



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA E
DESENVOLVIMENTO RURAL SUSTENTÁVEL
MESTRADO EM AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL
SUSTENTÁVEL**

FERNANDA NATALÍ DEMICHELLI

**ISOLAMENTO, SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE
BIODEGRADAÇÃO DE GLIFOSATO (N-(FOSFONOMETIL)GLICINA) POR
MICRORGANISMOS ISOLADOS DE SOLO DE LAVOURA, EM
LARANJEIRAS DO SUL, PR.**

**LARANJEIRAS DO SUL
2016**

FERNANDA NATALÍ DEMICHELLI

**ISOLAMENTO, SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE
BIODEGRADAÇÃO DE GLIFOSATO (N-(FOSFONOMETIL)GLICINA) POR
MICRORGANISMOS ISOLADOS DE SOLO DE LAVOURA, EM
LARANJEIRAS DO SUL, PR.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito para obtenção do título de Mestre em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável sob a orientação da Prof^ª Dra Luisa Helena Cazarolli e co-orientação da Prof^ª Dra Cátia Tavares dos Passos.

LARANJEIRAS DO SUL
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

Campus Laranjeiras do Sul
BR 158, KM 405
CEP: 85.301 - 970
Caixa Postal 106
Laranjeiras do Sul – PR
Brasil

DGI/DGCI - Divisão de Gestão de Conhecimento e Inovação

Demichelli, Fernanda Natalí
Isolamento, seleção e avaliação do potencial de biodegradação de glifosato (n-(fosfonometil)glicina) por microrganismos isolados de solo de lavoura, em Laranjeiras do Sul, PR"/ Fernanda Natalí Demichelli. -- 2016.
90 f.:il.

Orientadora: Luisa Helena Cazarolli.
Co-orientadora: Cátia Tavares dos Passos.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável (PPGADR), Laranjeiras do Sul, PR, 2016.

1. Glifosato. 2. Biodegradação. 3. Velocidade de Crescimento. 4. Agrotóxicos . 5. Microrganismos. I. Cazarolli, Luisa Helena, orient. II. Passos, Cátia Tavares dos, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FERNANDA NATALI DEMICHELLI

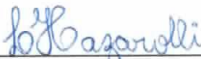
TÍTULO: "Isolamento, seleção e avaliação do potencial de biodegradação de glifosato (n-(fosfonometil)glicina) por microrganismos isolados de solo de lavoura, em Laranjeiras do Sul, PR"

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável – PPGADR da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS. Para obtenção do título de Mestre em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável, defendido em banca examinadora em 07/03/2016

Orientador (a): Profa. Dra. Luisa Helena Cazarolli

Aprovado em: 07 / 03 / 2016

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Luisa Helena Cazarolli (UFFS)



Profa. Dra. Cátia Tavares dos Passos (UFFS)



Profa. Dra. Patrícia Dörr de Quadros (UFRGS)



Prof. Dr. Gilmar Franzener (UFFS)

Laranjeiras do Sul/PR, março de 2016

À Jacira, minha mãe, Gustavo meu irmão e
Thiago meu amor, pessoas mais importantes
da minha vida. Obrigada por existirem, pelas
palavras de confiança e de carinho que me
fizeram prosseguir até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente às professoras Dr^a. Luisa Helena Cazarolli e Dr^a. Cátia Tavares dos Passos, pela oportunidade, aprendizado, confiança e pela dedicada orientação deste trabalho.

Agradeço à todos os professores do colegiado, pela oportunidade de expandir o conhecimento no apaixonante mundo da Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável.

Ao professor Dr. Gilmar Franzener e à Pós Doutoranda Dr^a. Gabriela Moura, pela sempre presteza em auxiliar nas dúvidas de identificação dos fungos.

Ao professor Msc. Diego dos Santos, pelo auxílio na tão complicada Estatística e seu programa “R”.

Ao professor Dr. Rubens Fey, no auxílio da coleta e identificação do solo.

Ao Laboratório de Identificação de Solos da UTFPR/Iapar, pela realização da identificação físico-química do solo.

À Doutoranda Juciana Clarice Cazarolli pelo auxílio em diversos momentos.

À técnica do laboratório de microbiologia, Vanessa Gomes da Silva, por toda a ajuda e apoio essenciais no desenvolvimento da parte prática.

Aos colegas do laboratório, Jaqueline, Naiane, Sílvia, Eduardo, pela amizade e pela troca de conhecimento.

À todos os colegas e parceiros incríveis do mestrado, que tornaram esse momento de aprendizado muito especial.

Aos colegas de trabalho e amigos, da ASSAC e da ASSAE, pelo apoio e incentivo em todas as horas.

À todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

RESUMO

O uso abusivo de glifosato, um dos agrotóxicos mais utilizados no Brasil, está relacionado a problemas de saúde e ao ambiente. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo isolar, avaliar a capacidade de crescimento ou degradação e posteriormente identificar microrganismos autóctones degradadores de glifosato de um solo com uso intensivo deste agrotóxico. Foram coletadas 12 amostras de solo aleatoriamente (0-10 cm de profundidade), homogeneizadas e após transferido 1 g da amostra para erlenmeyer contendo 50 mL de meio mineral (MM) (g/L, KCl 0,7; KH₂PO₄ 2,0; Na₂HPO₄ 3,0; NH₄NO₃ 1,0; MgSO₄ 1,0; FeSO₄ 4,0; MnCl₂ 0,2; CaCl₂ 0,2; pH 7,2) com 100 mg/L de glifosato (única fonte de carbono) com 3 transferências subsequentes (1 mL) a cada cinco dias, incubando a 28 °C. Após, foi realizada a contagem em placas e as bactérias e fungos morfológicamente diferentes foram isolados em ágar nutriente e sabouraud com 300 mg/L de glifosato, respectivamente. A seguir, os fungos foram incubados em ágar MM sólido com 300 mg/L de glifosato, como única fonte de carbono, a 28 °C/14 dias. Foi realizada a medida diária do crescimento micelial radial e calculada a velocidade de crescimento por meio de regressão linear dos raios das colônias. Do total de 18 fungos isolados, 11 utilizaram o glifosato como fonte de carbono. Foram identificados oito gêneros de fungos filamentosos e dois falsos fungos, que apresentaram as maiores velocidades de crescimento radial. Os gêneros que mais se destacaram foram: *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Geotrichum* sp. Foram isoladas 25 bactérias (47% bacilos gram negativas), destas, seis permaneceram viáveis até o experimento de degradação de glifosato. Para o preparo do inóculo bacteriano, uma alçada foi transferida para erlenmeyers com 100 mL de caldo nutriente e 300 mg/L de glifosato, incubado a 150 rpm/48 h. Após três lavagens (MM), o inóculo foi padronizado (escala de McFarland). O ensaio do potencial de degradação das bactérias isoladas foi realizado com a incubação do inóculo (5×10^6 UFC/mL) em MM na ausência/presença de diferentes concentrações de glifosato (300, 500 e 700 mg/L) utilizando o indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP), incubadas em estufa (28 °C) e realizadas medidas espectrofotométricas a 600 nm no período de 0-120h. As 6 bactérias testadas apresentaram velocidade de degradação de DCPIP nas concentrações testadas, indicando que possivelmente utilizaram o glifosato como fonte de carbono. A bactéria B8, relativamente às demais, foi a que mais reduziu a quantidade de DCPIP. Os resultados sugerem que os microrganismos isolados são tolerantes e apresentam alto potencial de degradação de glifosato, podendo ser utilizados em futuros estudos de biorremediação de solos contaminados com este agrotóxico.

