para convertê-lo em derivados voláteis e termicamente estáveis e tem como vantagem possuir alta sensibilidade (KATAOKA, 1991; TSUNODA, 1993; JAN et al., 2009).

Sánchez et al. (2005) utilizaram a técnica da cromatografia iônica para determinar a presença de glifosato em águas do Rio Catatumbo, concluindo que esta técnica é eficaz para a determinação do herbicida em amostras de água ambientais, ao observarem que $99\pm 6\%$ do glifosato foi recuperado. Zhu et al. (1999) descreveram um método sensível de determinação de glifosato em amostras de água ambiental por cromatografia iônica.

Jan et al. (2009) desenvolveram um método espectrofotométrico simples de detecção de glifosato em amostras ambientais e biológicas. O grupo amina do glifosato foi convertido em ácido ditiocarbâmico reagindo com disulfito de carbono, em clorofórmio. O grupo ditiocarbâmico posteriormente reagiu com íon metálico cobre, na presença de amônia e um complexo ditiocarbamato de cor amarela de cobre foi formado. A absorbância do complexo amarelado resultante foi lida a 435 nm. Este método foi aplicado com êxito em amostras ambientais. Os valores de recuperação em amostras de solo e de água foram de 80 a 87% e 85 a 92% respectivamente.

Milles & Moye (1988) desenvolveram um método de extração de glifosato para diferentes tipos de solo. Para solos argilosos e com alto teor de matéria orgânica, a solução usada foi KOH $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$. A solução de KH_2PO_4

0,1 mol.L⁻¹ foi utilizada para solos com baixos níveis de argila e matéria orgânica. Obtiveram recuperação de 35% e 100% do herbicida aplicado.

Borjesson & Tortensson (2000) realizaram a determinação de glifosato e AMPA em solo e em água, utilizando hidróxido de sódio para extração e obtiveram recuperação média de 78% e 75% em solo e 103% e 96% em água para glifosato e AMPA, respectivamente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nas unidades da EMBRAPA UVA e VINHO nas cidades de Bento Gonçalves-RS e Vacaria-RS e no Laboratório de Biotecnologia do ICTA da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) no ano de 2010 e 2011.

3.1. Coleta de solos

As amostras de solo foram coletadas no município de Vacaria/RS em pomares de maçã de três propriedades particulares e na Estação Experimental de Fruticultura Temperada da EMBRAPA Uva e Vinho. Na propriedade 1 foi realizada coleta em área com histórico de 1 ano de aplicação do glifosato, que corresponde ao solo 1. Na área 2 a coleta foi feita de solo com histórico de 7 anos de uso do herbicida (solo 2). Na terceira propriedade, duas coletas foram realizadas de áreas diferentes com os seguintes históricos, 15 anos (solo 3) e 23 anos (solo 4) de aplicação do herbicida. Na estação, as amostras foram coletadas em duas áreas uma com histórico de 29 anos de uso de glifosato (solo 5) e a outra de um pomar orgânico sem aplicação do herbicida (solo 6) (controle). O histórico de aplicação do glifosato nas diferentes áreas pode ser verificado na Tabela 1.

Tabela 1. Histórico de aplicação do glifosato nos solos estudados.

Propriedade	Histórico de aplicação	Quantidade aplicada	Aplicações
1	1 ano	6 L/ ha	jan/10
2	7 anos	6 L/ ha	jan/10
3	15 anos	6 L/ ha	jan/10
3	23 anos	6 L/ ha	jan/10
4	29 anos	6 L/ ha	jan/10
4	isento	-	-

Foram coletadas, de cada área, amostras de solos da linha dos pomares, ou seja, próximo às raízes, inteiramente ao acaso, em 10 pontos diferentes numa profundidade de 0-10 cm e que formaram a amostra de trabalho. As amostras dos solos foram mantidas à temperatura ambiente, sendo em seguida peneiradas em malhas de 2 mm, e então o peso seco foi determinado. O restante das amostras foi acondicionado em sacos plásticos fechados frouxamente com barbante (para possibilitar a respiração das bactérias) e mantido à temperatura de 4°C para análises posteriores.

Os dados das análises físico-químicas das amostras de solo, realizadas pelo Laboratório de Análises de Solo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Composição físico-química das amostras de solos coletadas.

Determinação	Identificação (tempo de uso de glifosato)					
	1 (1)	2 (7)	3 (15)	4 (23)	5(29)	6(zero) ¹
Argila (%)	46	34	48	39	53	56
pH em 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
M.O. (%)	4,6	4,1	5,0	5,2	4,7	5,5
Al _{troc.} (cmol _c /dm ³)	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0
Ca _{troc.} (cmol _c /dm ³)	17,4	8,8	10,6	18,4	4,5	14,2
Mg _{troc.} (cmol _c /dm ³)	8,2	3,8	2,9	3,4	1,8	4,0
Al+H (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 Pomar orgânico Embrapa.

3.2. Determinação do peso seco e capacidade de campo

Amostras de 10 g de solo foram secas em estufa à temperatura de 105°C por 24 horas, em três repetições (ARAÚJO, 2002). A umidade foi determinada, em porcentagem, pelas diferenças dos pesos dos solos antes e após a secagem em estufa (Tabela 3).

Tabela 3. Umidade de campo dos solos analisados.

Solo	Umidade de campo (%)
1	21,2
2	12,9
3	24,0
4	22,4
5	20,0
6	23,0

O valor da capacidade de campo, utilizado para correção da umidade do solo no experimento de biodegradação, para os solos da região de Vacaria-RS, foi de 0,43 cm³ água/cm³ de solo (CONCEIÇÃO et al., 2010) sendo o tipo de solo Latossolo Bruno Distrófico Típico (EMBRAPA, 1999). A textura deste solo é argilosa que favorece maior capacidade de campo.

3.3. Glifosato

O herbicida utilizado foi o glifosato em sua fórmula comercial (Roundup WG[®]) na dose recomendada para a cultura da maçã (3,5 Kg. ha⁻¹). Em cada quilograma do produto 720 g correspondem à quantidade de ingrediente ativo (molécula de glifosato). Então, em 3,5 Kg de Roundup WG[®] tem-se 2.520 g de ingrediente ativo. Esta quantidade de produto é dissolvida em 100 L de água, sendo que em cada litro 35 g do Roundup WG[®] são dissolvidas tendo 25,2 g i.a. A quantidade aplicada foi calculada utilizando 25,2 g i.a./ ha solo. A dose final aplicada nas amostras de solo foi de 2,52 mg i.a./Kg de solo.

3.4. Biodegradação de glifosato no solo

A metodologia utilizada foi a descrita por Bartha & Pramer (1965), que quantifica o dióxido de carbono (CO₂) desprendido na respiração microbiana do solo.

O herbicida glifosato foi aplicado na dose de 2,52 mg i.a./ Kg⁻¹ de solo, uniformemente nas amostras de solos contidas em sacos plásticos que foram agitados para homogeneização (ARAÚJO, 2002). Sendo utilizados 200 g (peso seco) de cada amostra de solo que foram acondicionados em frascos de fechamento hermético. A umidade do solo foi ajustada para 70% da capacidade de campo. Após adição do solo contaminado com o herbicida, copinhos plásticos (50 mL) foram colocados nos frascos contendo 20 mL de NaOH 0,5M e incubados por 48 horas a 28°C. Decorridas 48 horas os copinhos foram retirados dos frascos e acrescidos de 3 mL de BaCl₂ 30%, 3 a 4 gotas de fenolftaleína sendo o NaOH restante titulado com HCl 0,5M. Frascos contendo solo não contaminado serviram como testemunha. O mesmo procedimento foi utilizado para frascos sem adição de solo (branco), para determinar a quantidade de CO₂ desprendido devido à atividade microbiana.

A quantificação do CO₂ desprendido foi realizada nos períodos 2, 4, 8, 16, 24 e 32 dias após a incubação do solo, sendo calculado pela seguinte fórmula (IBAMA, 1990):

$$\mu\text{g C-CO}_2 = [(mL \text{ HCL}_{\text{gasto}} \text{ branco}) - (mL \text{ HCL}_{\text{gasto}} \text{ tratamento})] \times N \times 22$$

onde:

N: normalidade do HCL, determinada a cada coleta por titulação com NaOH 0,5N.

3.5. Quantificação de bactérias do solo

Na determinação da comunidade bacteriana do solo foi utilizada a técnica de contagem de viáveis. Foi pesada 1 g de cada amostra de solo e adicionados em Erlenmeyer (50 mL) contendo 9 mL de água estéril e submetidas à agitação de 200 g por 30 minutos a temperatura ambiente. Uma alíquota de 1 mL foi retirada da suspensão bacteriana de cada amostra e colocada em tubos de ensaio e a esta, adicionados 9 mL de solução salina 0,9%. Este procedimento foi repetido até a obtenção das diluições 10^{-3} a 10^{-7} e plaqueadas em meio ágar nutriente (AN) (5 g de peptona, 3 g de extrato de carne, 15 g de ágar dissolvidos em um litro de água destilada) em triplicata. Em seguida, as placas foram vedadas com Parafilm™ e incubadas durante 48 horas 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).

3.6. Atividade microbiana do solo

A atividade microbiana foi avaliada de acordo com a técnica de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) onde este substrato é clivado principalmente por esterases, lipases e desidrogenases (SCHNÜRER & ROSSWALL, 1982).

Amostras de 1 g de solo foram acondicionadas em tubos de centrífuga e a estes adicionados 20 mL de tampão fosfato de sódio 60 mM, em triplicata. Estes tubos foram incubados sob agitação a 180 g e à temperatura de 28°C durante 15 minutos. 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 minutos a 28°C e 180 *g*. Em seguida, a reação enzimática foi paralisada com a adição de 20 mL de acetona p.a.. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 6000 *g*, e o sobrenadante filtrado em papel de filtro Whatman nº 4. As soluções resultantes da filtração foram avaliadas em espectrofotômetro (comprimento de onda a 490 nm). A atividade microbiana foi determinada pela quantidade de FDA hidrolisado, com auxílio das curvas-padrão obtidas de cada amostra. Para a determinação da curva-padrão, foram utilizadas as seguintes concentrações de fluoresceína: 0,25; 0,75; 2,0; 3,74 e 7,48 µg/mL.

A atividade microbiana foi avaliada nos tempos 0, 17 e 31 dias de incubação do solo.

3.7. Seleção de bactérias resistentes ao glifosato

Com intuito de encontrar bactérias nativas (autóctonas) do solo com capacidade para biodegradar o glifosato, 10 g (peso seco) de cada amostra de solo foram colocadas em frascos Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL⁻¹ de meio mineral (MM1) e adição de 100 µg.mL⁻¹ de glifosato. Foram incubadas em incubadora horizontal sob agitação de 200 *g* a temperatura de 28°C durante cinco dias. Ao término deste período, alíquotas de 10 mL⁻¹ foram retiradas dos frascos e transferidas a outros frascos contendo 50 mL⁻¹ de MM1 e 200 µg.mL⁻¹ de glifosato que foram incubados nas mesmas condições. Nova transferência foi realizada destes frascos para outros contendo 300 µg.mL⁻¹ de glifosato. Para as três concentrações de glifosato, no quinto dia, uma alíquota de 1 mL⁻¹ foi

retirada de cada frasco e então diluições seriadas foram feitas até a obtenção das diluições 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} que foram plaqueadas em AN e AN contendo $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do herbicida, dependendo do frasco do qual foram retiradas as alíquotas, sendo incubadas por 48 horas a 28°C e após, as colônias foram contabilizadas. Aquelas que suportaram a maior concentração do herbicida no meio formando colônias foram caracterizadas morfológicamente através da observação da forma, coloração, borda, brilho e consistência. A coloração de Gram foi realizada para maior detalhamento das colônias, sendo que as observações foram feitas no microscópio óptico no aumento da imagem de 1000 vezes. Frascos contendo MM1 sem adição de glifosato serviram como controle. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Apenas as cepas que conseguiram se multiplicar em meio contendo $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de glifosato foram purificadas e armazenadas para identificação por amplificação do gene 16S rDNA e para os experimentos de biodegradação de glifosato em biorreatores.

3.7.1. Manutenção das cepas

A manutenção das culturas foi realizada periodicamente, os repiques foram feitos a cada 60 dias e foram acompanhados de controle por microscopia para garantir a pureza das culturas. O meio de cultura utilizado para o estoque foi AN com adição de glifosato na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Adicionalmente, as culturas foram cultivadas em caldo Luria Bertani - LB (g.L^{-1} : glicose, 20; peptona, 10; extrato de levedura, 5; NaCl, 5) sem adição de

glifosato por 12 horas a 30°C e 120 rpm e então retiradas alíquotas e homogeneizadas com glicerol na proporção 80% de cultura e 20% de glicerol e acondicionadas a -18°C.

3.7.2. Identificação das cepas bacterianas selecionadas por amplificação do gene 16S rDNA

As bactérias que apresentaram capacidade de biodegradar o glifosato foram identificadas através da técnica de 16S rDNA, onde a sequência do 16S rDNA foi obtida após extração do DNA genômico, PCR, amplificação e sequenciamento (TAROUCO, 2009).

Cada cultura foi inoculada em caldo LB durante 24 horas a 30°C e 200 g, em duplicata. Para a extração do DNA o kit de extração utilizado foi PureLink™ Genomic DNA (Invitrogen) e o Kit utilizado para purificação foi PureLink™ PCR Purification (Invitrogen).

O DNA foi amplificado por desnaturação a 94°C (2 min), 36 ciclos de 94°C (1 min), 59°C (1 min) e 72°C (1 min), e um passo final de extensão de 72°C (5 min).

O marcador molecular utilizado no PCR foi 1 Kb plus DNA Ladder da Invitrogen.

Os primers utilizados foram: 16S R (ATTACCGCGGCTGCTGG) e 16S F (CCTACGGGAGGCAGCAG). O sequenciamento das amostras foi realizado na ACTGene Análises Moleculares (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o seqüenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6

(Applied Biosystems). O algoritmo BLAST foi utilizado para a busca por seqüências homólogas ao GenBank.

3.8. Biodegradação de glifosato, em biorreatores, por consórcio bacteriano

Com o intuito de verificar o perfil de biodegradação de glifosato, formou-se um consórcio bacteriano apenas com as bactérias isoladas dos solos coletados que sofreram pressão seletiva, suportando $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do herbicida.

O inóculo foi preparado a partir das cepas bacterianas isoladas, sendo estas inoculadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio LB adicionado de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de glifosato comercial e foram incubadas a 28°C e $200g$ por aproximadamente 24 horas.

O inóculo foi padronizado utilizando a DO igual 1 ($600\mu\text{m}$) de modo que cada isolado do consórcio fosse inoculado com a mesma concentração celular (10^6 UFC.mL^{-1}).

Os ensaios foram realizados em biorreatores (Biostat B Braun) de cultivo submerso com capacidade para 2L contendo 1,8 L de meio MM1 e $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de glifosato comercial e 200 mL de pré-inóculo por um período de 108 horas dias a 28°C . Duas diferentes situações de agitação e aeração foram avaliadas: **1)** 300 rpm e 2,5 vvm; **2)** 200 rpm e 0 vvm.

Alíquotas de 12 mL retiradas de 4 em cada 4 horas nas primeiras 12 h de cultivo e após esse período a cada 12 h durante cinco dias (108 horas), foram centrifugadas por 15 min, a 4°C e $2500g$. Foram feitas medições de pH,

o sobrenadante coletado foi congelado para posterior análise cromatográfica e a biomassa colocada em estufa a 75°C para análise do peso seco. A partir das amostras, foram realizadas diluições seriadas e estas plaqueadas em AN, para avaliar o número de unidades formadoras de colônias (UFC.mL⁻¹) ao longo do cultivo, como medida de multiplicação celular.

3.9. Determinação da degradação de glifosato por fatores abióticos

Para avaliar a existência da influência de fatores abióticos como exposição à luz e evaporação na avaliação da biodegradação de xenobióticos nos experimentos realizados neste trabalho, ensaios controle foram conduzidos sem a adição de inóculo celular.

Os ensaios foram realizados em biorreator conforme procedimento descrito no item 3.8.

3.10. Extração e análise de glifosato e AMPA do solo

As concentrações de glifosato e AMPA nos experimentos de degradação foram avaliadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) pelo Laboratório de Resíduos e Contaminantes da EMBRAPA MEIO AMBIENTE, Jaguariúna-SP.

3.10.1. Preparação e condicionamento de coluna de troca catiônica

3.10.1.1. Extração

Amostras de solo retiradas do experimento de incubação aos 0 e 32 dias (3 repetições), foram secas a 40°C por 48 horas e trituradas. Após, 20 g foram colocadas em tubos de centrifuga de 250 mL e acrescentados 80 mL de solução 0,25M de NH_4OH e 0,1M de KH_2PO_4 . Os frascos foram agitados deitados em *shaker* durante 90 min a 65 rpm. Após, foram centrifugados por 20 min a 3000g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de centrifuga sendo efetuada uma segunda extração do resíduo sólido com 80 mL da solução 0,25M de NH_4OH e 0,1M de KH_2PO_4 . O pH do sobrenadante foi ajustado para 2 com ácido clorídrico 6N, o peso dos frascos foi ajustado utilizando HCL 0,01M, sendo centrifugados novamente por 10 min a 2500g. O sobrenadante foi transferido para um balão de fundo redondo de 500 mL com auxílio de um funil analítico contendo lã de vidro. O procedimento acima foi repetido para o sobrenadante da segunda extração no tubo de centrifuga. O volume foi reduzido aproximadamente 5 mL sob vácuo numa temperatura de 60°C.

O extrato reduzido foi transferido para um tubo de centrifuga de 50 mL com lavagens de HCL 0,01M. O pH do extrato do solo foi ajustado para 1,8-2,0 com NH_4OH concentrado e centrifugado a 4000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi passado para um tubo graduado e o volume ajustado para aproximadamente 10 mL com HCL 0,01M. O volume obtido foi anotado para os devidos cálculos.

3.10.1.2. Limpeza do extrato por cromatografia em resina AG 50-W

Foi introduzida na coluna uma pasta preparada com 50g de resina AG 50-W e HCL 0,01M, sem deixar secar. A coluna foi condicionada com mais 200 mL de HCL 0,01M 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 0,01M 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 5 porções de 55 mL de HCL 0,01M (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 (0,005M 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 Milipore de 0,45 µm e analisada por HPLC com detector de fluorescência.

3.11. Sistema cromatográfico

3.11.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

O equipamento consiste num modelo Merck Hitachi (L-7485) com colunas analíticas para glifosato (300 mm x 4,6 mm d.i. e 150 mm x 4,6 mm d.i., resina iônica, forma K⁺, suporte poliestirenodivinilbenzeno) mantida à

temperatura de 50°C. A taxa de fluxo da fase móvel foi de 0,7 mL.min⁻¹. O volume injetado da amostra foi de 100µL.

3.11.2. Determinação de glifosato e AMPA e reação pós-coluna

Para determinação do glifosato foi necessária uma reação pós-coluna para glicina à 38°C, seguida de derivatização com o-ftalaldialdeído e mercaptoetanol (OPA-MERC) num espiral de aço inoxidável (2m x 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 2-mercaptoetanol e 25 g de ácido bórico dissolvido em 1 L de água deionizada.

Duas bombas peristálticas foram usadas para obtenção de um fluxo de 0,2 mL/min para a solução oxidante e 0,5 mL/min para solução de OPA.

3.11.3. Detecção

Detector de fluorescência com comprimento de onda de excitação de 350 nm e de emissão de 440 nm foi utilizado para a detecção de glifosato e AMPA e um integrador.

Uma curva de calibração foi construída para determinação de glifosato com soluções em concentrações que variaram de 0,01 µg.mL⁻¹ a 0,80 µg.mL⁻¹ para amostras de biorreator com 2,5 vvm e 0,02 µg.mL⁻¹ a 0,04 µg.mL⁻¹ para biorreator em condição de 0 vvm, respectivamente (Figuras 3 e 4).

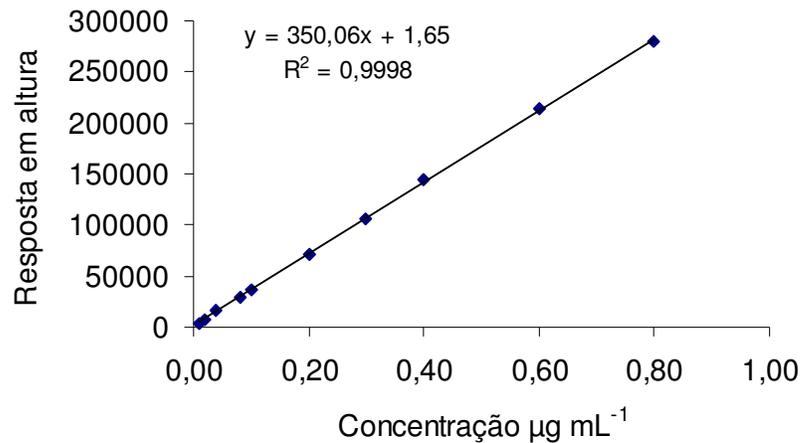


Figura 3. Curva de calibração de soluções de glifosato padrão com concentrações entre 0,01 µg.mL⁻¹ e 0,80 µg.mL⁻¹ para amostras de biorreatores com 2,5 vvm.

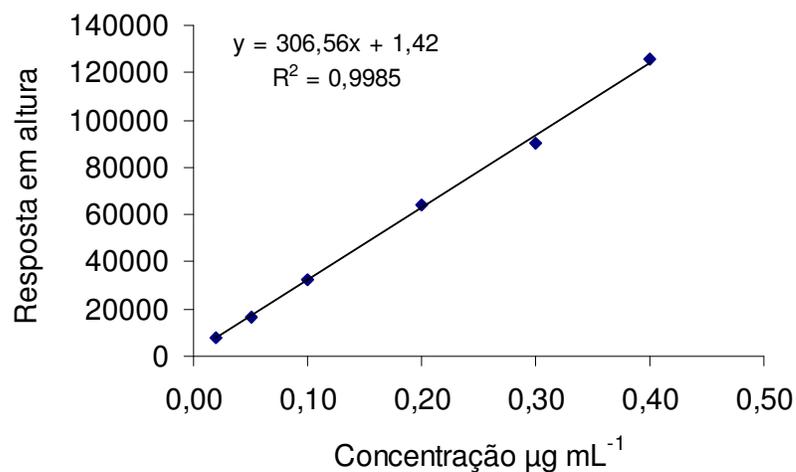


Figura 4. Curva de calibração de soluções de glifosato padrão com concentrações entre 0,02 µg.mL⁻¹ e 0,40 µg.mL⁻¹ para amostras de biorreatores com 0 vvm.

Uma curva de calibração foi feita com soluções padrão de AMPA em concentrações que variaram de 0,01 µg.mL⁻¹ a 0,80 µg.mL⁻¹ para amostras de biorreator com 2,5 vvm e 0,02 µg.mL⁻¹ a 0,3 µg.mL⁻¹ para biorreator em condição de 0 vvm, respectivamente (Figuras 5 e 6).

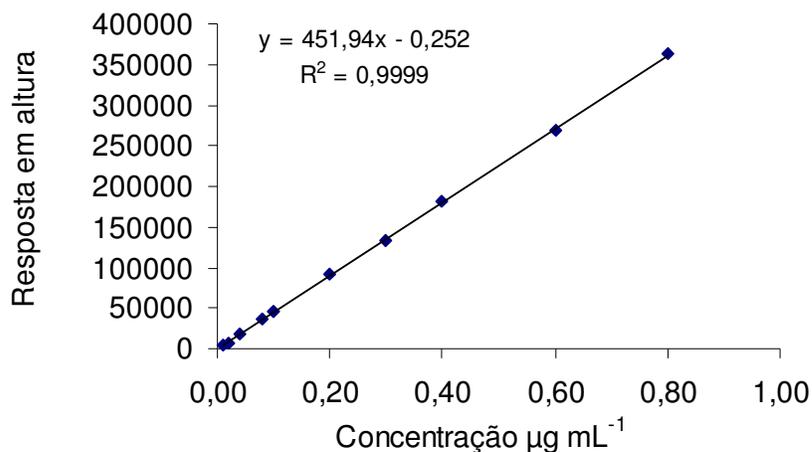


Figura 5. Curva de calibração de soluções de AMPA padrão com concentrações entre $0,01 \mu\text{g},\text{mL}^{-1}$ e $0,80 \mu\text{g},\text{mL}^{-1}$ para amostras de biorreatores com 2,5 vvm.

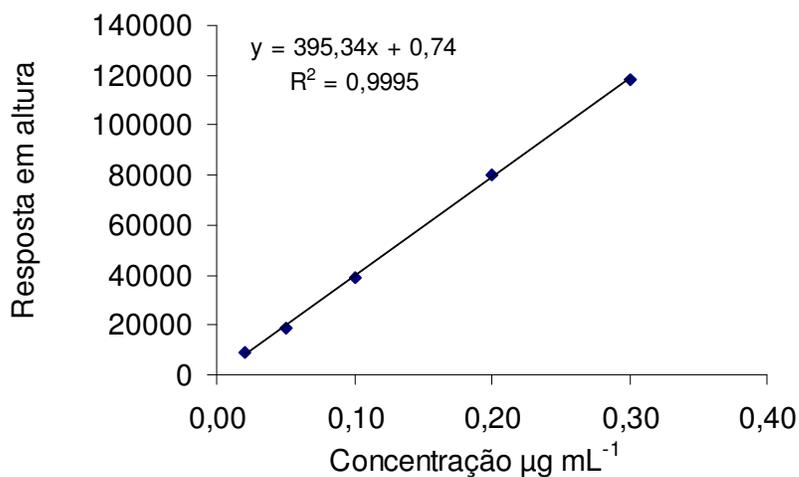


Figura 6. Curva de calibração de soluções de AMPA padrão com concentrações entre $0,02 \mu\text{g},\text{mL}^{-1}$ e $0,40 \mu\text{g},\text{mL}^{-1}$ para amostras de biorreatores com 0 vvm.

3.12. Análise de Glifosato e AMPA em amostras líquidas

As concentrações de glifosato e AMPA nos experimentos de biodegradação em biorreatores, também foram analisadas por cromatografia

líquida de alta eficiência (CLAE) realizada pelo Laboratório de resíduos e contaminantes da Embrapa Meio Ambiente.

A análise seguiu os procedimentos utilizados para as análises de amostras de solo, porém, nas amostras líquidas, não foi preciso realizar extração.

3.13. Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Em caso de significância, os fatores avaliados foram analisados através de comparação de médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e teste t ($p \leq 0,05$) (fatores qualitativos) e regressão ($p \leq 0,05$) (fatores quantitativos).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Biodegradação de glifosato no solo

Na análise dos resultados da biodegradação do glifosato, obtidos através da liberação de CO₂ pelos microrganismos do solo, no período de 32 dias após a aplicação observou-se que nos tratamentos em que foi aplicado o glifosato a quantidade máxima de CO₂ foi de 3,48; 2,60; 3,10; 2,70; 1,75 e 3,45 µg/g de solo, para os solos 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente (Figura 7). Estes resultados não foram estatisticamente superiores aos encontrados para os tratamentos sem aplicação do produto, que apresentaram quantidades de CO₂ liberado, no mesmo período, de 3,20; 2,28; 2,44; 1,34; 1,23 e 2,27 µg/g de solo, respectivamente, para os solos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (Figura 8).

Os resultados sugerem que a microbiota do solo pode utilizar o glifosato como fonte de carbono para seu metabolismo, porém sem ocasionar incremento na respiração microbiana, medida pelo desprendimento de CO₂ dos solos analisados. A liberação de CO₂ do solo tem sido utilizada como índice do metabolismo do carbono lábil do solo, de atividade microbiana e da biomassa ativa (SOUZA et al., 1999). De acordo com Grossbard & Atkinson (1985), dependendo da concentração usada, o glifosato pode causar inibição ou estimulação da capacidade respiratória do solo. Entretanto, a produção de CO₂

está diretamente relacionada com a decomposição do herbicida no solo (WARDLE & PARKINSON, 1990).

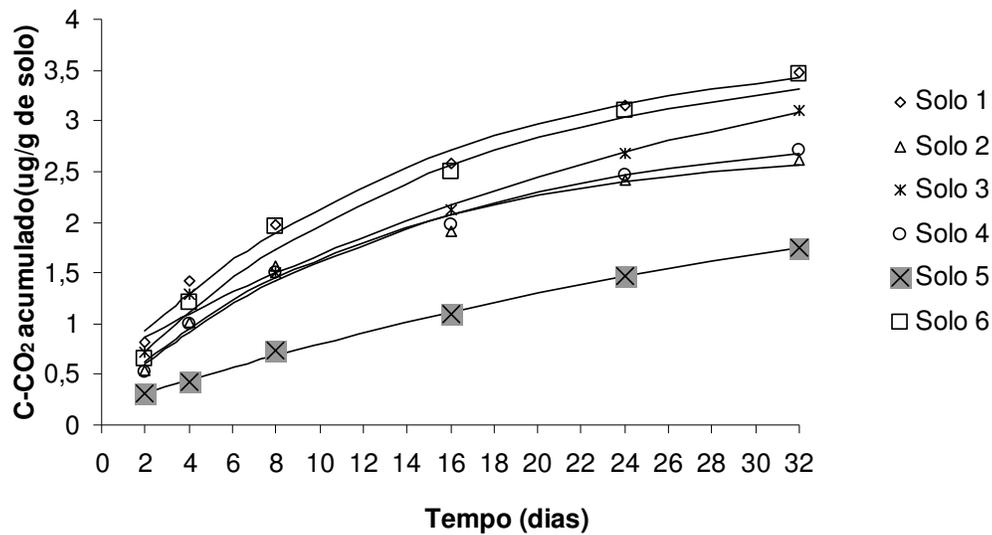


Figura 7. Liberação de CO₂ acumulado nas amostras dos solos com adição de 2,52 mg i. a./Kg⁻¹ solo de glifosato ao longo de 32 dias de incubação, a 28°C (±2), no escuro.

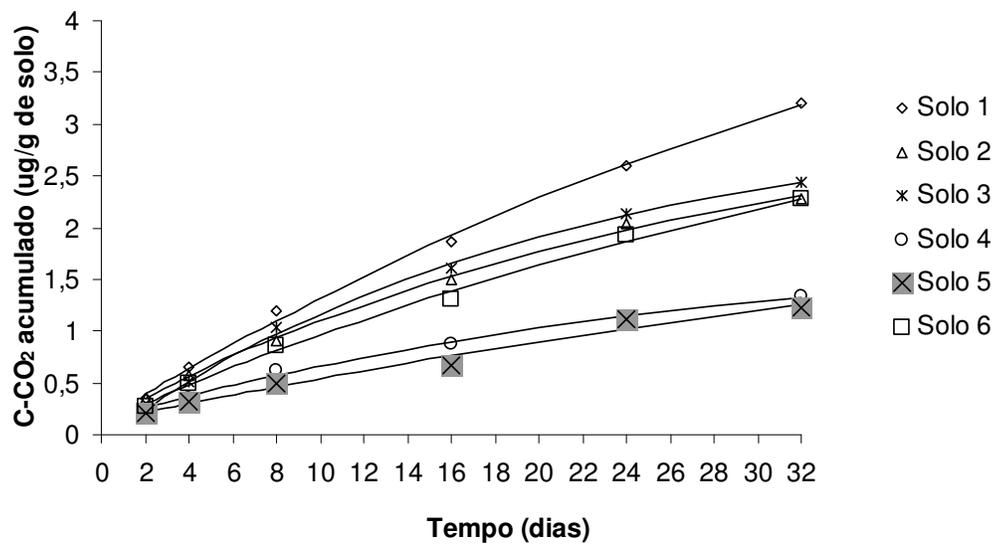


Figura 8. Liberação de CO₂ acumulado nas amostras de solo sem adição de glifosato ao longo do período de incubação de 32 dias, a 28°C (±2), no escuro.

Através da análise dos resultados da respiração microbiana, pela liberação de dióxido de carbono pelos microrganismos do solo, verificou-se rápida degradação do glifosato aplicado nos solos na fase inicial de incubação, seguida por uma estabilização na quantidade de CO₂ desprendida pelos microrganismos (Tabela 4). Em geral, pode-se observar que a maior degradação de glifosato ocorreu até o 16º dia com dados variando de 50 a 77% (Figuras 7 e 8 e Tabela 4) indicando que a atividade microbiana é alterada em função do tempo de uso do herbicida no solo.

A relação entre a aplicação e não aplicação de glifosato aos 32 dias após a incubação, na concentração de 2,52 mg.Kg⁻¹ de solo, foi de 8 e 50% superiores para os solos 1 e 4 que receberam aplicação, respectivamente (Figuras 7 e 8 e Tabela 4). Estes dados podem decorrer da elevada afinidade das bactérias pelo glifosato nos solos onde o histórico de aplicação de glifosato é maior. Em solos com maior histórico de aplicação de glifosato, os microrganismos presentes podem apresentar maior afinidade com o substrato (molécula herbicida) proporcionando maior degradação do mesmo.

Sprankle (1975) e Souza (1994) verificaram que o glifosato sofre rápida decomposição inicial e que cerca de 8 a 10 dias após a incubação do solo há uma estabilização na respiração microbiana sugerindo que a partir desse período a degradação do mesmo 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. Passado este período, o produto fica indisponível, conforme

observado pela redução da ação microbiana com o passar do tempo indicando redução na disponibilidade do produto a ser decomposto.

Tabela 4. Dióxido de carbono ($\mu\text{g.g}^{-1}$ solo) liberado por microrganismos do solo devido a biodegradação do glifosato.

Solos	Tempo (dias)					
	2	4	8	16	24	32
1	0,46 ¹	0,77	0,78	0,72	0,56	0,27
2	0,18	0,44	0,66	0,41	0,36	0,33
3	0,49	0,79	0,46	0,52	0,55	0,66
4	0,29	0,64	0,88	1,10	1,33	1,37
5	0,10	0,10	0,23	0,42	0,36	0,52
6	0,36	0,67	0,99	1,12	1,1	1,09

¹ Média de três repetições.

Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Araújo (2002) que observou quantidades de CO_2 liberados por solos com aplicação de glifosato variando de 15 a 30% superiores do que nos solos controle. Resultado semelhante foi descrito por Robertson & Alexander (1994) que verificaram em seus estudos 50% de mineralização do herbicida aplicado em dez dias e que, após segunda aplicação, 60% do composto foi convertido a dióxido de carbono.

Lancaster et al. (2009) observaram que a taxa constante de mineralização é maior para uma aplicação do que para cinco aplicações de glifosato, indicando que a mineralização mais lenta de glifosato ocorreu quando mais glifosato foi aplicado. O montante total de ^{14}C mineralizado no 14º dia depois da aplicação final de glifosato, para cada tratamento foi reduzido quando glifosato foi aplicado quatro ou cinco vezes em comparação do montante cumulativo de ^{14}C mineralizado seguindo uma, duas ou três aplicações.

Os resultados do trabalho realizado por Tejada (2009) mostraram 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 devido ao processo de adsorção desta molécula orgânica com íons metálicos.

Gomez et al. (2008) 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.

4.2. Quantificação de bactérias do solo

De forma geral, notou-se que nos solos que receberam aplicação do herbicida, a quantidade de bactérias diminuiu no decorrer do período de incubação (Tabela 5). Por possuírem histórico de aplicação do produto e por acreditar-se que as bactérias presentes estavam adaptadas ao herbicida, esperava-se que a quantidade de bactérias nos solos aumentasse. Porém, o único solo que manteve a quantidade de bactérias constante foi o solo com histórico de 29 anos de aplicação do herbicida. A maioria dos resultados obtidos mostraram 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 dos solos. Nos resultados de Castro Júnior et al. (2006), a adição de glifosato no solo não exerceu efeito negativo na população de bactérias.

De acordo com Anderson (1978), herbicidas não causam efeitos negativos nos microrganismos do solo se utilizados nas doses recomendadas. Wardle & Parkinson (1990) observaram um incremento no número de bactérias quando glifosato foi aplicado no solo.