Palavras chave: Glifosato, biodegradação, velocidade de crescimento, agrotóxicos, microrganismos.

ABSTRACT

The abusive use of glyphosate, one of the most widely used pesticides in Brazil is related to health issues and the environment. Therefore, this study aimed to isolate, evaluate the growth capacity or degradation and subsequently identify indigenous microorganisms degrading glyphosate in a soil with intensive use of this pesticide. The 12 samples were collected randomly soil (0-10 cm depth), homogenized and then 1 g of the sample was transferred in a flask containing 50 ml of mineral medium (MM) (g/L KCl 0.7; KH₂PO₄ 2.0; Na₂HPO₄, 3.0; NH₄NO₃ 1.0; MgSO₄ 1.0; FeSO₄ 4.0; MnCl₂, 0.2; CaCl₂ 0.2; pH 7.2) with 100 mg/L glyphosate (as sole carbon source) 3 subsequent transfers (1 ml) every five days and incubation at 28 ° C. Bacteria and fungi morphologically different were isolated on nutrient agar, and Sabouraud with 300 mg/L of glyphosate, respectively. The following fungi were incubated on solid MM agar with 300 mg/l glyphosate as sole carbon source at 28 ° C by 14 days. The radial mycelial growth was daily measured and the growth rate were calculated by linear regression using the colonies rays. Of the total of 18 fungal isolates, 11 used glyphosate as a carbon source. eight genera of filamentous fungi and two false fungi, with the highest rates of radial growth were identified. The genres that stood out were: *Aspergillus*, *Fusarium* sp, *Penicillium* sp... and *Geotrichum* sp. 25 Bacteria were isolated (47% gram-negative bacilli), these six remained viable by the experiment of glyphosate degradation. To prepare the inoculum, was transferred to a Erlenmeyer flasks with 100 ml of nutrient broth and 300 mg/L of glyphosate, incubated at 150 rpm by 48 h. After three washes (MM), the inoculum was standardized using McFarland scale. The potential for degradation of the test isolates was performed with incubation inoculum (5x10⁶ CFU/ml) in MM in the absence or presence of different concentrations of glyphosate (300, 500 and 700 mg/L) using redox indicator 2,6-dichlorophenol-indophenol (DCPIP), incubated in a greenhouse (28 °C) and spectrometric measured at 600 nm in 0-120h period. The 6 bacterial strains tested showed DCPIP degradation rate at the concentrations tested, indicating that possibly used glyphosate as a carbon source. The B8 bacteria in relation to the others, was the most reduced the amount of DPCIP. The results suggest that microorganisms are tolerant and have a high potential for glyphosate degradation and can be used in future studies of bioremediation of soils contaminated with this pesticide.

Keywords: glyphosate, biodegradation, growth rate, pesticides, microorganisms.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos agrotóxicos de acordo com os efeitos à saúde humana.....	24
Tabela 2. Composição físico-química da amostra de solo coletada com profundidade de 0 - 10 cm.....	46
Tabela 3. Quantificação de microrganismos presentes em diferentes concentrações de glifosato.....	48
Tabela 4. Morfologia das cepas bacterianas isoladas na presença de 300 mg/L de glifosato.....	49
Tabela 5. Frequência da coloração e da forma das cepas bacterianas isoladas na presença de 300 mg/L de glifosato.....	50
Tabela 6. Identificação em nível de gênero dos fungos isolados que apresentaram crescimento em MM com glifosato (300 mg/L) como única fonte de carbono.....	53
Tabela 7. Velocidade de crescimento radial dos fungos, em mm/h.....	61
Tabela 8. Média da velocidade de oxidação de DCPIP (g/L/h) $\times 10^5$, na presença de 300 mg/L de glifosato.....	65
Tabela 9. Média da velocidade de oxidação de DCPIP (g/L/h) $\times 10^5$, na presença de 500 mg/L de glifosato.....	66
Tabela 10. Média da velocidade de oxidação DCPIP (g/L/h) $\times 10^5$, na presença de 700 mg/L de glifosato.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vendas de agrotóxicos por classe, em toneladas e sua percentagem, nos anos 2009 e 2013 no Brasil.	25
Figura 2. Processos e transformações que regulam a persistência, o destino e os impactos potenciais de xenobióticos no solo.	29
Figura 3. Fórmula estrutural do agrotóxico glifosato.	34
Figura 4. Mecanismos envolvidos na sorção do glifosato.	35
Figura 5. Rotas de degradação do agrotóxico glifosato.	38
Figura 6. Imagem via satélite do local de coleta das amostras de solo, no município de Laranjeiras do Sul - PR.	41
Figura 7. Dissociação do glifosato, de acordo com seu comportamento zwitteriônico.	47
Figura 8. Crescimento radial micelial dos fungos (a) e (b).	52
Figura 9. (a) Crescimento micelial de <i>Aspergillus</i> sp. em ágar BDA, sem glifosato. (b) Microcultivo em ágar BDA, sem glifosato.	54
Figura 10. (a) Crescimento micelial de <i>Penicillium</i> sp. em ágar BDA, sem glifosato. (b) Microcultivo em ágar BDA, sem glifosato.	55
Figura 11. (a) Crescimento micelial de <i>Penicillium</i> sp. em ágar BDA, sem glifosato. (b) Microcultivo em ágar BDA, sem glifosato.	55
Figura 12. (a) Crescimento micelial de <i>Geotrichum</i> sp. em ágar BDA, sem glifosato. (b) Microcultivo em ágar BDA, sem glifosato.	56
Figura 13. (a) Crescimento micelial de <i>Fusarium</i> sp. em ágar BDA, sem glifosato. (b) Microcultivo em ágar BDA, sem glifosato.	57
Figura 14. (a) Crescimento micelial de <i>Cladosporium</i> sp. em ágar BDA, sem glifosato. (b) Microcultivo em ágar BDA, sem glifosato.	57
Figura 15. (a) Crescimento micelial de <i>Trichoderma</i> sp. em ágar BDA, sem glifosato. (b) Microcultivo em ágar BDA, sem glifosato.	58
Figura 16. (a) Crescimento micelial de <i>Rhizoctonia</i> sp. em ágar BDA, sem glifosato. (b) e (c) Microcultivo em ágar BDA, sem glifosato.	59
Figura 17. (a) Crescimento micelial de falso fungo F13 em ágar BDA, sem glifosato. (b) Crescimento micelial de falso fungo F11 em ágar BDA, sem glifosato. (c) Microcultivo F13 em ágar BDA, sem glifosato, (d) Microcultivo F11 em ágar BDA, sem glifosato.	60