Tabela 5. Número de UFC nas amostras dos solos avaliados em diferentes períodos de incubação. Média de três repetições.

Solos	(UFC/ g ⁻¹ solo)		
	2 dias	16 dias	32 dias
1	2,2 x 10 ²	1,1 x 10 ²	3,5 x 10 ¹
Controle	5,0 x 10 ¹	5,8 x 10 ¹	1,9 x 10 ¹
2	1,0 x 10 ²	3,4 x 10 ¹	3,6 x 10 ¹
Controle	5,3 x 10 ¹	7,0 x 10 ¹	2,6 x 10 ¹
3	1,0 x 10 ²	4,7 x 10 ¹	3,7 x 10 ¹
Controle	8,2 x 10 ¹	1,9 x 10 ¹	2,0 x 10 ¹
4	3,4 x 10 ²	2,1 x 10 ²	3,5 x 10 ¹
Controle	1,0 x 10 ²	4,3 x 10 ¹	2,6 x 10 ¹
5	6,6 x 10 ¹	3,4 x 10 ¹	4,1 x 10 ¹
Controle	4,9 x 10 ¹	4,4 x 10 ¹	2,8 x 10 ¹
6	2,2 x 10 ²	9,3 x 10 ¹	6,9 x 10 ¹
Controle	1,7 x 10 ²	6,2 x 10 ¹	7,8 x 10 ¹

4.3. Atividade microbiana do solo

Observando os resultados das amostras analisadas no decorrer do período de incubação nota-se que ocorreu aumento significativo da atividade microbiana para a maioria dos solos analisados (Figura 9). Os solos que receberam aplicação de glifosato antes da incubação mostraram atividade microbiana maior do que os solos sem aplicação. A partir desses resultados acredita-se que o glifosato pode ter sido utilizado pelos microrganismos do solo como fonte de nutrientes.

O único solo em que a atividade microbiana decresceu ao longo de 32 dias de incubação foi aquele que não recebe aplicação do herbicida glifosato e que não foi contaminado com o herbicida antes da incubação, sendo considerado pomar orgânico de maçã (Figura 9). Este solo é rico em matéria orgânica devido à grande quantidade de cobertura vegetal presente e que, ao completar seu ciclo, libera nutrientes para o solo, conseqüentemente, serve de fonte de nutrientes para os microrganismos, o que pode explicar a alta atividade no início do período de incubação. Os microrganismos deste solo não utilizam a molécula de imediato, e passam a utilizá-la ao longo do experimento, por falta de nutrientes como carbono na matéria orgânica. Estes resultados corroboram com os dados obtidos no experimento de biodegradação de glifosato onde a liberação de CO₂ foi superior nos solos com maior histórico de uso do mesmo e com aplicação do produto antes do período de incubação, quando comparado com solo sem aplicação. Os solos com tempo maior de uso mostraram diferença na liberação de CO₂ nos solos com aplicação do herbicida, demonstrando que a atividade microbiana também é estimulada (maior) nestes solos do que naqueles com menor tempo de uso do glifosato.

A atividade microbiana dos solos utilizados nos ensaios de biodegradação foi analisada pela técnica da hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) que pode ser aplicada em estudos comparativos de atividade microbiana em ambientes naturais e que tem como vantagem ser simples, sensível e rápida (SCHNÜNRER & ROSSWALL, 1982).

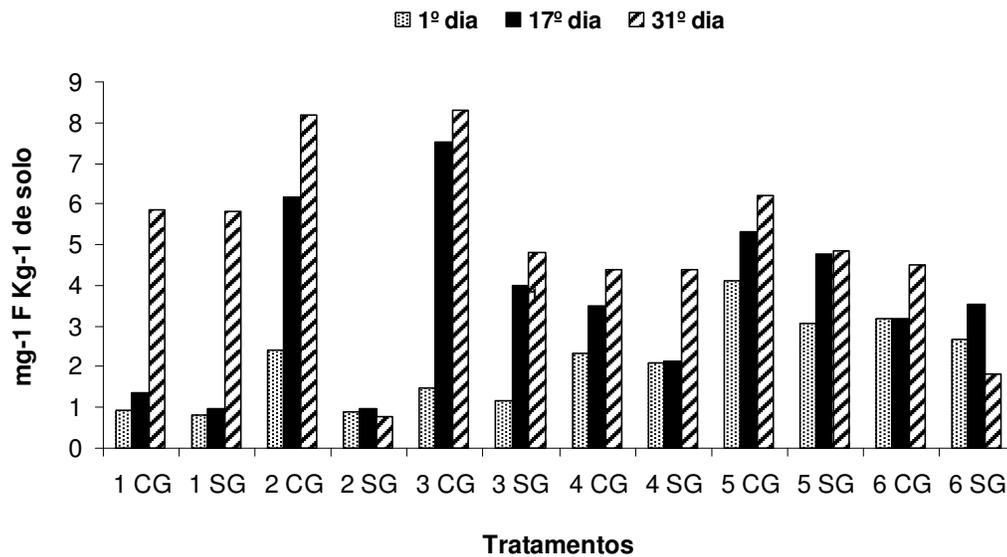


Figura 9. Atividade microbiana das amostras de solos estudadas ao longo de 32 dias de incubação. CG = com aplicação de glifosato; SG = sem aplicação de glifosato.

Os solos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 com aplicação do herbicida antes da incubação apresentaram valores de 5,86, 8,17, 8,31, 4,40, 6,20 e 4,50 mg^{-1} FDA/ Kg^{-1} de solo, respectivamente, que foram superiores estatisticamente para a maioria dos solos, aos valores encontrados em seus controles, 5,83, 0,78, 4,79, 4,39, 4,83 e 1,82 mg^{-1} FDA/ Kg^{-1} de solo ao final de 31 dias de incubação (Figura 9).

Os resultados de atividade microbiana avaliada pela liberação de CO_2 podem ser correlacionados com a atividade microbiana avaliada pela hidrólise do diacetato de fluoresceína, apresentadas pelos solos avaliados. Em geral, observa-se que os solos que apresentaram atividades microbianas maiores, também apresentaram uma maior quantidade de CO_2 desprendido durante o período de incubação.

Atividades enzimáticas microbianas são consideradas parâmetros sensíveis a mudanças no ambiente causadas por fatores naturais ou induzidos pelo homem. Desidrogenases são associadas com células viáveis e podem fornecer informações sobre o estado fisiológico dos microrganismos. A atividade da desidrogenase aumenta como um resultado da aplicação de glifosato no solo no início da incubação, independentemente das doses de glifosato (GOMEZ et al., 2008).

Segundo Heinonen-Tanski (1989), solos com alta atividade microbiana favorecem a rápida degradação e em solos com baixa atividade, o glifosato permanece por mais tempo intacto.

A atividade microbiana influencia o comportamento do herbicida no solo. Para Haney et al. (2002), a aplicação de glifosato no solo aumenta a biomassa microbiana e a atividade enzimática do solo.

Zabaloy et al. (2008) observaram um aumento temporário na atividade enzimática (FDA) da comunidade bacteriana do solo, duas semanas depois da adição do glifosato. Os referidos autores mostraram mínima mudança na diversidade metabólica da cultura bacteriana e nenhum efeito sobre substrato, devido a aplicações de glifosato a longo prazo. Como resultado de exposição prévia da comunidade microbiana nestes solos pode ser capaz de se adaptar rapidamente a taxas de entrada do herbicida. Concluíram que todos os resultados obtidos no estudo mostram claramente que os herbicidas exercem poucos efeitos na microbiota do solo, em doses dez vezes maiores que a recomendada para campo.

Araújo et al. (2003) observaram efeitos positivos a curto e longo prazo do glifosato (2.16 mg Kg^{-1}) sobre a atividade microbiana pelo aumento da atividade FDA nos solos. Muitos estudos mostraram que a atividade da desidrogenase aumenta no solo quando o conteúdo de AMPA aumenta (TEJADA, 2009). De Andréa (2003) utilizou a formulação comercial e relatou que após repetidas aplicações de glifosato (Nortox®), a biomineralização deste diminuiu, indicando um decréscimo na atividade microbiana.

4.4 Seleção de bactérias resistentes ao glifosato

Pressão seletiva foi realizada com o objetivo de selecionar as bactérias que suportaram alta concentração de glifosato sendo capazes de utilizá-lo como fonte de energia e carbono.

Observou-se que houve incremento no número de UFC da menor concentração do herbicida para a maior, em todos os solos estudados (Tabelas 6 e 7). Na concentração de $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$, os solos 2 e 3 apresentaram número maior de bactérias em relação aos demais solos e não diferiram entre si estatisticamente. Os resultados obtidos sugerem que as bactérias que resistiram à concentração mais alta de herbicida testada no trabalho, são capazes de utilizá-lo como fonte de carbono e energia para seu crescimento e como uma quantidade maior do produto estava disponível apresentaram grande multiplicação. Entretanto, houve pouca variedade de cepas que se multiplicaram na última concentração utilizada em todos os solos (Tabela 8).

Tabela 6. Quantificação de bactérias de todos os solos analisados em diferentes doses de glifosato. Média de três repetições.

Solo	(UFC/ g-1 solo)		
	100 ($\mu\text{g i.a./mL}^{-1}$)	200 ($\mu\text{g i.a./mL}^{-1}$)	300 ($\mu\text{g i.a./mL}^{-1}$)
1	$1,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$3,2 \times 10^2$
Controle	$1,2 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$
2	$1,6 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	$4,1 \times 10^2$
Controle	$1,8 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$
3	$1,6 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$	$3,9 \times 10^2$
Controle	$2,4 \times 10^2$	$2,2 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$
4	$2,4 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$
Controle	$2,1 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$2,7 \times 10^2$
5	$1,5 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$2,7 \times 10^2$
Controle	$2,8 \times 10^2$	$2,1 \times 10^2$	$2,2 \times 10^2$
6	$2,7 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$2,9 \times 10^2$
Controle	$3,8 \times 10^2$	$2,1 \times 10^2$	$2,1 \times 10^2$

Tabela 7. Número de cepas morfológicamente diferentes isoladas dos solos estudados e que cresceram em três concentrações de glifosato. Vacaria, 2010.

Solos	(UFC/ g ⁻¹ solo)		
	100 ($\mu\text{g i.a./mL}^{-1}$)	200 ($\mu\text{g i.a./mL}^{-1}$)	300 ($\mu\text{g i.a./mL}^{-1}$)
1	5	3	2
2	4	3	2
3	3	3	2
4	3	3	3
5	3	3	3
6	5	3	3

De acordo com os resultados do número de cepas morfológicamente distintas, observa-se que, em geral, houve uma pressão seletiva das bactérias ao longo do experimento, pois o número e a variedade de cepas foram reduzindo e se mantendo com o aumento da concentração do herbicida (Tabelas 7 e 8).

Na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, obteve-se 23 isolados de todos os solos sendo que 12 diferiram quanto a morfologia. O total de isolados na concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi de 18 sendo 8 os tipos morfológicos e na última concentração, $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$, 15 isolados ao total e dentre estes apenas 6 apresentaram diferenças morfológicas. Estas seis cepas tinham o formato de bastonetes e a maioria era gram-negativa (Tabela 8).

Segundo Lancaster et al. (2009), o aparente aumento em bactérias gram-negativas é significativo, pois muitas bactérias capazes de degradar glifosato são espécies gram-negativas, entretanto, algumas bactérias gram-positivas também são capazes de degradá-lo.

Tabela 8. Resultado da coloração de Gram das cepas provenientes da concentração de $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de glifosato.

Solos	Frequência (%)	
	Gram +	Gram -
1	50	50
2	50	50
3	50	50
4	33,3	66,6
5	33,3	66,6
6	33,3	66,6

Tarouco (2009) reportou que a maioria das bactérias isoladas de solos contaminados com glifosato eram gram-negativas e apresentavam formato de bastonete estando em conformidade com os resultados obtidos no presente trabalho.

As seis cepas que resistiram a concentração máxima de glifosato e que diferiram morfológicamente formaram o consórcio que foi submetido aos ensaios de biodegradação em biorreatores e que foram identificadas por

amplificação do gene 16S rDNA como sendo as bactérias com capacidade para biodegradar o glifosato.

4.5 Identificação das cepas bacterianas selecionadas por amplificação do gene 16S rDNA

As seis cepas que demonstraram resistência ao glifosato foram identificadas pela técnica de amplificação do gene 16S rDNA e seqüenciamento. Os produtos de PCR foram seqüenciados e as sequências obtidas submetidas a alinhamento por BLASTn contra os bancos de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Altos escores de alinhamento foram produzidos pelas sequências que identificaram as bactérias como *Microbacterium* sp., *Pseudomonas* sp., duas cepas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* sp. e *Arthrobacter* sp.

Em muitos trabalhos sobre a biodegradação de glifosato, cepas de *Pseudomonas* são citadas. Dick & Quinn (1995) testaram a capacidade de *Pseudomonas* sp. 4ASW em metabolizar o glifosato na presença de uma fonte de fosfato inorgânico. O metabolismo do glifosato foi reprimido na presença de fosfato inorgânico. Níveis de absorção do herbicida nas células submetidas ao jejum prolongado de fósforo foram até 20 vezes maiores do que em células em crescimento ativo sobre o glifosato. Uma cepa de *Pseudomonas* sp. (PG2982) foi isolada de uma cultura de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e se mostrou capaz para utilizar glifosato como fonte de fósforo (MOORE et al., 1983). Esta mesma cepa foi submetida a estudo sobre o catabolismo do glifosato observando-se que deste processo resulta a utilização da glicina

oriunda da clivagem da sarcosina na formação de proteínas e bases purinas (SHINABARGER & BRAYMER, 1986). Pipke & Amrhein (1988) isolaram e caracterizaram um mutante de *Arthrobacter* sp. a cepa GLP-1 que conseguiu utilizar o herbicida como única fonte de fósforo e nitrogênio.

Schultz et al. (1985) verificaram o crescimento de algumas bactérias em meio com adição de 5 mM de glifosato e a bactéria *Serratia marcescens* W225 apresentou ótimo crescimento em relação as demais espécies.

4.6 . Perfil da biodegradação de glifosato, em biorreatores, por consórcio bacteriano

Com intuito de avaliar os resultados obtidos da biodegradação e otimizar o processo, duas condições de cultivo que diferiram na aeração e agitação foram utilizadas. Os seis isolados inoculados juntos e na mesma concentração celular inicial formaram o consórcio usado nestes ensaios.

O consórcio bacteriano na condição de cultivo 1 (aeração: 2,5 vvm e agitação: 300 rpm) propiciou melhores resultados em termos de quantificação de bactérias e degradação de glifosato quando comparado com os resultados obtidos na condição de cultivo 2 (aeração: 0,0 vvm e agitação: 200 rpm) (Figuras 10 e 11). As bactérias que formaram o consórcio bacteriano, provavelmente são aeróbias, visto que foram isoladas de solos e, portanto, apresentam melhor desempenho na presença de oxigênio, o que se observou nos resultados do trabalho.

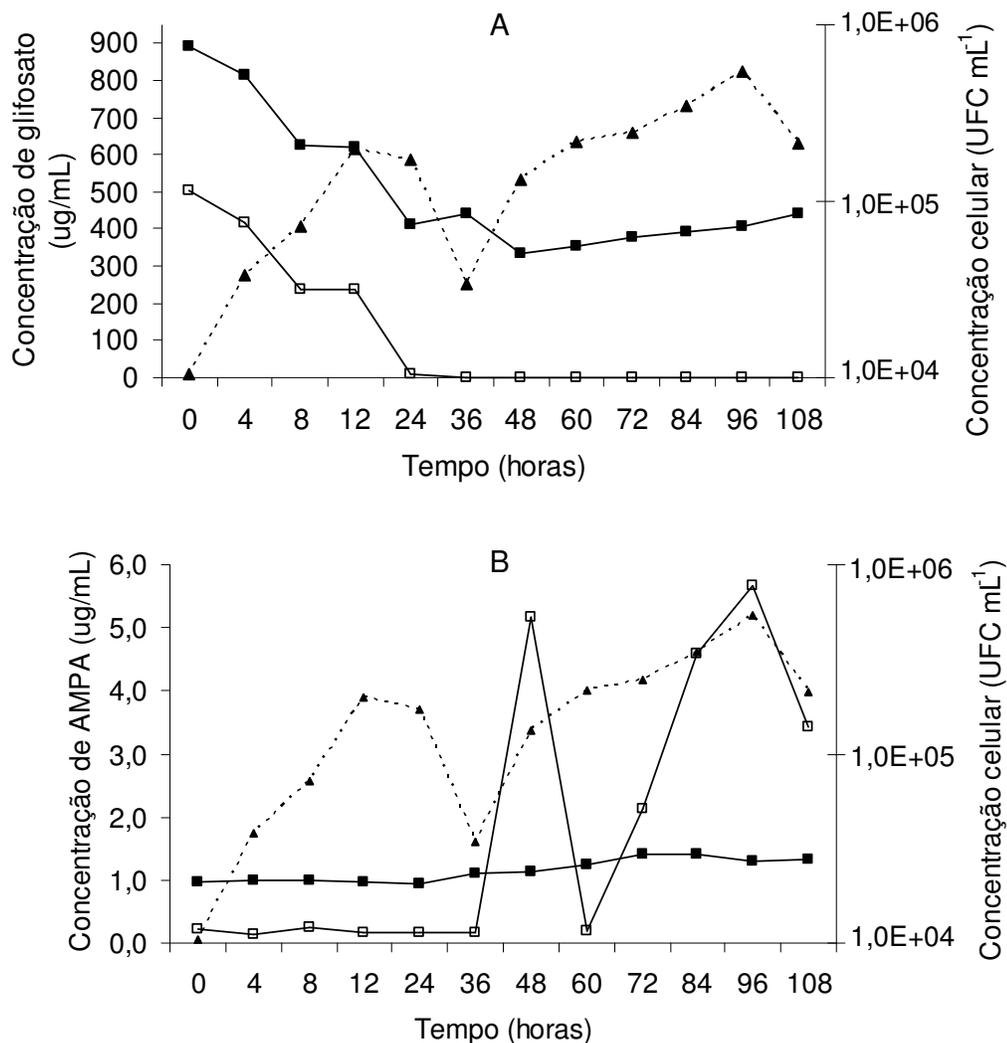


Figura 10. Perfil de detecção de glifosato (A) e AMPA (B) e da multiplicação bacteriana durante o cultivo do consórcio bacteriano em biorreator na seguinte condição: aeração 2,5 vvm e agitação de 300 rpm. (-▲-) concentração celular no meio de cultura com adição de glifosato ($300 \mu\text{g. mL}^{-1}$), (-□-) concentração de glifosato e AMPA em meio com inóculo celular, (-■-) concentração de glifosato e AMPA em meio sem inóculo celular.