Figura 18. Média da velocidade de oxidação de DCPIP (g/L/h) $\times 10^5$, na presença de 300 mg/L de glifosato.....	64
Figura 19. Média da velocidade de oxidação de DCPIP (g/L/h) $\times 10^5$, na presença de 500 mg/L de glifosato.....	65
Figura 20. Média da velocidade de oxidação DCPIP (g/L/h) $\times 10^5$, na presença de 700 mg/L de glifosato.....	66
Figura 21. Percentagem de degradação de glifosato, expresso em percentual de DCPIP oxidado, em 120h.	67

LISTA DE SIGLAS

MM – Meio mineral

DCPIP - 2,6-diclorofenol-indofenol

UFC – Unidade formadora de colônia

DL – Dose letal

IPARDES - Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social

SEAB - Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento

UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

IAPAR – Instituto de Pesquisa Agropecuária do Paraná

AMPA – Ácido aminometilfosfônico

BDA - Ágar batata dextrose

VCR – Velocidade de crescimento Radial

CTC - Capacidade de troca de cátions

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

EPSPS - 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVO GERAL	19
3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4	REFERENCIAL TEÓRICO	20
4.1	Desenvolvimento Rural, Revolução Verde e o contraponto da Agrocologia	20
4.2	Agrotóxicos	23
4.3	Problemas Relacionados à Saúde Humana.....	25
4.4	Problemas Relacionados ao Meio Ambiente	26
4.5	Dinâmica dos Agrotóxicos no Solo	27
4.6	Os Microrganismos do Solo: Impacto e Degradação dos Agrotóxicos	30
4.7	Glifosato	33
4.8	Biodegradação do Glifosato.....	36
5	METODOLOGIA	40
5.1	Glifosato	40
5.2	Coletas das Amostras de Solo	40
5.3	Isolamento dos Microrganismos	41
5.4	Preparo do pré-inóculo	42
5.5	Estudo de degradação de diferentes concentrações de glifosato por isolados bacterianos.....	42
5.6	Avaliação da capacidade de degradação e seleção dos fungos filamentosos potencialmente degradadores de glifosato.....	43
5.7	Identificação dos Isolados	44
5.8	Análises Estatísticas	44
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	45
6.1	Coleta e análise físico-química das amostras de solo	45

6.2 Isolamento e Seleção dos Microrganismos Potencialmente Degradadores.....	47
6.3 Avaliação do crescimento e identificação dos fungos filamentosos.....	51
6.4 Avaliação preliminar de degradação de glifosato pelos isolados bacterianos.....	62
CONCLUSÃO.....	69
PERSPECTIVAS	71
BIBLIOGRAFIA	72
ANEXOS	90

1 INTRODUÇÃO

O sistema de produção agrícola brasileiro é fruto de um modelo de desenvolvimento proposto em meados de 1960, financiado por políticas governamentais de crédito associado ao investimento pesado na modernização agrícola, conhecido como Revolução Verde. Esses pacotes tecnológicos compreendiam sementes, fertilizantes químicos, agrotóxicos, máquinas agrícolas de grande porte, com intuito de produzir monoculturas e aumentar a produção de alimentos.

A princípio, esse modelo de agricultura resultou no aumento da produção de alimentos, no entanto, trouxe consigo sérios problemas. Um deles foi a exclusão dos pequenos agricultores, que impossibilitados de acessar os recursos tecnológicos acabaram à margem do processo de modernização. Além disso, problemas ambientais e de saúde começaram a surgir após a implantação da Revolução Verde.

Nos anos seguintes, movimentos ambientalistas e pequenos produtores rurais preocupados com os problemas decorrentes da modernização da agricultura, propuseram questionamentos a esse modelo, promovendo debates e ações, visando um modelo alternativo de desenvolvimento. Apesar de ter se conseguido importantes conquistas a partir desses movimentos de resistência, o cenário da produção agrícola atual não mudou muito em relação ao seu modelo inicial. Além dos problemas sociais decorrentes do sistema atual de produção, estudos recentes têm relacionado o uso de agrotóxicos a problemas de saúde humana como intoxicações, câncer, suicídio, assim como problemas ambientais como contaminação de aquíferos, do solo, alterações na biota e na vegetação.

A cada ano tem se verificado o aumento da produção, comercialização e aplicação de agrotóxicos em todo mundo, sendo o Brasil o maior consumidor desde o ano de 2008 e o Paraná o terceiro estado com maior consumo (CARNEIRO, 2015; PARANÁ, 2013). Segundo o IPARDES (2010) e o núcleo Regional da Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento (SEAB), o núcleo do município de Laranjeiras do Sul, aparece como um dos que apresenta o maior consumo de agrotóxicos do estado, com registro de valores entre 7,0 e 11,8 Kg/ha/ano (PARANÁ, 2013).

Dentre os agrotóxicos disponíveis para uso atualmente, o glifosato merece destaque por ser o herbicida mais consumido no Brasil (CARNEIRO, 2015). O grande uso do glifosato está atrelado ao cultivo da soja, principalmente a soja transgênica, pois é tolerante ao mesmo, não tendo seu crescimento afetado pelo agrotóxico. Devido à grande quantidade aplicada às lavouras, se observa o fenômeno de resistência de plantas

adventícias não desejadas que exige, cada vez mais quantidade de aplicação e associação com outros agrotóxicos extremamente tóxicos, como o 2,4-D, paraquat e diquat (CARNEIRO, 2015).

Além disso, a popularidade do glifosato está relacionada à publicidade de que este agrotóxico tem um baixo impacto ambiental, sendo seguro para a saúde humana e de animais, já que atua em uma via metabólica presente exclusivamente em plantas e alguns microrganismos (LONDRES, 2011; POLLEGIONI et al., 2011). No entanto, estudos indicam que ele apresenta efeitos em organismos animais, especialmente humanos, com ações disruptoras do sistema endócrino, desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, potencial genotóxico e de estresse oxidativo, bem como alterações morfológicas e funcionais de células de diferentes tecidos (WILLIAMS et al., 2000; LONDRES, 2011; CATTANI et al., 2014; CAVALLI et al., 2013). Além destes problemas, os danos ao meio ambiente como contaminação das águas, resistência de plantas, de insetos e microrganismos aos agrotóxicos, em especial ao glifosato, são cada vez mais frequentes constituindo-se como um dos mais complexos problemas da agricultura na atualidade (ROUSH; TABASHNIK, 1990).

Diante desses problemas, amplia-se o debate acerca de outros modelos de agricultura, com destaque para a agroecologia que surgiu no Brasil a partir de meados da década de 1980 com os movimentos de resistência à agricultura tecnológica, associada aos pequenos agricultores tradicionais, camponeses e familiares (CAPORAL; PETERSEN, 2012). É uma proposta para repensar o desenvolvimento rural dentro de uma perspectiva de sustentabilidade, visando fortalecer a agricultura familiar através de pressupostos centrados na preservação do meio ambiente e na utilização sustentável dos recursos naturais, na produção familiar ou camponesa, na comercialização de alimentos justa e socialmente responsável e na independência dos agricultores com relação aos insumos externos (agrotóxicos, fertilizantes, sementes etc.) (GUZMÁN, 1999).

A produção agroecológica no Brasil tem como base legal a Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003, e o Decreto no 6.323, de 27 de dezembro de 2007, além de instruções normativas, como a Instrução Normativa nº 46, de 6 de outubro de 2011 e a Instrução Normativa nº 17, de 18 de junho de 2014. Todos orientam sobre os sistemas de produção que adotam tecnologias que otimizem o uso de recursos naturais e socioeconômicos, empregando métodos culturais, biológicos e mecânicos, em contraposição ao uso de materiais sintéticos em qualquer fase do processo de produção,

processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção do meio ambiente.

Para realizar a conversão de unidades de produção convencionais em orgânicas, vários critérios precisam ser seguidos, conforme a Instrução Normativa nº 46 de 6 de outubro de 2011. Com base nesses critérios, foi estabelecido um tempo mínimo para que ocorra o processo de conversão, variável de acordo com o tipo de exploração e a utilização anterior da unidade de produção, considerando a situação ecológica e social. Este período de tempo pode variar de doze a dezoito meses de manejo orgânico para que as produções do ciclo subsequente sejam consideradas como orgânicas (BRASIL, 2011). No entanto, não se tem informação de que esse intervalo de tempo seja suficiente para que todos os agrotóxicos utilizados na área possam ser degradados e eliminados do ambiente.

Os estudos relacionados à dinâmica dos agrotóxicos no solo e degradação dos mesmos são importantes para entender e otimizar a eliminação desses resíduos. Sabe-se que os microrganismos desempenham um papel fundamental nesse processo, por apresentarem capacidade de degradar substâncias persistentes no meio. Este processo, denominado biodegradação, consiste na degradação microbiológica de um composto orgânico no solo, por meio de transformações que podem gerar compostos menos tóxicos, pela sua inativação ou pela completa mineralização até CO₂ e água. As bactérias e fungos presentes no solo conseguem utilizar as moléculas dos agrotóxicos como fonte de energia, devido a isso são considerados os principais degradadores destes produtos no ambiente terrestre e aquático (ANDRIGHETTI, 2011).

Os microrganismos exibem estratégias para assimilação ou metabolismo do contaminante por meio de seu aparato enzimático. Para isso, muitas vezes realizam os processos denominados catabolismo e cometabolismo. No catabolismo o substrato absorvido é quebrado em moléculas menores para gerar energia, ocorrendo aumento da biomassa microbiana. No cometabolismo ocorre transformações de um substrato na presença de um substrato secundário biodegradável como fonte de carbono e energia, desta forma os microrganismos transformam o composto sem dele retirar energia para seu desenvolvimento. Nesse sentido, a degradação dos pesticidas é influenciada pelas propriedades quantitativas e qualitativas da microbiota do solo além da disponibilidade do composto para os microrganismos (ALEXANDER, 1981; ARAÚJO, 2002).

De acordo com Bento et al. (2003), a biorremediação pode ser considerada como uma nova tecnologia para tratar locais contaminados, mediante o uso de agentes biológicos capazes de modificar ou decompor poluentes alvos. A adoção de técnicas de

biorremediação baseadas na utilização de microrganismos do solo para degradar herbicidas pode contribuir para a dissipação da molécula contaminante do ambiente.

Assim, os processos de biorremediação, além de considerados de baixo custo e aceitável do ponto de vista ambiental (MARIANO et al., 2007), possibilitam a recuperação do equilíbrio biológico do solo e ainda podem auxiliar na garantia da descontaminação durante a transição da produção convencional para a produção agroecológica.

Tendo em vista a necessidade em se repensar o modelo de desenvolvimento e consequentemente de agricultura, diante dos problemas de saúde e de contaminação ambiental, provocados pelo uso indiscriminado de agrotóxicos, em especial o elevado consumo de glifosato nas lavouras, o presente trabalho teve como objetivo realizar uma investigação acerca de microrganismos presentes no solo, potenciais degradadores do agrotóxico glifosato, provenientes de uma propriedade com uso intensivo deste, no município de Laranjeiras do Sul, Paraná.

2 OBJETIVO GERAL

Isolar e identificar os microrganismos viáveis de uma amostra de solo, potenciais degradadores de glifosato, bem como, investigar sua capacidade de degradação, utilizando o agrotóxico como única fonte de carbono, de uma lavoura no município de Laranjeiras do Sul – PR.

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o isolamento de microrganismos a partir de amostra de solo contaminado com glifosato;
- Avaliar a capacidade de crescimento e degradação dos microrganismos, frente à diferentes concentrações de glifosato;
- Identificar a nível de gênero, os fungos que apresentarem maior velocidade de degradação de glifosato.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Desenvolvimento Rural, Revolução Verde e o contraponto da Agroecologia

O conceito de desenvolvimento não cabe em uma definição simples, no entanto, foi por muito tempo e ainda é mensurado de acordo com o crescimento econômico. Seguindo a ideia de desenvolvimento análogo ao crescimento econômico, a agricultura sempre foi vista como um importante setor capaz de impulsionar crescimento, mas antes disso necessitaria se modernizar. De acordo com Abramovay (1992), o modo de produção empresarial na agricultura se materializou devido às condições introduzidas e consolidadas pelo projeto de modernização massiva, iniciado nas décadas de 1960 a 1970 em quase todo o mundo. O processo de modernização da agricultura ganhou força já no período pós-guerra (1939-1945), com o discurso de aumentar a produção de alimentos no mundo. Conhecida como Revolução Verde, foi um programa criado com o intuito de contribuir para o aumento da produtividade agrícola no mundo. Com isso, possibilitou às empresas transnacionais, que detinham as tecnologias agrícolas, aumentar os lucros e manter a dependência dos países menos desenvolvidos que necessitavam desses produtos tecnológicos para poder produzir (BRUM, 1987).