Os melhores resultados de degradação e multiplicação celular obtidos foram os apresentados pelo consórcio bacteriano em biorreator com a presença de oxigênio e alta agitação, sendo capaz de degradar $504,33 \text{ mg.L}^{-1}$ de glifosato, o que representa 99,9 % do total de herbicida neste cultivo.

Tarouco (2009) verificou 31% do glifosato degradado em condições semelhantes às usadas neste trabalho. Ao passo que, a quantidade de AMPA aumentou à medida que glifosato foi degradado (Figura 10). A condição 2 (agitação: 200 rpm e aeração: 0 vvm) apresentou menor formação de biomassa e também uma menor eficiência de degradação.

O consórcio sob a condição 2 (agitação: 200 rpm e aeração: 0 vvm) apresentou menor quantidade de bactérias e também menor eficiência de degradação de glifosato, conseqüentemente, menor produção de AMPA. Indicando que, possivelmente, a ausência de oxigênio não é a condição ideal para as bactérias que degradam glifosato representado pela estabilidade na multiplicação das mesmas em função do tempo (Figura 11).

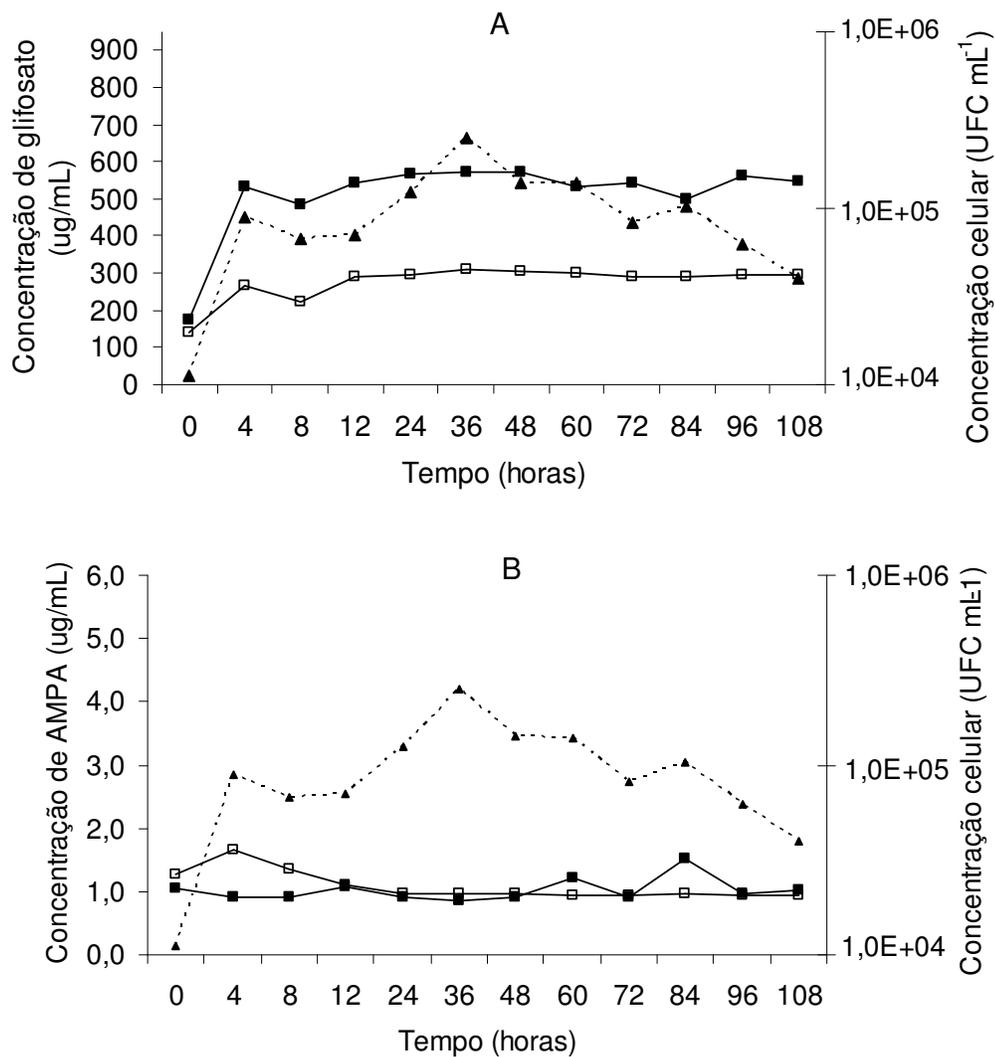


Figura 11. Perfil de detecção de glifosato (A) e AMPA (B) e do crescimento de bactérias durante o cultivo do consórcio bacteriano em biorreator na condição: aeração 0 vvm e agitação de 200 rpm. (-▲-) concentração celular no meio de cultura com adição de glifosato ($300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), (-□-) concentração de glifosato e AMPA em meio com inóculo celular, (-■-) concentração de glifosato e AMPA em meio sem inóculo celular.

SEHNEM (2009) estudou a biodegradação de tebuconazole em biorreatores testando duas condições de cultivo que variaram na concentração de glicose ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) e na temperatura (30°C e 37°C). O inóculo foi formado com as cepas *Enterobacter sakazakii* e *Serratia marcescens*. Verificou

em seus resultados que no cultivo contendo 1 g.L⁻¹ de glicose a 30°C houve 39% de degradação de tebuconazole.

4.7. Análise de glifosato e AMPA no solo

Os resultados encontrados após o período de incubação de 32 dias mostram que a quantidade de glifosato diminuiu no solo. No solo 1 98,5% do glifosato foi degradado pelos microrganismos e o solo 5 apresentou a menor quantidade de glifosato degradada, 51,8% (Tabela 9).

O metabólito AMPA foi encontrado nas amostras de solo ao término da incubação em quantidades de 221,27; 531,28; 276,97; 337,71; 310,16 e 321,55 mg.kg⁻¹, mostrando ser o principal produto da degradação de glifosato (Tabela 10). 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). Estes resultados estão em conformidade com aqueles obtidos nos experimentos de biodegradação de glifosato por avaliação da liberação de CO₂, atividade microbiana e quantificação de bactérias, nos quais se observou a diminuição do glifosato ao longo de 32 dias de incubação, mostrando que as bactérias presentes nestes solos são capazes de degradar o herbicida.

Tabela 9. Quantidade de glifosato (mg.Kg^{-1}) nas amostras de solos analisados no início e no final do período de incubação e porcentual de glifosato degradado pelos microrganismos do solo.

Solos	Períodos		Degradação (%)
	0 dias	32 dias	
1	1940,9	28,9	98,5
Controle	0,07	— ²	—
2	2382,3	127,3	94,7
Controle	0,07	—	—
3	1875,6	86,7	95,4
Controle	0,24	—	—
4	1075,3	174,4	83,8
Controle	0,05	—	—
5	1783,7	859,1	51,8
Controle	0,6	—	—
6	1451,1	114,5	92,1
Controle	¹ nd	—	—

¹nd = não detectado; ² — = análise não realizada.

Tabela. 10. Quantidade de AMPA (mg.Kg^{-1}) nas amostras de solos analisados no início e no final do período de incubação e incremento de AMPA devido a biodegradação de glifosato.

Solos	Períodos		Incremento*
	0 dias	32 dias	
1	71,2	221,27	2,1
Controle	0,21	— ¹	—
2	10,04	531,28	52,0
Controle	0,42	—	—
3	23,91	276,97	10,6
Controle	0,61	—	—
4	163,51	337,71	1,1
Controle	0,29	—	—
5	56,75	310,16	4,5
Controle	1,27	—	—
6	157,81	321,55	1,0
Controle	0,07	—	—

¹ análise não realizada.

* vezes que a quantidade de AMPA aumentou no final da incubação.

Miles & Moye (1988) estudaram a extração alcalina do glifosato com hidróxido de potássio de dois solos argilosos com filtração do sobrenadante e concentração do filtrado por evaporação rotativa. A determinação de resíduos do herbicida foi realizada pela derivatização de extratos do solo e análises por HPLC com detecção fluorimétrica onde os autores obtiveram recuperações de $119\% \pm 18,1\%$ e $108\% \pm 13,9\%$ para glifosato e AMPA. Araújo (2002) analisou glifosato em dois tipos de solos brasileiros, ambos argilosos, por HPLC e encontrou recuperações entre 71% a 110%. Entretanto, Spann & Hargreaves (1994) encontraram recuperações de glifosato que variaram de 80% a 90% em solos com teores diferentes de argila, utilizando extração alcalina (0,1M KOH) e limpeza do extrato com coluna de troca catiônica.

Para Spann & Hargreaves (1994), condições alcalinas fazem com que a eficiência da extração do glifosato do solo aumente, visto que este também possui cargas negativas nesta condição.

A presença de pequenas concentrações de glifosato e AMPA foi detectada nas amostras de solo controle (Tabela 10). Provavelmente, o surgimento dessas concentrações de glifosato e seu metabólito AMPA ocorra devido às constantes aplicações do herbicida nesses solos. No solo 6 a presença de glifosato não foi detectada, por ser cultivado com pomar orgânico de maçã, o qual não recebe aplicações do herbicida. Porém, uma insignificante concentração de $0,07 \text{ mg.kg}^{-1}$ de AMPA foi detectada. Acredita-se que este solo já tenha recebido aplicações do herbicida por apresentar resíduos de seu principal metabólito AMPA no local, mesmo que aplicado a muito tempo. Analisando os resultados encontrados após o período de 32 dias de incubação,

acredita-se que o glifosato foi degradado para o seu principal metabólito AMPA e que o método de extração e análise utilizados tornou possível sua detecção no extrato.

A análise do herbicida pode ser prejudicada pelos vários interferentes que o solo possui, devendo estes serem removidos por um *cleanup* eficiente das amostras (ARAÚJO, 2002), e para tanto, a coluna de troca catiônica torna-se importante. É necessário o ajuste do pH do extrato para 2 antes de passar pela coluna, pois neste valor de pH o glifosato apresenta carga positiva facilitando sua interação com componentes da resina trocadora de cátions (SPANN & HARGREAVES, 1994). Segundo Miles & Moye (1988), o êxito na determinação de glifosato requer uma extração eficaz seguida por etapa de limpeza da amostra.

No presente trabalho, o limite de detecção de glifosato e AMPA foi de $0,01 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de solo, e o limite de quantificação foi de $0,05 \text{mg.Kg}^{-1}$ para amostras de solo. As equações de regressão demonstram que tanto para glifosato quanto AMPA no tempo zero e 32 dias houve incremento com o aumento da concentração, a excessão de AMPA aos 32 dias (Tabela 11).

Tabela 11. Equações de calibração de glifosato e AMPA para determinações cromatográficas no início e no final do período de incubação do solo.

Composto	Tempo (dias)	Equação	r^2
Glifosato	0	$y = 278,62x + 1,39$	0,9997
AMPA	0	$y = 312,24x + 0,95$	0,9996
Glifosato	32	$y = 315,66x + 0,30$	0,9982
AMPA	32	$y = 351,33x - 0,52$	0,9982

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com reação de derivatização pós-coluna, que é específica para aminas primárias, foi

usada para análise de glifosato e AMPA. O glifosato é oxidado com hipoclorito de cálcio e a glicina (produto da reação) e AMPA são misturados com OPA juntamente com mercaptoetanol fornecendo fluoróforos quantificados por CLAE com detector de fluorescência (Figura 12). Através da cromatografia pode-se observar que a presença do glifosato e de AMPA foram detectados aos 14,54 e 26,57 minutos após a reação, respectivamente na concentração de $0,30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 12).

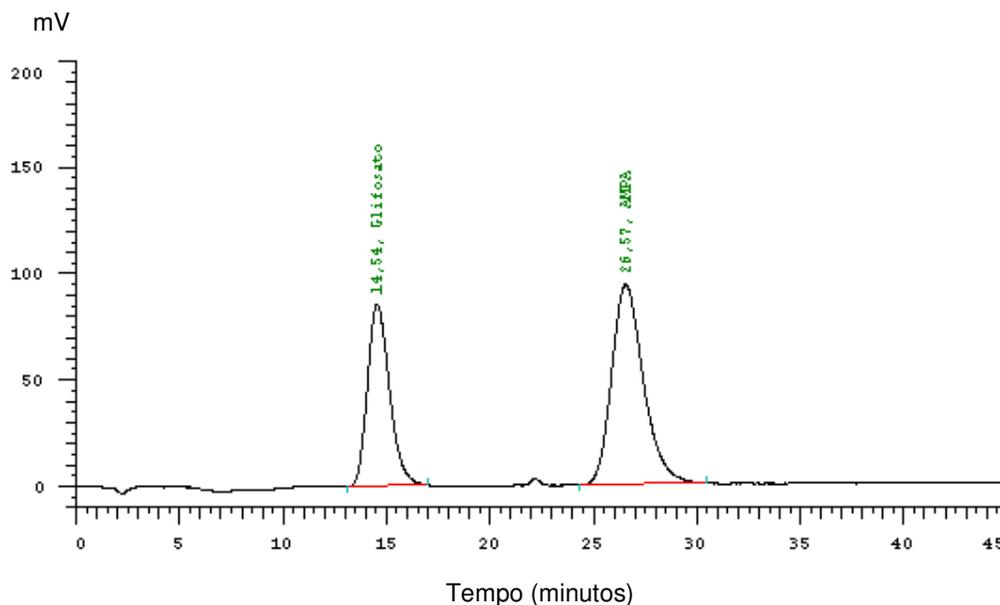


Figura 12. Cromatograma do padrão de glifosato e AMPA na concentração de $0,30 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Condição móvel: $0,005\text{M KH}_2\text{PO}_4$ a $0,7 \text{ mL.min}^{-1}$.

A degradação do glifosato pelos microrganismos presentes nos solos estudados produz o metabólito AMPA, observado pelos resultados obtidos neste trabalho onde a quantificação de glifosato no momento da aplicação e após 32 dias da mesma, para todos os solos avaliados, reduziu significativamente. Por outro lado, nestes mesmos períodos de avaliação ocorreu incremento do metabólito AMPA, demonstrando que a degradação do

glifosato resulta em AMPA. Resultados semelhantes foram observados por Veiga et al. (2001) e Araújo (2002) onde a concentração de glifosato diminuía ao mesmo tempo que a do AMPA aumentava com o passar do tempo após a aplicação do glifosato. Acredita-se que se o tempo de incubação do solo tivesse sido maior do que o utilizado neste trabalho, a concentração do metabólito seria reduzida, conforme observado por Veiga et al. (2001).

4.8. Análise de Glifosato e AMPA das amostras líquidas provenientes dos biorreatores

A técnica da CLAE também foi utilizada para análise de glifosato e AMPA das amostras provenientes dos biorreatores, visto que é a técnica padrão da Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA, 1990).

Para amostras líquidas, a detecção de glifosato e AMPA ocorreu aos 12,69 min. e 24,92 min., respectivamente (Figura 13).

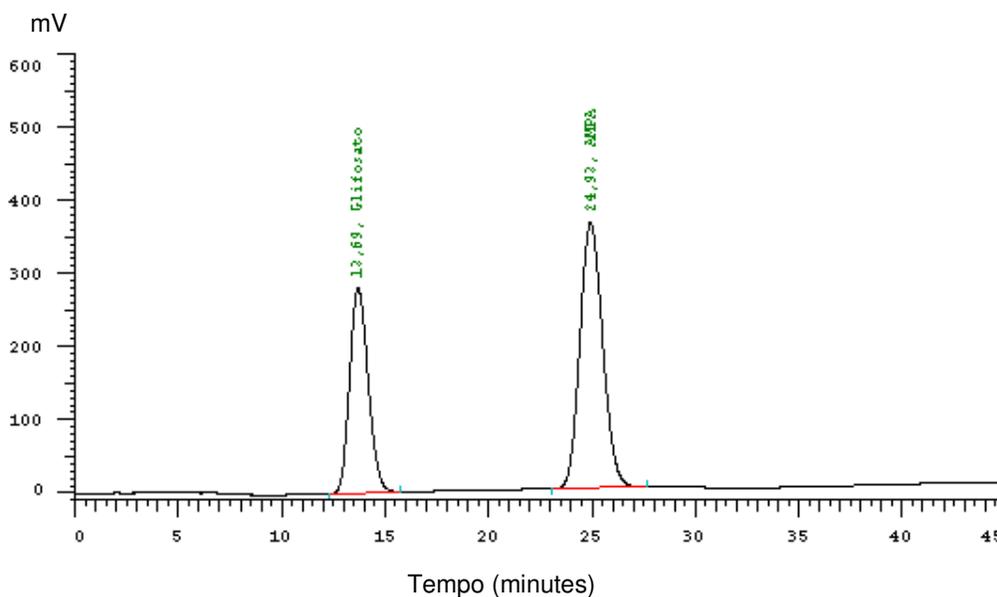


Figura 13. Cromatograma do padrão de glifosato e AMPA na concentração de $0,80 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Condição Móvel: $0,005\text{M KH}_2\text{PO}_4$ a $0,7 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$.

Os resultados das análises de CLAE obtidos neste trabalho foram eficientes na detecção de glifosato e AMPA em amostras líquidas.

Em geral, pode-se observar que independente do sistema de produção adotado e tempo de uso de glifosato é possível a detecção do mesmo nos solos o que indica que, mesmo percorrido longos períodos entre a aplicação e a determinação/quantificação é possível encontrar resíduos do herbicida.