No Brasil, a modernização da agricultura chegou um pouco mais tarde, nas décadas de 1960 a 1980 e permanece em plena expansão. Para sua implantação teve apoio de crédito rural financiado pelo governo. Assim, as grandes propriedades fundiárias foram beneficiadas por programas e projetos especiais, além de linhas de apoio e defesa como seguro agrícola, assistência rural e desenvolvimento de pesquisas, criados e mantidos pelos governos da época (DELGADO, 2012).

Uma das inúmeras consequências deste processo de modernização foi a evasão de muitos trabalhadores rurais para a cidade, uma vez que essas pessoas trabalhavam em sua terra ou eram empregados nas lavouras e tiveram seus trabalhos substituídos pelas máquinas, gerando bolsões de pobreza e desemprego nas cidades (LEÃO, 2007). Além dos problemas sociais ocasionados pela modernização da agricultura, os impactos ambientais relacionados à mecanização pesada e o uso intensivo de agrotóxicos são bastante conhecidos. Estes são impactos que transcendem o setor agrícola e afetam o conjunto da sociedade como um todo.

A modernização da agricultura teve e tem como base os insumos externos que demandam alto gasto de energia para sua produção e demasiado gasto financeiro por parte

dos agricultores para sua aquisição. O Brasil importa a maioria dos agrotóxicos e fertilizantes utilizados na agricultura nacional, acarretando em aumento dos custos de produção das principais *commodities* brasileiras, o que diminui sua competitividade e prejudica seu mercado (SAAB; PAULA, 2008; ANVISA; UFPR, 2012). Já em relação ao cultivo propriamente dito, o uso excessivo de máquinas pesadas e tratores, associado ao uso de técnicas inadequadas de manejo e conservação do solo tem levado ao aumento progressivo das perdas por erosão, além de sérios danos de compactação dos solos, bem como de degradação dos fatores naturais presentes no solo e essenciais para as boas condições de cultivo (REMY; MARIN-LAFLECHE, 1976; ROMEIRO, 2007). Ainda, o uso sistemático de agrotóxicos e fertilizantes químicos têm repercussões negativas sobre a produtividade agrícola, pois afeta o equilíbrio dos ecossistemas destruindo inúmeros elos da cadeia de presas e predadores resultando, portanto, no surgimento de novas pragas (GOLDSMITH, 1980; PASCHOAL, 1983).

Outro problema ambiental relacionado à modernização da agricultura foi a introdução das monoculturas em grandes extensões de terra. A monocultura implica na simplificação da biodiversidade local, resultando em um ecossistema artificial (simplificado) que requer constante intervenção humana através do uso de agrotóxicos e fertilizantes químicos, uma vez que apresenta maior necessidade de fontes exógenas de energia para manter o equilíbrio. O uso desses insumos químicos promove uma melhoria temporária da produção e conseqüentemente dos rendimentos, além de provocar elevados custos ambientais e sociais não desejados (CONWAY, 1997).

Recentemente, outras tecnologias estão se difundindo no campo, como o uso crescente de organismos geneticamente modificados (OGMs) e plantas transgênicas (ALTIERI, 2000). Até o momento, não se sabem seus reais danos, uma vez que os efeitos ecológicos dos cultivos obtidos via engenharia genética podem não se limitar à resistência das pragas ou à criação de novas plantas espontâneas (LAPPE et al., 1998). Além disso, segundo Altieri (2000), a manipulação genética pode eliminar, inativar substâncias valiosas presentes nos alimentos ou ainda estimular a produção de substâncias tóxicas ao consumo. Ainda, as plantas transgênicas permitem o uso de quantidades ainda maiores de agrotóxicos durante sua produção, uma vez que são tolerantes à presença destas substâncias e não sofrem influência das mesmas (CARNEIRO, 2015).

Já na década de 70, quando o modelo da Revolução Verde estava em franca expansão no Brasil, percebiam-se as limitações deste modelo de crescimento e os problemas que começavam a surgir. Assim, as discussões e as contestações a respeito do

conceito de desenvolvimento foram abrangendo novos aspectos, como a limitação dos recursos naturais, a exclusão dos países subdesenvolvidos além de desigualdades sociais. Ainda, questões relacionadas ao uso de inseticidas e seu perigo à saúde humana e do ambiente começaram a fazer parte das discussões sobre desenvolvimento (FURTADO, 1974).

A agroecologia surge nesse contexto como um movimento de oposição à agricultura convencional. Teve início a partir da década de 1920 e valorizava o uso da matéria orgânica e de outras práticas culturais favoráveis aos processos biológicos. No Brasil, o debate agroecológico teve início a partir de 1970 com movimentos ambientalistas e agricultores familiares que não se integravam na agricultura convencional (MATTOS, 2006). Altieri (1987) destaca que a agroecologia fornece os princípios ecológicos básicos para o estudo e tratamento de ecossistemas tanto produtivos quanto preservadores dos recursos naturais, e que sejam culturalmente sensíveis, socialmente justos e economicamente viáveis. Assim, a agroecologia corresponde a um enfoque científico destinado a apoiar a transição dos atuais modelos de desenvolvimento rural e de agricultura convencional para estilos de desenvolvimento rural e de agricultura sustentável (COSTABEBER; CAPORAL, 2003).

A partir dos princípios da agroecologia a agricultura familiar vem se fortalecendo e atualmente desempenha um papel importante na produção e fornecimento de alimentos à população em geral (FAO, 2014). Segundo afirma Altieri (2010), os sistemas de agricultura diversificados nos quais o agricultor em pequena escala produz grãos, frutas, verduras, feno e produtos para animais no mesmo campo, dão uma produção total maior que as monoculturas como o milho cultivado em grande escala (ALTIERI, 2010). As vantagens de produção familiar podem variar em média de 20% a 60% a mais do que a convencional, já que as policulturas reduzem perdas devido às plantas espontâneas (ocupando o espaço que de outra forma estas poderiam ocupar), os insetos (ao melhorar o habitat de organismos benéficos) e as doenças (devido à maior diversidade genética), e fazem um uso mais eficiente dos recursos disponíveis de água, luz e nutrientes (ALTIERI, 2010; FRANCIS, 1986).

Ao mesmo tempo em que se intensificam os problemas resultantes da modernização agrícola pelo uso indiscriminado de agrotóxicos, insumos químicos e organismos geneticamente modificados, verificam-se novos esforços para a difusão da agroecologia como alternativa para a construção de um novo modelo de produção e de desenvolvimento sustentável (ALTIERI, 2010).

4.2 Agrotóxicos

No Brasil os agrotóxicos são definidos pela Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto nº 4.074/2002:

Agrotóxicos e afins – produtos e agentes de processos físico, químico ou biológico, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou plantações, de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como desfolhantes e dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 2002).