Diante dos resultados pode-se observar que os métodos utilizados para determinação e quantificação de glifosato e AMPA foram eficientes, independente do meio em que se encontram.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que o herbicida glifosato foi degradado pelas bactérias isoladas dos solos analisados.

O herbicida glifosato apresenta efeitos negativos na multiplicação de bactérias dos solos contaminados, porém a aplicação do glifosato nos solos estimula a atividade microbiana dos solos analisados mostrando que o glifosato foi utilizado como fonte de nutrientes por estas bactérias

As cepas *Microbacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* sp. e *Arthrobacter* sp. apresentaram capacidade para degradar o herbicida glifosato.

O consórcio formado pelas cepas bacterianas *Microbacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* sp. e *Arthrobacter* sp. cultivado em biorreator com condição de aeração de 2,5 vvm e agitação de 300 g degrada 99,9 % do total de glifosato utilizado.

As bactérias presentes nos solos com maior tempo de aplicação do herbicida glifosato apresentam maior capacidade de degradação do que aquelas existentes nos solos com um período menor de aplicação.

6. PERSPECTIVAS

Devido à indisponibilidade de tempo durante o período de mestrado e, considerando-se que este trabalho é o início do estudo da biodegradação do glifosato em solos cultivados com maçã no Sul do país, trabalhos futuros projetam-se no sentido de avaliar o desaparecimento de AMPA, deixando solo incubado por mais tempo, otimizar as cinéticas de biorreatores para degradação de glifosato e AMPA com perspectiva de aplicação em sistemas de tratamentos de resíduos contaminados com o herbicida glifosato e estudar a capacidade de mineralização total de glifosato pelas bactérias isoladas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M. Biodegradation of chemicals of environmental concern. **Science**, v. 211, p. 132 – 138, 1981 ALEXANDER, M. Biodegradation of chemicals of environmental concern. **Science**, v. 211, p. 132 – 138, 1981.

AMARANTE OP & SANTOS TC. Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato: Breve revisão. **Química nova**, 25(3): p. 420-428, 2002.

ANDERSON, J.P.E. Pesticides effects on non-target soil microorganisms. **In: HILL, I.R.; WRIGHT, S.J.E. (Ed.). Pesticides microbiology**. New York: academic Press, p. 611 – 628, 1978.

ANVISA. **Glifosato**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/g01.pdf>> Acesso em: 20 de abril de 2011.

ARAÚJO, A.S.F. **Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solos**. Dissertação de mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ARAÚJO, A. S. F; MONTEIRO, R. T. R. & ABARKELI, R. B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. **Chemosphere**, v. 52, n. 5, p.799-804, 2003.

BALTHAZOR, T.M. & HALLAS, L.E. Glyphosate-degrading microorganisms from industrial activated sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 432–434, 1986.

BARTHA, R.; PRAMER, P. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Science**, v. 100, n. 1, p. 68 – 70, 1965.

BORJESSON, E.; TORSTENSSON, L. New methods for determination of glyphosate and (aminomethyl) phosphonic acid in water and soil. **Journal of Chromatografy A**, v. 886, p. 207 – 216, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Disponível em:

<http://extranet.agricultura.gov.br/consultasislegis/>. Acessado em: março de 2011.

CARLISLE, S.M.; TREVORS, J.T. Glyphosate in the environment. **Water, Air Soil Pollution**, v. 39, p. 409-420, 1988.

CASTRO JUNIOR, J. V.; SELBACH, P. A.; AYUB, M. A. Z. Avaliação do efeito do herbicida glifosato na microbiota do solo. **Pesticidas**, v. 16, p. 21-30, 2006.

CHAIM, A. Tecnologia de aplicação de agrotóxicos: fatores que afetam a eficiência e o impacto ambiental. In: **SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F. Agrotóxicos & Ambiente**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2004. p. 289-317.

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. **Embrapa Uva e Vinho**. Comunicado Técnico 103, 2010.

DE ANDRÉA, M.M.; PERES, T.B.; LUCHINI, LC; BAZARIN, G; PAPINI, S.; MATALLO, M.B.; SAVOY, V.L.T. Influence of repeated applications of glyphosate on its persistence and soil bioactivity. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 11, 2003.

DICK, R.E. & QUINN, J.P. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathway of degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 545–550, 1995.

EBERBACH, P.L. Applying non-steady-state compartmental analysis to investigate the simultaneous degradation of soluble and sorbed glyphosate (N-Phosphonomethyl) glycine) in four soils. **Pesticide Science**, v. 52, n. 3, p. 229-240, 1998.

EMBRAPA. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Brasília: Embrapa Produção de Informação; Rio de Janeiro: **Embrapa Solos**, 1999.

FITZGIBBON, J. & BRAYMER, H. D. Phosphate starvation induces uptake of glyphosate by *Pseudomonas* sp. strain PG2982. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1886-1888, 1988.

FOMSGAARD, I.S. Modelling the mineralization kinetics for low concentrations of pesticides in surface and subsurface soil. **Ecological Modelling**, v. 102, p. 175 – 208, 1997.

FORLANI, G.; MANGIACALLI, A.; NIELSEN, E. ET AL. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganism. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, n. 7, p. 991 – 997, 1999.

FORTES NETO, P. Microbiota do solo como indicadora da poluição do solo e do ambiente. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Instituto Agrônômico. 312 p, 2007.

FRIGHETTO, R.T.S. Impacto ambiental decorrente do uso de pesticidas agrícolas. In: **Melo, I.S. & Azevedo, J.L. Microbiologia ambiental**. Embrapa, cap 17, p. 415-438, 1997.

GIESY, J.P.; DOBSON, S; SOLOMON, K.R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 167, p. 35-120, 2000.

GIMSING, A.L., BORGGGAARD, O.K., JACOBSEN, O.S., AAMAND, J & SØRENSEN, J. Chemical and microbiological soil characteristics controlling glyphosate mineralization in Danish surface soils. **Applied Soil Ecology**, v. 27, n. 3, p. 233-242, 2004.

GOMEZ, E., FERRERAS, L., LOVOTTI, L., FERNANDEZ, E. Impact of glyphosate application on microbial biomass and metabolic activity in a Vertic Argiudoll from Argentina. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 163-167, 2008.

GROSSBARD, E.; HARRIS, D. Effects of herbicides on the decay of straw. p. 167-176, 1979. In **GROSSBARD, E (ed.) Straw decay and its effect on disposal and utilization**. John Wiley and Sons, Chichester, UK.

GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. The herbicide glyphosate. **London: Butterworths Co.**, 1985.

GUIMARÃES, G.L. Impactos ecológicos do uso de herbicidas ao meio ambiente. **Série Técnica IPEF**, v. 4, n. 12, p. 159-180, 1987.

HANEY, R.L.; SENSEMAN, S.A.; HONS, E.M. et al. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. **Weed Science**, v. 48, n. 1, p. 89-93, 2000.

HART, M.R.; BROOKES, P.C. Soil microbial biomass and mineralisation of soil organic matter after 19 years of cumulative field application of pesticides. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, n. 12, p. 1641-1649, 1996.

HAYES, V.E.; TERNAN, N.G.; MCMULLAN, G. Organophosphonate metabolism by a moderately halophilic bacterial isolate. **FEMS Microbiology Letters**, v.186, p. 171 – 175, 2000.

HEINONEN-TANSKI, H. The effect of temperature and liming on the degradation of glyphosate in two arctic forest soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 21, n. 2, p. 313-317, 1989.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS RENOVÁVEIS. **Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos**. 2.ed. Brasília: IBAMA, 1990.

JAN, M.R.; SHAH, J.; MUHAMMAD, M. & ARA, B. **Glyphosate herbicide residue determination in samples of environmental importance using spectrophotometric method**. *Journal of Hazardous Materials*, 169: 742–745, 2009.

KATAOKA, H.; HORII, K. & MAKITA, M.. Determination of The Herbicide Glyphosate and Its Metabolite (Aminomethyl)phosphonic Acid by Gas Chromatography with Flame Photometric Detection. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 195-198, 1991.

KARPOUZAS, D.G & SINGH, B.K. Microbial Degradation of Organophosphorus Xenobiotics: Metabolic Pathways and Molecular Basis. **Advances in Microbial Physiology**, v. 51, p. 119-154, 2006.

KOOLS, S.A.E.; ROOVERT, M. V.; GESTEL, C.A.M.V; STRAALLEN, N.M.V. Glyphosate degradation as a soil health indicator for heavy metal polluted soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, p. 1303-1307, 2005.

KREMER, R.J.; MEANS, N.E. Glyphosate and glyphosate-resistant crop interactions with rhizosphere microorganisms. **European Journal of Agronomy**, v. 31, p. 153-161, 2009.

KRZYSKO, T. & ORLIK, A. The use of glyphosate as the sole source of phosphorus or carbon for the selection of soil-borne fungal strains capable to degrade this herbicide **Chemosphere**, v. 34, n. 12, p. 2601-2605, 1997.

LANCASTER, S. H.; HOLLISTER, E.B.; SENSEMAN, S.A. & GENTRY, T.J. Effects of repeated glyphosate applications on soil microbial community composition and the mineralization of glyphosate. **Pest Management Science**, v. 66, p. 59-64, 2009

LAVORENTI, A. Comportamento dos herbicidas no meio ambiente. In: **Workshop Sobre Biodegradação**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 1996. p. 81-115.

LERBS, W.; STOCK, M. & PARTHIER, B. Physiological aspects of glyphosate degradation in *Alcaligenes* sp. strain GL. **Archives of Microbiology**, v. 153, n. 2, p. 146–150, 1990.

LIU, C.M.; MCLEAN, P.A.; SOOKDEO, C.C. & CANNON, F.C. Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1799–1804, 1991.

MAIER, R. M. Microorganisms and organic pollutants. In: Raina, M. M., Pepper. I. L., Gerba, C. P. **Environmental microbiology**. Academic Press, cap. 16, p.363-402, 2000.

MILES, C.J.; MOYE, H.A. Extraction of glyphosate herbicide from soil and clay minerals and determination of residues in soils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, n. 3, p. 486-491, 1988.

MONSANTO. **Comportamento do glifosato no solo e na água**. Disponível em: < <http://www.monsanto.com.br/roundup/glifosato/capitulo6/capitulo6.asp>>. Acesso em: 20 de abril de 2011.

MONTEIRO, R.T.R. Biodegradação de herbicidas. In: **Workshop Sobre Biodegradação**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 1996. p. 120-128.

MONTEIRO, R.T.R. Degradação de pesticidas. In: MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L. de, (Ed). **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 1997. p.107-123.

MONTEIRO, R.T.R. Biodegradação de pesticidas em solos brasileiros. In: **MELO, I.S. de, SILVA, C.M.M.S., SCRAMIN, S., SPESSOTO, A. Biodegradação**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2001. p. 1-14.

MOORE, I.K.; BRAYMER, H.D. & LARSON A.D. Isolation of a *Pseudomonas* sp. which utilises the phosphonate herbicide glyphosate. **Applied and Environmental Microbiology**, v.46, n. 2, p. 316–320, 1983.

MOREIRA, F.M.S; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p.

MORILLO, E.; UNDA BEYTIA, T.; MAQUEDA, C.; RAMOS, A. Glyphosate adsorption on soils of different characteristics. Influence of copper addition. **Chemosphere**, v. 40, p. 103-107, 2000.

MORLIER, L.W. & TOMKINS, D.F. Liquid Chromatographic Determination of Glyphosate in Water-Soluble Granular Formulations: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, 1996.

OBOJSKA, A.; TERNANA, N.G.,; LEJCZAK, B.; KAFARSKI, P. & MCMULLAN, P. Organophosphate utilization by the thermophile *Geobacillus caldoolysilyticus* T20. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 2081–2084, 2002.

PERRIN-GANIER, C.; SCHIAVON, M.; PORTAL, J.M. et al. Degradation de pisoproturon et disponibilité des résidus dans les sols. **Weed Research**, v. 32, n. 2, p. 257-263, 1995.

PESCE, S.; BATISSON, I.; BARDOT, C.; FAJON, C.; PORTELLI, C.; MONTUELLE, B.; BOHATIER, J. Response of spring and summer riverine microbial communities following glyphosate exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1905-1912, 2009.

PIKE, R. & AMRHEIN, N. Isolation and characterization of a mutant of *Arthrobacter* sp. strain GLP-1 which utilises the herbicide glyphosate as its sole source of phosphorus and nitrogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 2868–2870, 1988.

PRATA, F. **Comportamento do glifosato no solo e deslocamento miscível de atrazina**. Tese de doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

RESTO, W.; ROQUE, J.; REY, R.; COLÓN, H.; ZAYAS, J. The use of ion chromatography for the determination of clean-in-place-200 (CIP-200) detergent traces. **Analytical Chemistry Insights**, p. 15-12, 2006.

ROBERTSON, B.K.; ALEXANDER, M. Growth-linked and cometabolic biodegradation: possible reason for occurrence or absence of accelerated pesticide biodegradation. **Pesticide Science**, v. 41, n. 4, p. 311-318, 1994.

RUEPPEL, M.L.; BRIGHTWELL, B.B.; SCHAEFER, J.; MARVEL, J.T. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 517-528, 1977.

SÁNCHEZ, J.M.; ETTIENE, G.; RIVAS, Z. Determinación de glifosato en muestras de agua en la cuenca del Río Catatumbo. **Scientific Journal from the Experimental Faculty of Sciences, at La Universidad del Zulia**, v. 13, n. 2, 2005.

SANTOS, J.B.; FERREIRA, E.A.; FIALHO, C.M.T.; SANTOS, E.A.; GALON, L.; CONCENÇO, G.; ASIAZÚ, I.; SILVA, A.A. Biodegradation of glyphosate in rhizospheric soil cultivated with *Glycine Max*, *Canavalia ensiformis* and *Stizolobium aterrimum*. **Planta Daninha**, v. 27, n. 4, 2009.

SCHNÜRER, J.; ROSSWALL, T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. **Applied Environmental Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 1256-1261, 1982.

SCHULZ, A.; KRÜPER, A.; AMRHEIN, N. Differential sensitivity of bacterial 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases to the herbicide glyphosate. **FEMS Microbiology Letters**, v. 28, p. 297-301, 1985.

SEHNEM, N.T. **Avaliação da capacidade de biodegradação de tebuconazole por isolados microbianos de solos contaminados e de ambientes amazônicos**. Dissertação de mestrado, Instituto de Ciências

Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SHINABARGER, D.L. & BRAYMER, H.D. Glyphosate catabolism by *Pseudomonas* sp. strain PG2982. **Journal of Bacteriology**, v. 168, n. 2, p. 702–707, 1986.

SOMASUNDARAM, L.; COATS, J.R. Influence of pesticide metabolites on the development of enhanced biodegradation. In: **RACKE, K.D.; COATS, J.R. Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington, DC: American Chemical Society, p. 128-140, 1990.

SØRENSEN, S.R.; SCHULTZ, A.; JACOBSEN, O.S.; AAMAND, J. Sorption, desorption and mineralization of the herbicides glyphosate and MCPA in samples from two Danish soil and subsurface profiles. **Environmental Pollution**, v. 141, p. 184-194, 2006.

SOUZA, A.P. **Atividade de oxyfluorfen, 2,4-D e glifosate, em solos de diferentes texturas na presença e na ausência de composto orgânico**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1994.

SOUZA, A.P.; FERREIRA, F.A.; SILVA, A.A.. et al. Respiração microbiana do solo sob doses de glyphosate e de imazapyr. **Planta Daninha**, v. 17, n. 3, p. 387-398, 1999.

SPADOTTO, CA. Classificação do impacto ambiental. Comitê do Meio Ambiente, **Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas**, 2002.

SPADOTTO, C.A.; GOMES, M.A.F.; LUCHINI, L.C.; DE ANDRÉA, M.M. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. **Embrapa Meio Ambiente**. Documentos, 42, 2004.

SPADOTTO, C.A. Avaliação de riscos ambientais de agrotóxicos em condições brasileiras. **Embrapa Meio Ambiente**. Documentos, 58, 2006.

SPANN, K.P.; HARGREAVES, P.A. The determination of glyphosate in soils with moderate to high clay content. **Pesticide Science**, v. 40, n. 1, p. 41-48, 1994.

SPRANKLE, P.; MEGGITT, W.F.; PENNER, D. Adsorption, mobility and microbial degradation of glyphosate in the soil. **Weed Science**, v. 23, n. 3, p. 229-234, 1975.

SUETT, D.L.; FOURNIER, J.C.; PAPADOPOLOU-MOURKIDOU, E. PUSSEMIER, L.; SMELT, J. Accelerated degradation: the European dimension. **Soil Biology & Biochemistry**, v 28, n. 12, p. 1741-1748, 1996.

SUTHERLAND, T.D.; HORNE, I.; LACEY, M.J.; HARCOURT, .RL.; RUSSELL, R.J. & OAKESHOTT, J.G. Enrichment of an endosulfan-degrading mixed bacterial culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n 7, p. 2822–2828, 2000.

TAROUCO, C. P. **Cinética e Fisiologia da biodegradação de glifosato por bactérias isoladas de solos expostos a este herbicida**. Dissertação de mestrado, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

TEJADA, M. Evolution of soil biological properties after addition of glyphosate, diflufenican and glyphosate+diflufenican herbicides. **Chemosphere**, v. 76, p. 365-373, 2009.

TIAN, Y.S.; XIONG, A.S.; XU, J.; ZHAO, W.; GAO, F.; FU, X.Y.; XU, H.; ZHENG, J.L.; PENG, R.H.; YAO, Q. H. Isolation from *Ochrobactrum anthropi* of a novel class II 5-enopyruvylshikimate-3-phosphate synthase with high tolerance to glyphosate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 17, p. 6001-6005, 2010.

TSUNODA, N. Simultaneous determination of the herbicides glyphosate, glufosinate and bialaphos and their metabolites by capillary gas chromatography-ion-trap mass spectrometry. **Journal of chromatography**, v. 637, n. 2, p. 167-173, 1993.

VEIGA, F.; ZAPATA, M.L.; FERNANDEZ, M. et al. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia , north-west Spain. **The Science of the Total Environment**, v. 271, n. 1, p. 135-144, 2001.

WACKETT, L.P.; SHAMES, S.L.; VENDITTI, C.P.; WALSH, C.T. Bacterial carbon-phosphorus lyase: Products, rates, and regulation of phosphonic and phosphinic acid metabolism. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 2, p. 710-717, 1987.

WACKETT, L.P. & ELLIS, L.B.M. Predicting biodegradation. **Environmental Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 119–124, 1999.

WARDLE, D.A.; PARKINSON, D. Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. **Plant and Soil**, v. 122, n. 1, p. 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. **Applied Soil Ecology**, v. 40, p. 1-12, 2008.

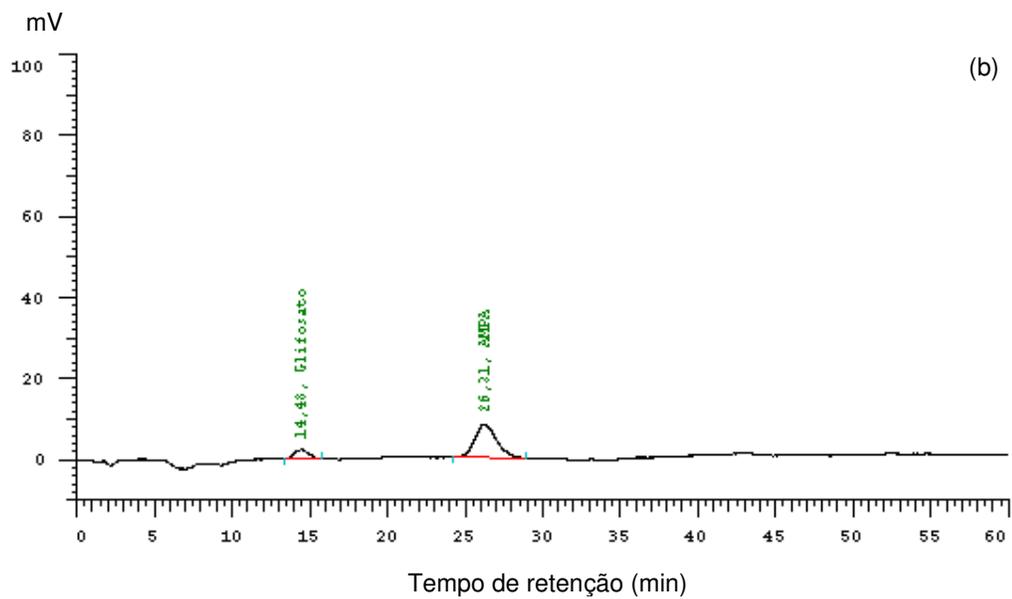
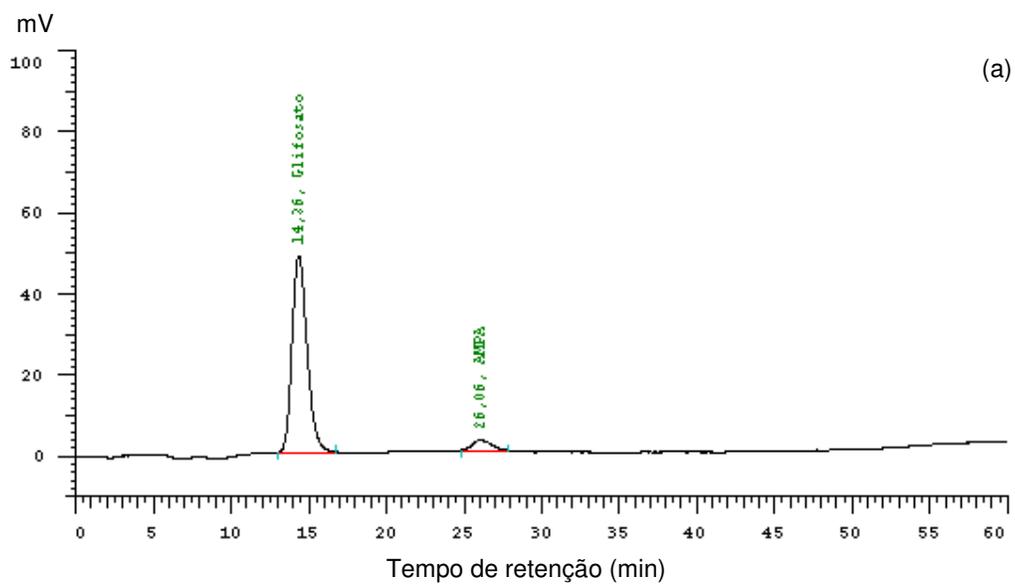
ZHAO, B.; ZHANG, J.; GONG, J.; ZHANG, H.; ZHANG, C. Glyphosate mobility in soils by phosphate application: Laboratory column experiments. **Geoderma**, v. 149, p. 290-297, 2009.

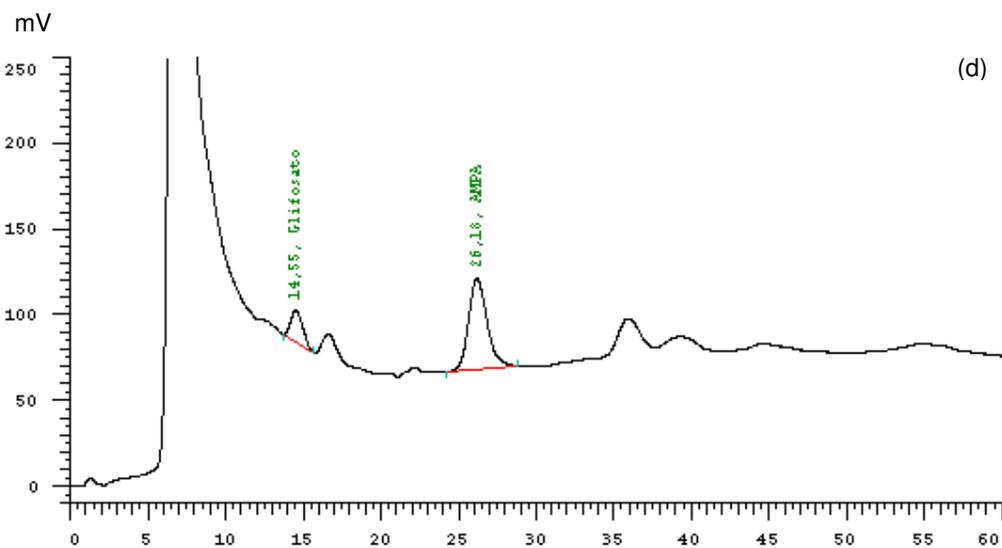
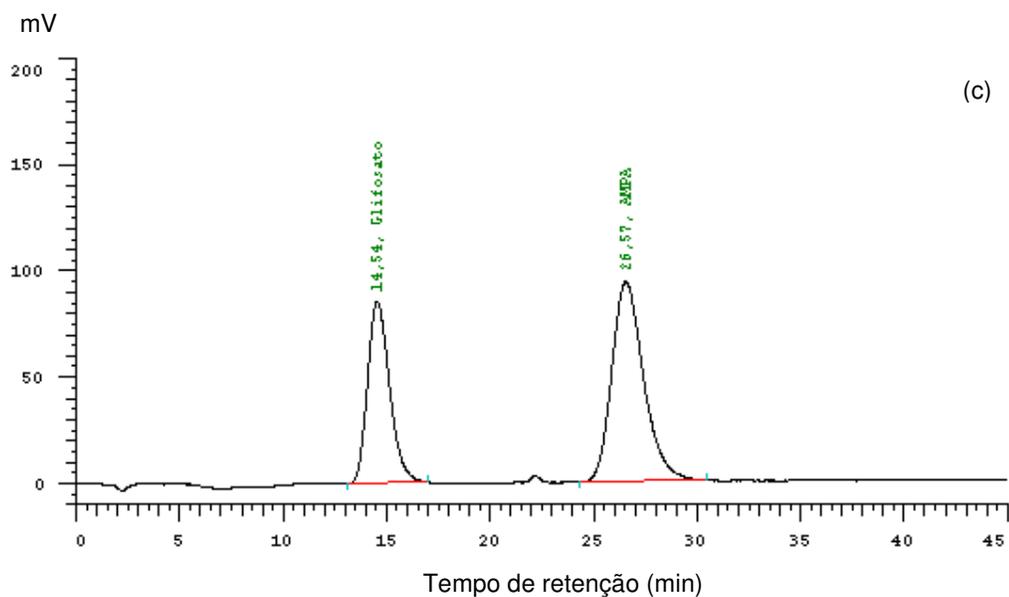
ZHU, Y.; ZHANG, F.; TONG, C. & LIU, W. Determination of glyphosate by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 850, n. 1, p. 297-301, 1999.

ZOBIOLE, L.H.S.; KREMER, R.J.; OLIVEIRA, R.S.; CONSTANTIN, J. Glyphosate affects micro-organisms in rhizospheres of glyphosate-resistant soybeans. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, p. 118-127, 2010.

APÊNDICE 1

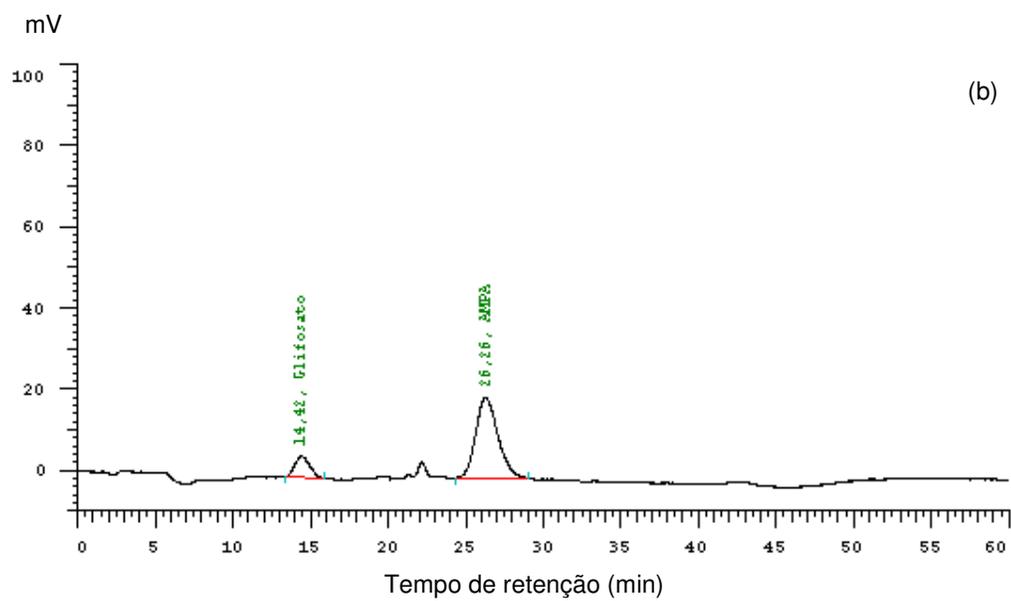
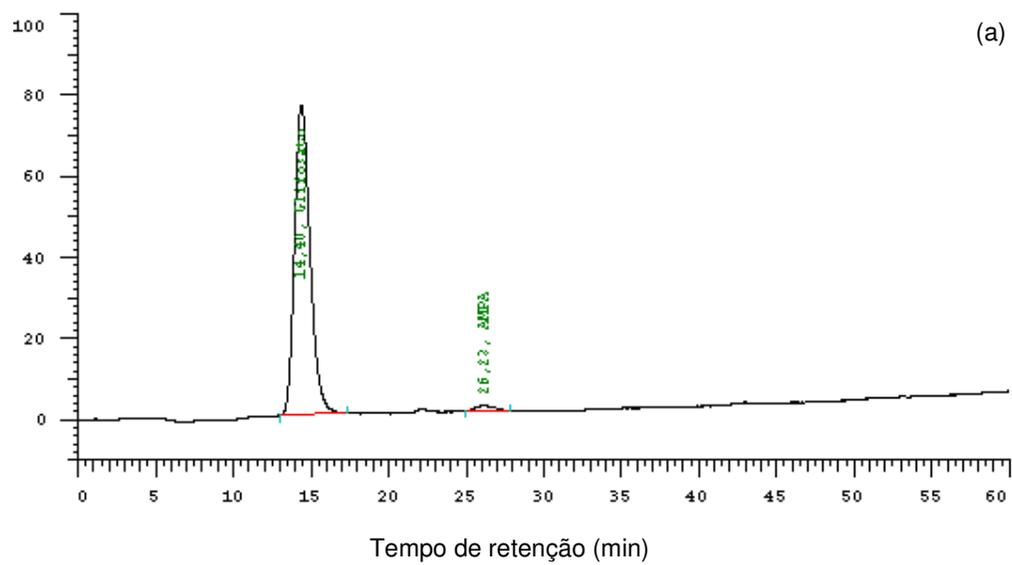
Cromatogramas das amostras de solo analisadas aos 0 e 32 dias de incubação, além do controle e dos padrões de glifosato e AMPA.

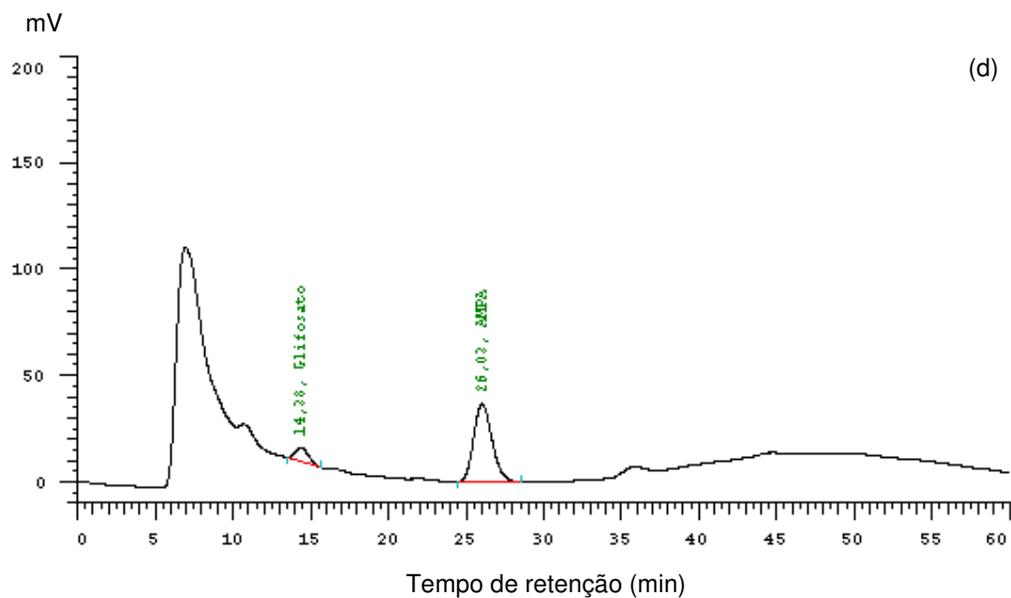
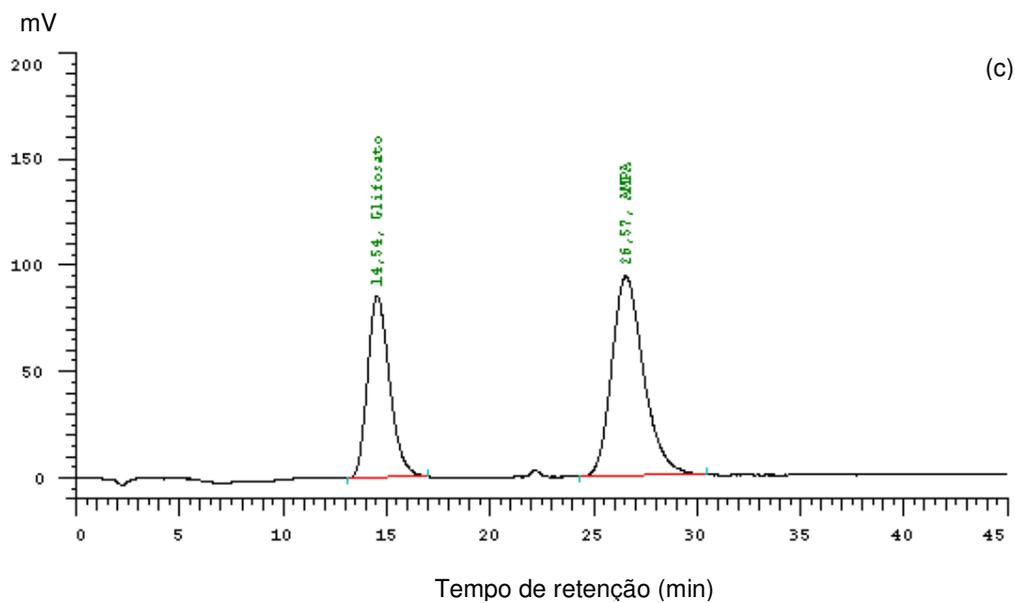