Os agrotóxicos consistem de múltiplas classes e subclasses de componentes e são classificados quanto ao organismo alvo, de acordo com sua classe química ou ainda de acordo com o grau de toxicidade, como pode ser observado na Tabela 1 (BRASIL, 2011; RODRIGUES, 2012).

Quanto ao organismo que eliminam ou controlam (YAMASHITA, 2008; BRASIL, 2011), os agrotóxicos podem ser assim classificados: inseticidas (insetos), herbicidas (ervas daninhas), fungicidas (fungos), raticidas (roedores), bactericidas (bactérias), nematicidas (nematoides, vermes), larvicidas (larvas), cupinicidas (cupins), formicidas (formigas), pulguicidas (pulgas), piolhidas (piolhos), carrapaticidas (carrapatos), acaricidas (ácaros), moluscicidas (moluscos), desfolhantes: eliminam folhas indesejadas.

Ainda, os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com a toxicidade ao ambiente e animais. Esta classificação é baseada na dose letal 50 (DL 50) que é um valor estatístico que determina a quantidade de agrotóxico em mg/kg de peso corporal, necessária para matar 50% da amostra populacional em estudos por intoxicações agudas. Os valores são determinados em cobaias e extrapolados para humanos a partir do peso (RIBAS; MATSUMURA, 2009; BRASIL, 2011). Existem quatro classes, a saber:

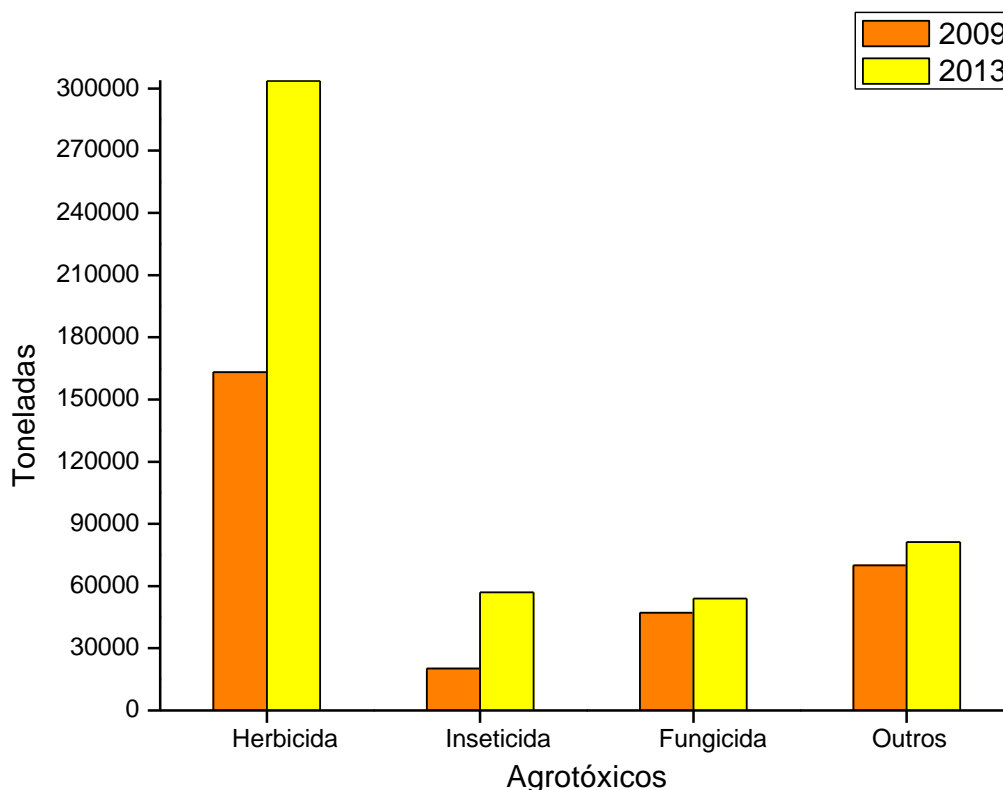
Tabela 1. Classificação dos agrotóxicos de acordo com os efeitos à saúde humana

Classe toxicológica	Descrição	Faixa indicativa de cor
Classe I	Extremamente tóxicos ($DL_{50} < 50$ mg/kg de peso vivo)	Faixa vermelha
Classe II	Altamente tóxicos ($DL_{50} - 50$ a 500 mg/kg de peso vivo)	Faixa amarela
Classe III	Medianamente tóxicos ($DL_{50} > 5000$ mg/kg de peso vivo)	Faixa azul
Classe IV	Pouco ou muito pouco tóxicos ($DL_{50} > 5000$ mg/kg de peso vivo)	Faixa verde

Fonte: RIBAS; MATSUMURA, 2009.

Nos últimos anos têm se observado um aumento crescente em relação à produção e uso de agrotóxicos, especialmente do grupo dos herbicidas, sendo que atualmente, estes constituem a principal porção de vendas de todos os agrotóxicos no sistema de produção agrícola no mundo industrializado (TADEO et al., 2000; PROCÓPIO et al., 2005; BRASIL, 2011). Conforme verifica-se na Figura 1, sobre a venda de agrotóxicos no Brasil, de 2009 a 2013 a comercialização de agrotóxicos passou de 300.349,7 toneladas para 495.764,55 toneladas, de ingrediente ativo. Desse total, em 2009 a quantidade de ingrediente ativo comercializado, referente aos herbicidas foi de 163.119,59 toneladas, esse valor representava 54,31% das vendas. Em 2013 passou para 303.573,23 toneladas e representou 61,23% do total de ingrediente ativo de herbicidas comercializados. Comparando os dados de 2009 e 2013, pode-se observar que a quantidade de ingrediente ativo de herbicidas comercializados mais que dobrou no período de cinco anos (IBAMA, 2014).

Figura 1. Vendas de agrotóxicos por classe, em toneladas e sua percentagem, nos anos 2009 e 2013 no Brasil.



Fonte: IBAMA, 2014.

Em 2010, o mercado nacional movimentou cerca de US\$ 7,3 bilhões e representou 19% do mercado global de agrotóxicos. Em 2011 houve um aumento de 16,3% das vendas, alcançando US\$ 8,5 bilhões, sendo que as lavouras de soja, milho, algodão e cana-de-açúcar representam 80% do total das vendas do setor agrícola (AUGUSTO et al., 2012).

4.3 Problemas Relacionados à Saúde Humana

Os agrotóxicos estão entre os mais importantes fatores de risco para a saúde da população em geral sendo que a exposição e a contaminação de pessoas aos agrotóxicos podem se dar de forma aguda ou crônica, com sintomatologias bastante inespecíficas (BRASIL, 2011). No Brasil, as intoxicações agudas por agrotóxicos ocupam a segunda posição dentre as intoxicações exógenas, sendo que no período de 2006 a 2010 a maioria dos casos de intoxicação por inseticidas (73% organofosforados, piretróides e

carbamatos), raticidas (15,3%) e herbicidas (9,7%) estiveram relacionados à tentativa de suicídio, aos acidentes e à exposição ocupacional (FALK et al., 1996; PIRES et al., 2005; BRASIL, 2011).