Cromatogramas de glifosato e Tempo de retenção (min) aos 0 dias (a), aos 32 dias (b), padrão de $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (c) e controle (d). Condição: fase móvel é $0,005 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$ a $0,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

mV

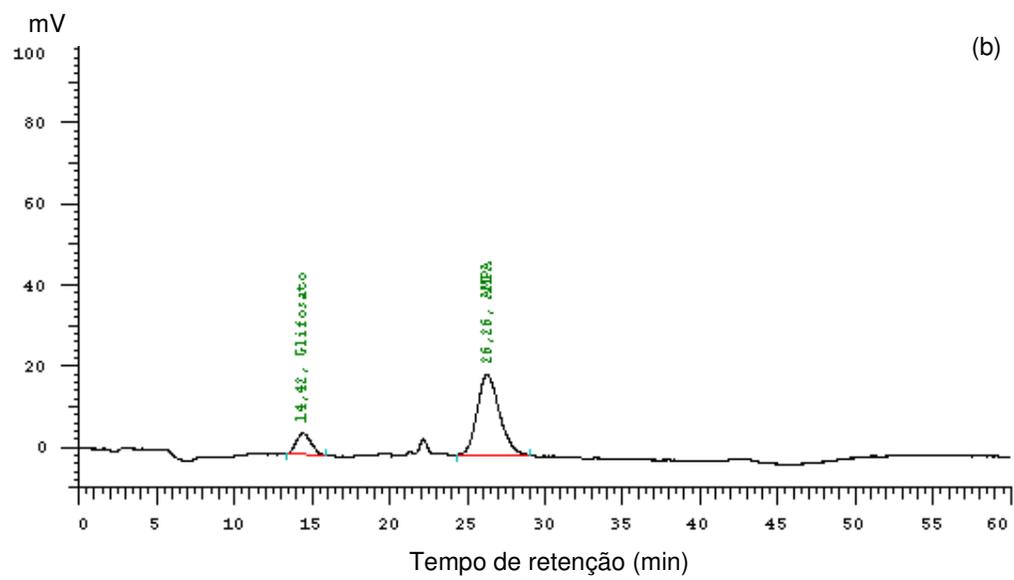
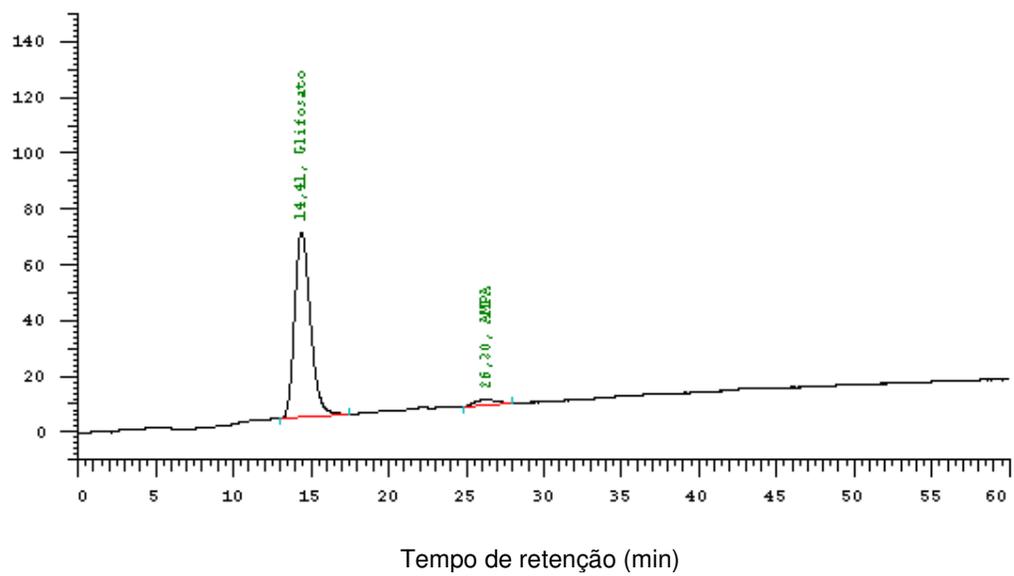


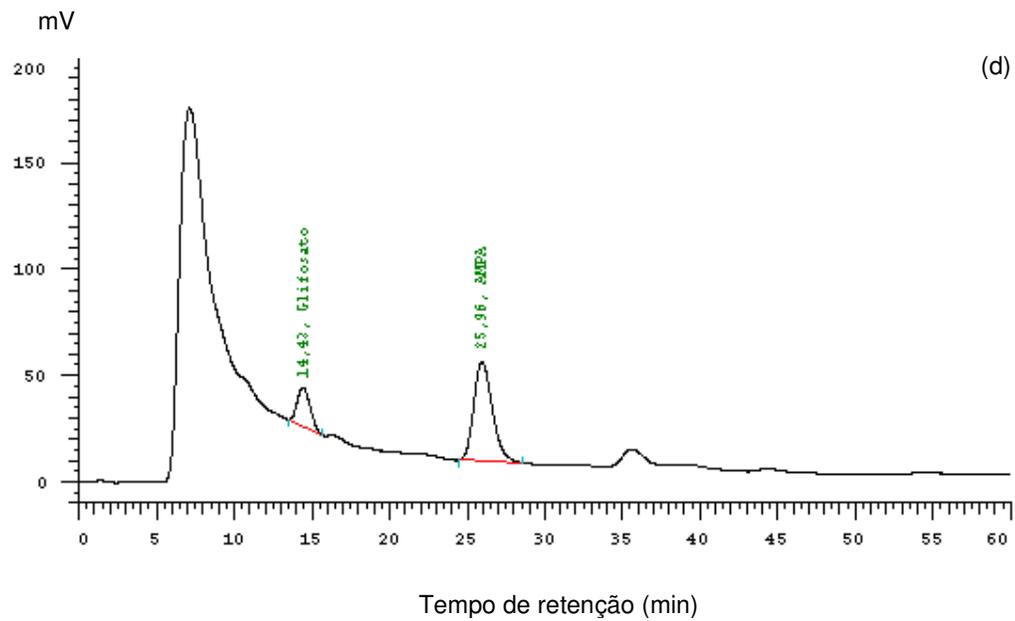
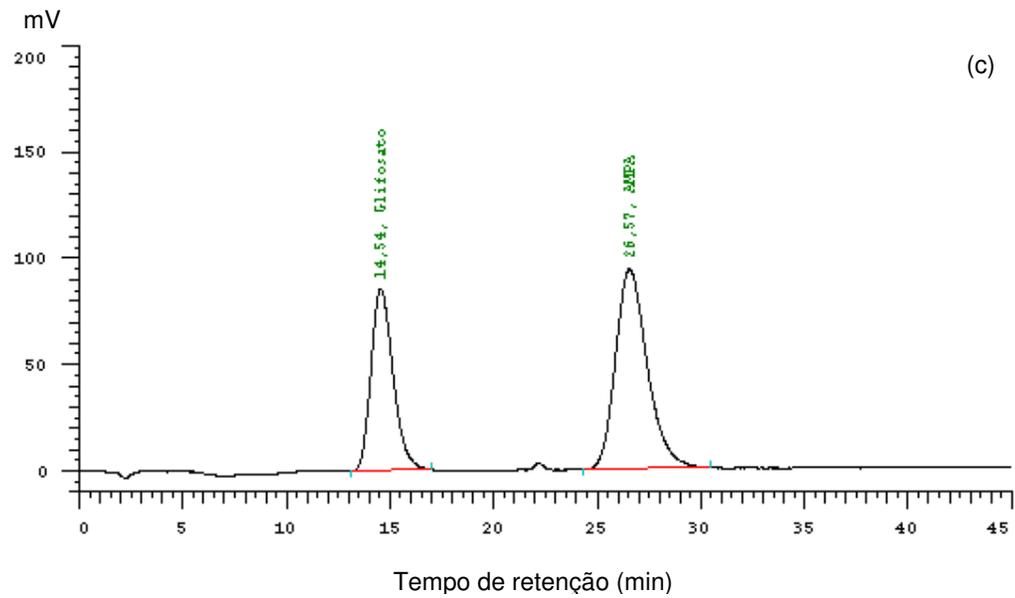


Cromatogramas de glifosato e AMPA extraídos do solo 2 aos 0 dias (a), aos 32 dias (b), padrão de $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (c) e controle (d). Condição: fase móvel é $0,005 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$ a $0,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

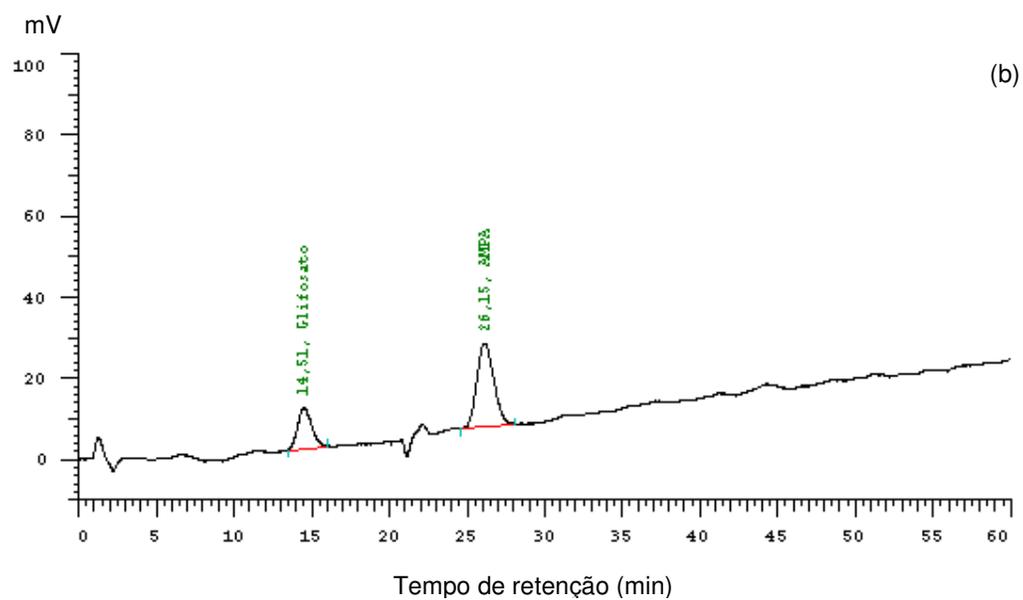
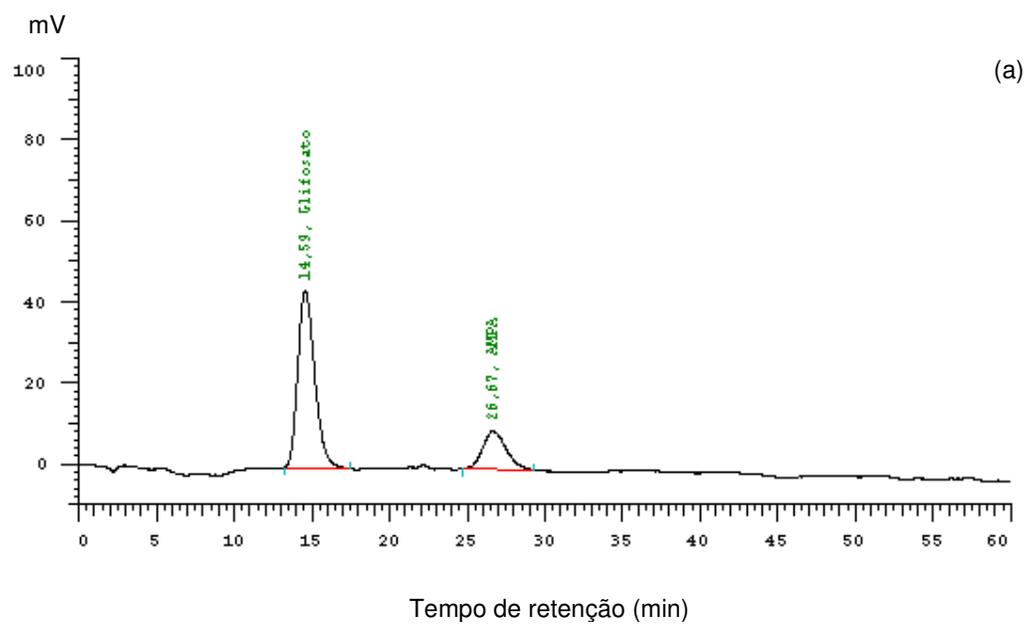
mV

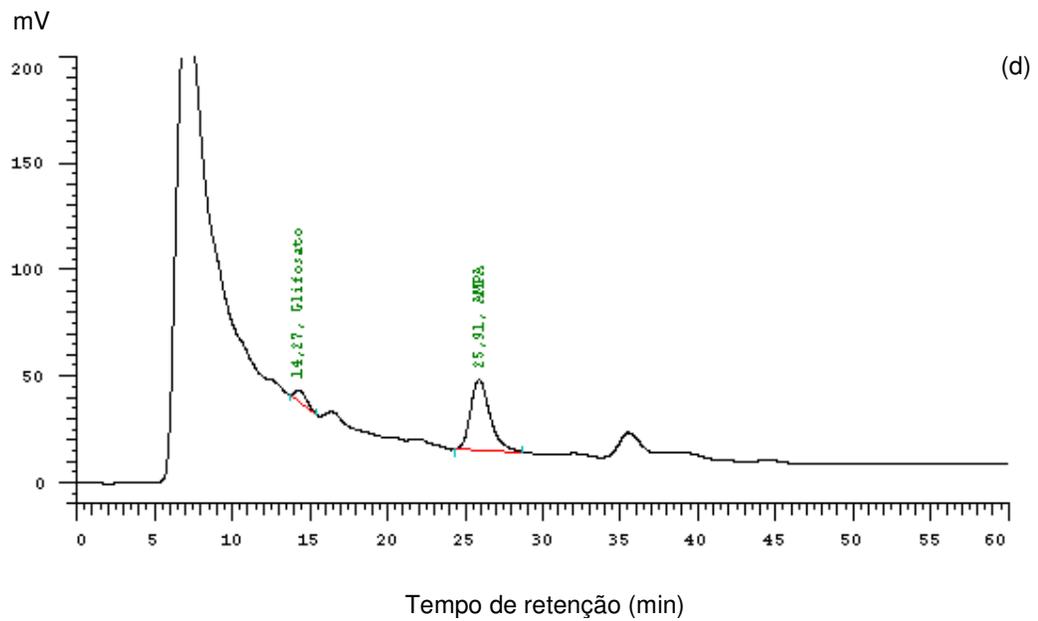
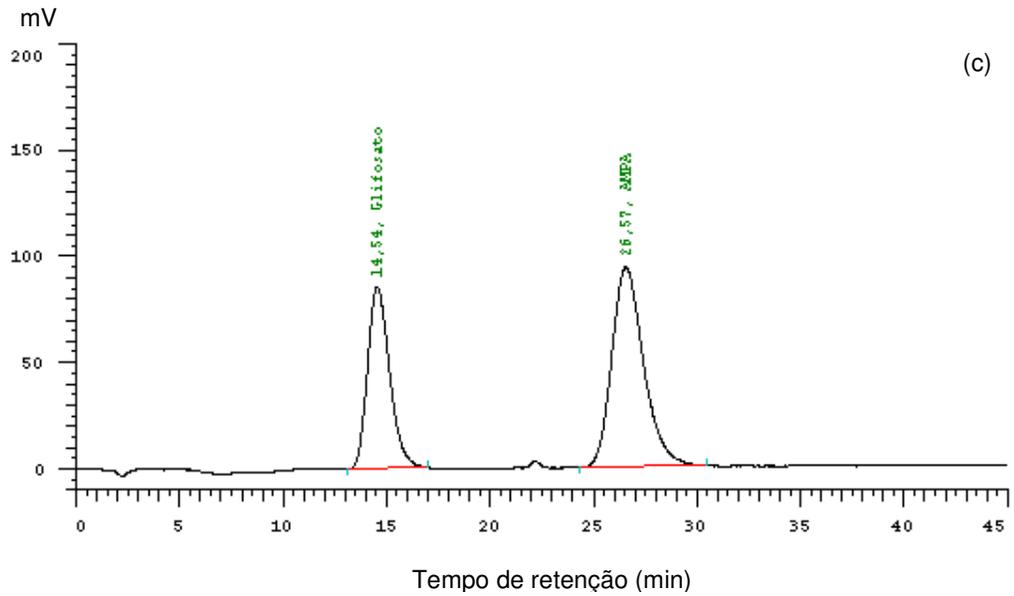
(a)



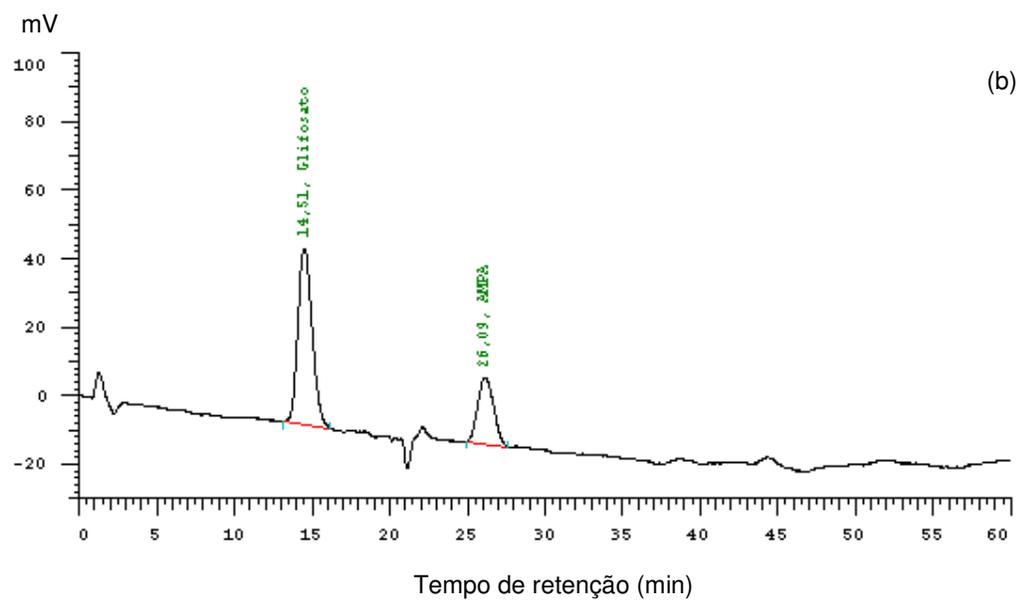
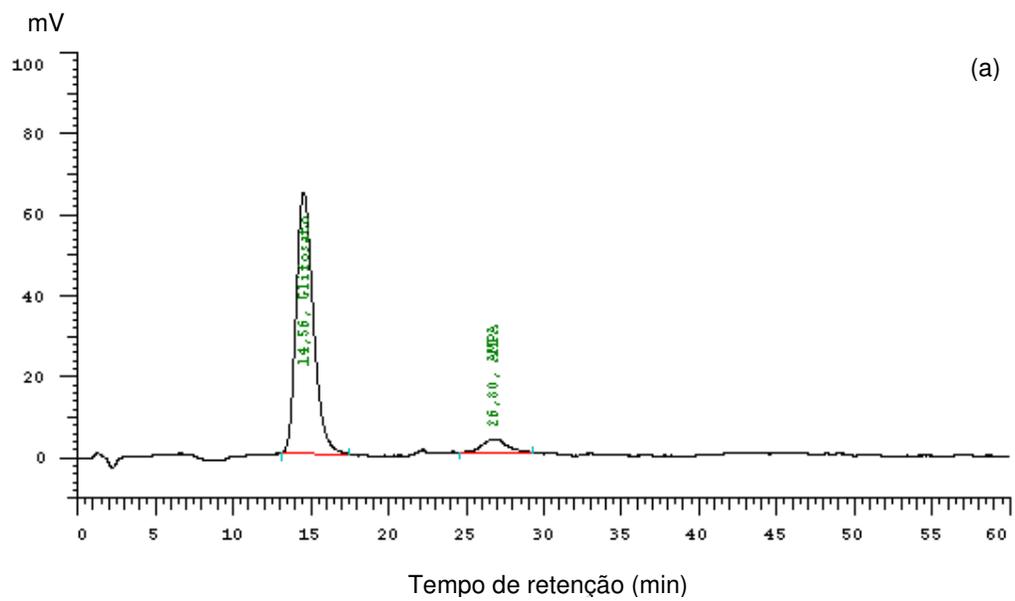