Em geral, os efeitos crônicos decorrentes da exposição a agrotóxicos manifestam-se através de inúmeras patologias que atingem vários órgãos e sistemas com destaque para os problemas imunológicos, hematológicos, hepáticos, neurológicos, malformações congênitas e tumores (BRASIL, 2011). Estudo realizado em municípios de abrangência da 29ª SDR na região Oeste de Santa Catarina, junto a 197 famílias de produtores rurais, demonstraram alta prevalência de neoplasias de pele, próstata, mama e colo uterino (MAZON, 2007). Além disso, Koifman et al. (2002) observaram uma possível associação entre a exposição a agrotóxicos e a incidência de câncer de mama e de ovário, especialmente em mulheres após a menopausa. A toxicidade dos agrotóxicos vem sendo claramente relacionada com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer (PARRÓN et al., 2011). Recentes evidências relatam a atuação de alguns agrotóxicos como desreguladores endócrinos, contribuindo com vários efeitos adversos associados com a reprodução e o desenvolvimento. A exposição crônica a agrotóxicos também tem sido associada a sintomas psiquiátricos, incluindo transtornos afetivos como depressão, ansiedade e comportamento agressivo, contribuindo assim para o risco de suicídio (PIRES et al., 2005; MEYER et al., 2007; FRANCO et al., 2010; PARRÓN et al., 2011).

4.4 Problemas Relacionados ao Meio Ambiente

A grande utilização de agrotóxicos na produção agropecuária tem trazido uma série de transtornos e modificações para o ambiente, seja pela contaminação das comunidades de seres vivos que o compõem, seja pela sua acumulação nos segmentos bióticos e abióticos dos ecossistemas. Quando introduzidos no ambiente, cerca de 55% do total de agrotóxicos aplicados não atingem o alvo, dispersando-se para outros compartimentos ambientais como água, solo e atmosfera (GAVRILESCU, 2005). Após os agrotóxicos atingirem o solo, vários processos físicos, químicos e biológicos determinam seu comportamento. A dinâmica dos agrotóxicos é governada pelo processo de adsorção, o qual é responsável pela ligação desses às partículas do solo, influenciando na disponibilidade para os demais processos como transformação, degradação e transporte (HARPER, 1994).

Considerando os processos de transporte entre compartimentos ambientais, a lixiviação e o escoamento superficial merecem destaque. O escoamento superficial favorece a contaminação das águas superficiais, através do transporte do agrotóxico adsorvido às partículas do solo erodido ou dissolvido em água. A lixiviação dos agrotóxicos através do perfil do solo tende a resultar em contaminação das águas subterrâneas e nesse caso, as substâncias químicas são carregadas em solução com a água que alimenta os aquíferos (SPADOTTO et al., 2004). Um estudo realizado em localidade agrícola de Nova Friburgo – RJ, detectou concentrações de agrotóxicos anticolinesterásicos, em valores até oito vezes acima do limite permitido pela legislação brasileira, em dois pontos de um importante curso hídrico regional, pontos estes localizados em áreas onde a atividade agrícola era mais intensiva, com as lavouras chegando até as margens do rio (PERES; MOREIRA, 2007). Além disso, estudo na região da cultura do tomate no Município de Paty do Alferes – RJ, demonstrou que 70% dos pontos de coleta nos sistemas hídricos da região apresentaram contaminação elevada por agrotóxicos (VEIGA et al., 2006).

Além da contaminação das águas e dos solos um dos efeitos ambientais indesejáveis dos agrotóxicos é a contaminação de espécies que não interferem nos processos de produção (espécies não-alvo). Existem relatos na literatura do impacto da exposição aos agrotóxicos na redução das populações de polinizadores próximo às áreas onde esses produtos são utilizados (IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2005; ANVISA, 2008; GILL et al., 2012). Ainda, os problemas ocasionados pela resistência de plantas, insetos e microrganismos aos agrotóxicos são cada vez mais frequentes, constituindo-se como um dos mais complexos problemas de controle de pragas na atualidade (ROUSH; TABASHNIK, 1990).

4.5 Dinâmica dos Agrotóxicos no Solo

A proporção relativa dos componentes do solo (divididos em fases sólida, líquida e gasosa) afetam seu comportamento de forma geral. A fase sólida do solo é constituída pela matéria mineral e pela matéria orgânica. A fase líquida compreende a mistura de água, sais minerais e moléculas de baixo peso molecular (solução do solo), enquanto a fase gasosa compreende os gases que circulam entre as partículas do solo, basicamente CO₂, O₂ e vapores de água. Além destes componentes, a porção biótica do solo constituída por diferentes microrganismos também é parte importante da composição dos solos

(OLIVEIRA et al., 2011). O solo pode ser considerado um sistema de grande complexidade, onde fluxos de energia e matéria são continuamente transferidos, adicionando, transferindo e removendo elementos químicos, minerais e compostos orgânicos (TONI et al., 2006; KER et al., 2012).