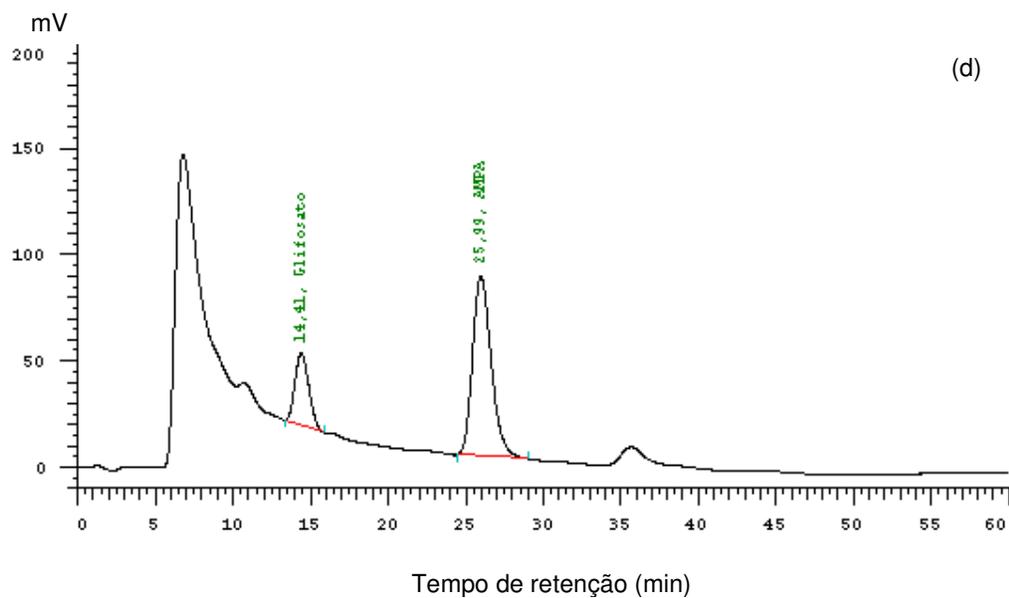
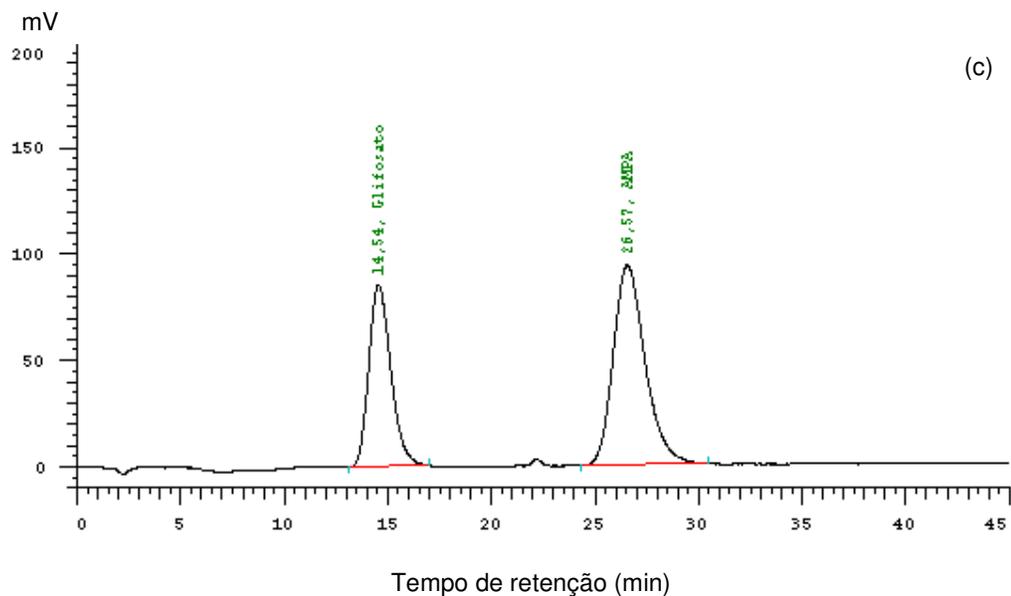
Cromatogramas de glifosato e AMPA extraídos do solo 3 aos 0 dias (a), aos 32 dias (b), padrão de $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (c) e controle (d). Condição: fase móvel é $0,005 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$ a $0,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.



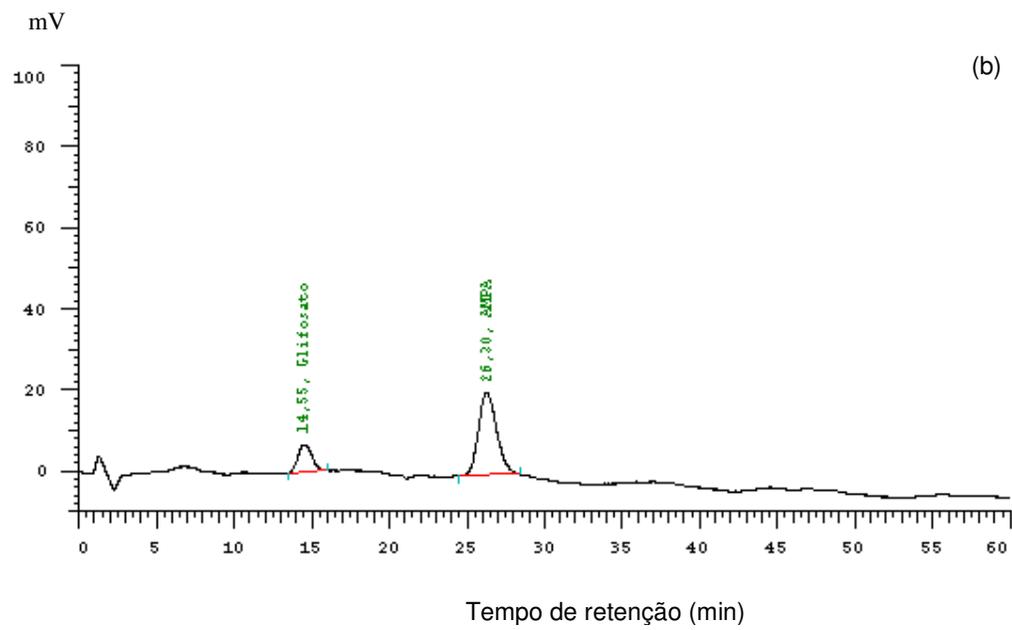
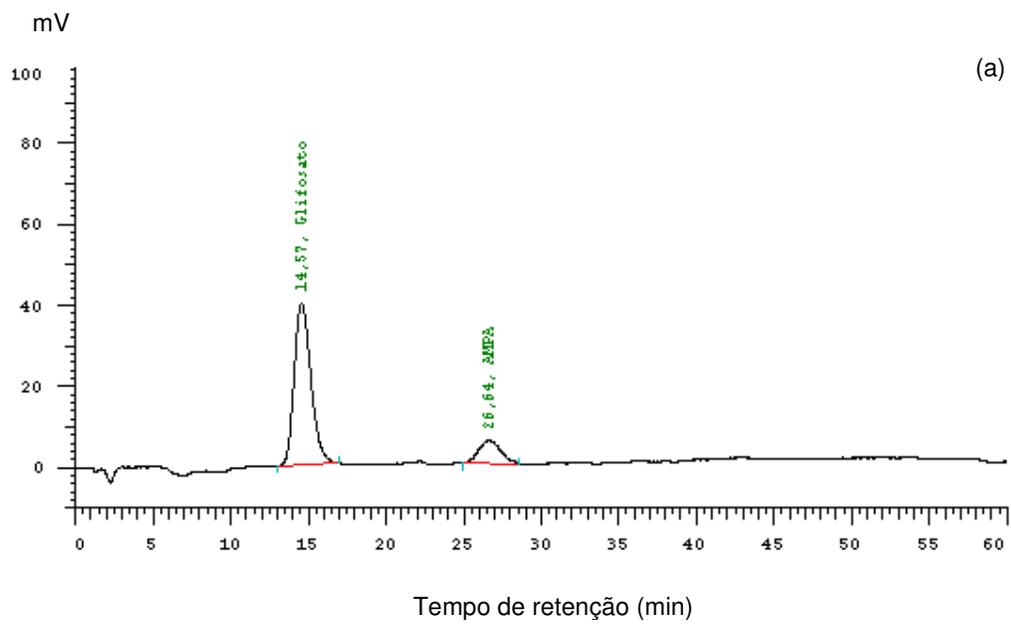


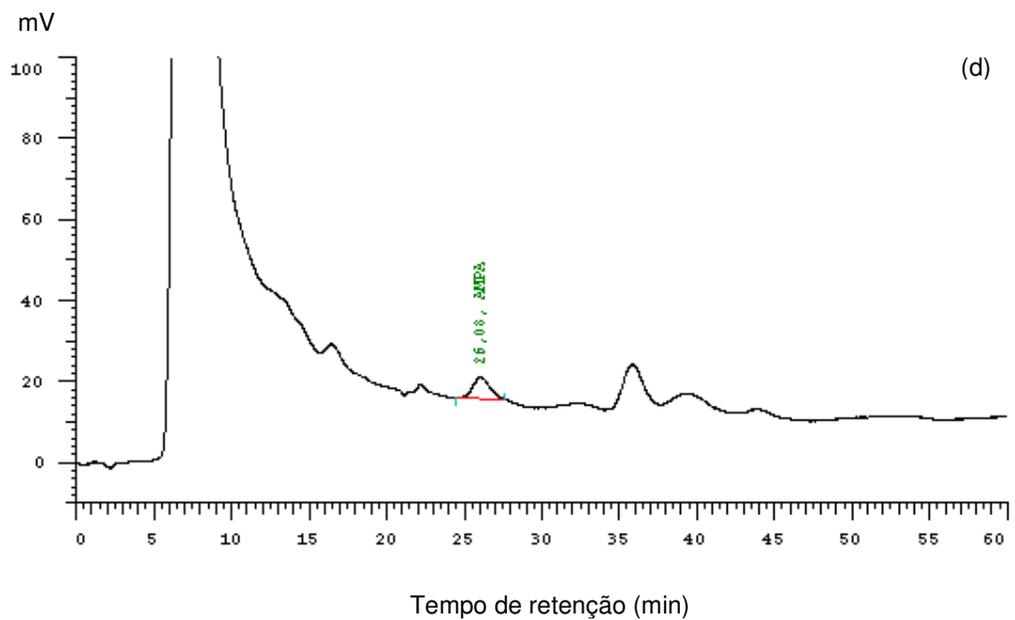
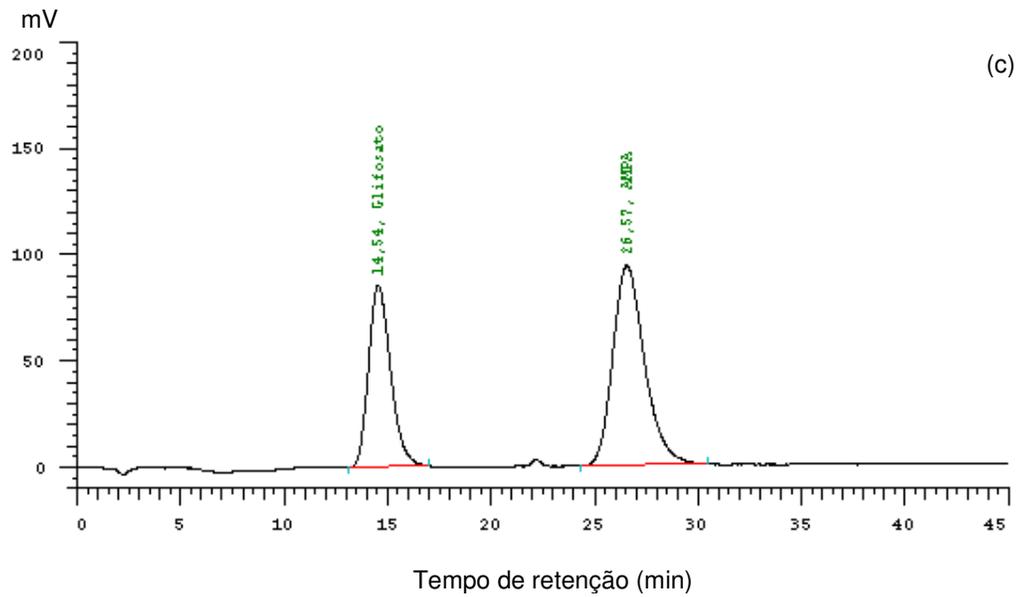
Cromatogramas de glifosato e AMPA extraídos do solo 4 aos 0 dias (a), aos 32 dias (b), padrão de $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (c) e controle (d). Condição: fase móvel é $0,005 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$ a $0,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.





Cromatogramas de glifosato e AMPA extraídos do solo 5 aos 0 dias (a), aos 32 dias (b), padrão de $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (c) e controle (d). Condição: fase móvel é $0,005 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$ a $0,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.





Cromatogramas de glifosato e AMPA extraídos do solo 6 aos 0 dias (a), aos 32 dias (b), padrão de $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (c) e controle (d). Condição: fase móvel é $0,005 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$ a $0,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

APÊNDICE 2

Composição dos meios de cultivo e soluções usados no trabalho.

Meio de cultivo sólido (g.L⁻¹)

AN - Ágar nutriente: ágar, 15; peptona bacteriológica, 5; extrato de carne, 3; cloreto de sódio, 10.

Meios de cultura líquidos (g.L⁻¹)

LB - Luria Bertani modificado: glicose, 20; peptona, 10; extrato de levedura, 5; NaCl, 5.

MM1 – Meio Mineral: Macronutrientes: cloreto de potássio, 0,7; fosfato de potássio monobásico, 2; fosfato dissódico, 3; nitrato de amônio, 1. Micronutrientes: sulfato de magnésio, 4; sulfato de ferro II, 0,2; cloreto de manganês II, 0,2; cloreto de cálcio, 0,2.

Soluções para Hidrólise do FDA

FDA 4,8 mM - 1g de FDA; 500 mL de acetona.

Solução estoque de fluoresceína – 0,5 g de fluoresceína; 500 mL de água destilada.

Solução de trabalho de fluoresceína – 5 mL da solução estoque de fluoresceína, 45 mL de acetona.

APÊNDICE 3

Resultados da medição do pH nos biorreatores.

Valores de pH ao longo de 108 horas de cultivo do biorreator nas condições: aeração de 2,5 vvm e agitação de 300 rpm.

Biorreator	Tempo em horas											
	0	4	8	12	24	36	48	60	72	84	96	108
A	6,21	6,28	6,21	6,27	6,2	6,2	6,17	6,25	6,14	6,16	6,17	6,08
A'	6,25	6,26	6,26	6,27	6,19	6,19	6,19	6,26	6,16	6,17	6,19	6,09
B	6,21	6,25	6,08	5,74	5,36	5,41	5,3	5,42	5,34	5,37	5,37	5,27
B'	6,28	6,32	6,07	5,74	5,38	5,37	5,29	5,39	5,37	5,34	5,4	5,32
Controle	6,16	6,12	6,12	6,16	6,05	6,03	6,09	6,09	6,06	6,01	6,01	5,95
Controle '	6,07	6,12	6,12	6,13	6,09	6,08	6,09	6,13	6,07	6,03	6,03	5,92

Valores de pH ao longo de 108 horas de cultivo do biorreator nas condições: aeração de 0 vvm e agitação de 200 rpm.

Biorreator	Tempo em horas											
	0	4	8	12	24	36	48	60	72	84	96	108
A	6,01	6,01	6,03	6,06	6,15	6,67	6,21	6,11	6,15	6,15	6,32	6,23
A'	6	6	6,02	6,04	6,14	6,7	6,12	6,05	6,06	6,2	6,23	6,19
B	6,02	6,02	6,04	6,07	6,18	6,88	6,7	6,69	6,69	6,74	6,82	6,79
B'	6,01	6,01	6,03	6,05	6,17	6,9	6,66	6,67	6,64	6,73	6,84	6,79
Controle	5,8	5,81	5,82	5,85	5,9	6	5,43	5,43	5,44	5,45	5,61	5,59
Controle '	5,79	5,8	5,81	5,84	5,87	5,99	5,34	5,44	5,33	5,49	5,61	5,57

APÊNDICE 4

Reagentes utilizados nas análises cromatográficas

Todos os reagentes utilizados estão citados abaixo e são padrões analíticos (PA).

Padrão analítico de glifosato (99% de pureza), resina de troca catiônica AG50-W, 100-200 Mesh, forma hidrogênio (Aldrich™), água deionizada, ácido clorídrico concentrado (Merck™), dihidrogênio fosfato de potássio (Aldrich™, grau HPLC), fosfato de potássio monobásico, metanol, ácido fosfórico (85% de pureza), hipoclorito de cálcio (65% de cálcio disponível), cloreto de cálcio (grau analítico), 2-Mercaptoetanol, hidróxido de amônio 25% (grau analítico), hidróxido de potássio, hidróxido de sódio, 1,2-dicarboxaldeído ftálico, ácido bórico.