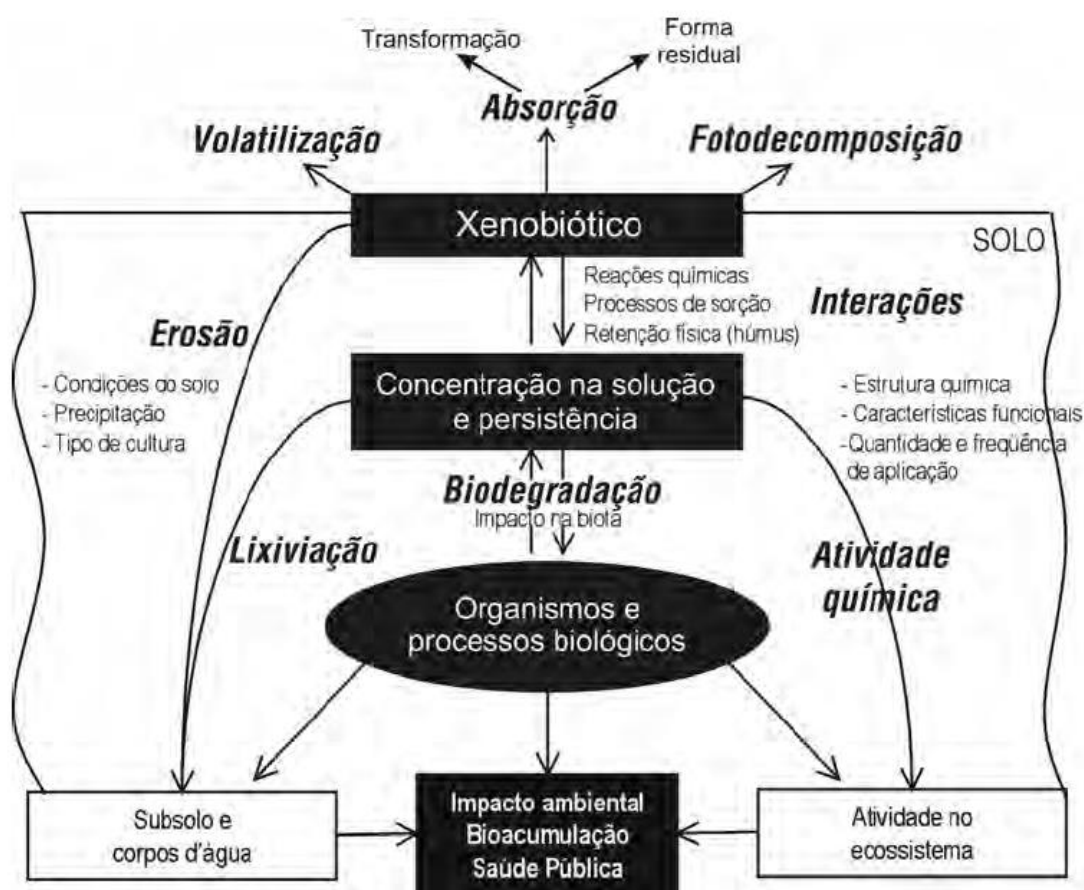
A maioria dos agrotóxicos compreende moléculas orgânicas com características hidrofóbicas e massas molares maiores do que as dos íons inorgânicos naturalmente encontrados na solução do solo. Vários agrotóxicos são aplicados diretamente ao solo, principalmente os herbicidas pré-emergentes, e grande parte daqueles aplicados em outros alvos, tais como insetos, fungos ou nematoides, também acabam chegando ao solo, direta ou indiretamente. Assim sendo, o solo atua como “depósito final” dos agrotóxicos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; OLIVEIRA et al., 2011).

Para entender o comportamento dos agrotóxicos no ambiente, é indispensável o conhecimento das condições climáticas, do tipo de manejo da área agrícola, e principalmente das propriedades físico-químicas dos agrotóxicos e dos solos, as quais desempenham papel-chave nas interações destas moléculas com os solos. Além destas, várias condições ambientais podem influenciar o destino final de um agrotóxico, após sua aplicação, tais como: temperatura, umidade, aeração, granulometria, mineralogia da fração argila, matéria orgânica, agregação, biomassa e atividade microbiana, biodiversidade e tipo de cobertura vegetal (OLIVEIRA; REGITANO, 2009; OLIVEIRA et al., 2011).

Atualmente, o estudo da dinâmica de agrotóxicos no ambiente é realizado de acordo com três processos principais: retenção, transformação e transporte. Esses processos ditam, respectivamente, a disponibilidade do pesticida na solução do solo, a sua persistência e o seu local de depósito no ambiente (Figura 02) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; OLIVEIRA et al., 2011). O processo de retenção refere-se à habilidade do solo em reter um substrato, no caso um agrotóxico, diminuindo sua disponibilidade na solução do solo e, portanto, evitando que ele se mova na matriz deste. Desta forma, a retenção acaba por controlar indiretamente os processos de transformação química e biológica (regulando a quantidade de material disponível para interagir com a biota), e o transporte do agrotóxico para a atmosfera (por volatilização) e para o meio aquático, tanto superficial, por escoamento superficial, quanto subterrâneo, por lixiviação, por imobilizar o composto na matriz do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; OLIVEIRA; REGITANO, 2009, OLIVEIRA et al., 2011).

O processo de transformação/degradação dos agrotóxicos refere-se às mudanças na natureza química da molécula por processos físicos (fotodecomposição), químicos (oxidação-redução, hidrólise, formação de sais insolúveis em água e complexos químicos) ou biológicos (degradação microbiológica). A degradação de modo geral é importante por reduzir o nível de resíduo dos agrotóxicos no solo sendo que as transformações químicas e biológicas são os processos mais importantes na degradação destes compostos no solo. Para o agrotóxico ser degradado, química ou biologicamente, esse deve estar na solução do solo, ou fracamente adsorvido (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; OLIVEIRA; REGITANO, 2009, OLIVEIRA et al., 2011).

Figura 2. Processos e transformações que regulam a persistência, o destino e os impactos potenciais de xenobióticos no solo.



Fonte: MOREIRA; SIQUEIRA, 2006.

Com relação à persistência destes compostos no solo, considera-se que resíduos de agrotóxicos no solo são quaisquer substâncias resultantes da sua aplicação. Podem

incluir produtos de degradação (metabólitos), além da própria molécula do agrotóxico. A persistência é normalmente medida pela meia-vida do composto que depende de fatores relacionados com as propriedades químicas e físicas do solo, atividade da população de microrganismos e de práticas culturais. Assim, o destino final dos agrotóxicos, tanto no solo como na água, depende do somatório de processos envolvidos na sua dissipação ou movimentação dentro dos diferentes compartimentos (PRATA et al., 2000; GEVAO et al., 2000, OLIVEIRA; REGITANO, 2009).

4.6 Os Microrganismos do Solo: Impacto e Degradação dos Agrotóxicos

Devido à elevada diversidade biológica e metabólica, os organismos do solo, principalmente bactérias e fungos, desempenham papel central na decomposição da matéria orgânica, produção de húmus, ciclagem de nutrientes e energia. Além disso, participam da produção de compostos complexos que contribuem para a agregação do solo, decomposição de contaminantes (xenobióticos) e controle biológico de pragas e doenças (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As bactérias e fungos são considerados os principais responsáveis pela transformação dos agrotóxicos no solo, em especial dos herbicidas, sendo que as taxas de degradação são influenciadas pela biomassa microbiana ativa e disponibilidade do composto para a biodegradação (BEIGEL et al., 1999). O termo biodegradação refere-se à transformação biológica de um composto químico orgânico para outra forma. Esta transformação pode envolver mudanças estruturais na molécula ou ainda envolver várias reações sequenciais, implicando a perda ou alteração da toxicidade da molécula (MONTEIRO, 1996).

Na biodegradação, os microrganismos exibem diferentes estratégias para assimilação ou metabolismo de um substrato, que são: Catabolismo, onde o agrotóxico serve como fonte de energia e nutrientes resultando no aumento da biomassa microbiana e na redução considerável do resíduo; Cometabolismo, onde o agrotóxico não é utilizado como fonte de energia, mas é transformado por reações metabólicas e o crescimento microbiano exige a presença de um substrato secundário biodegradável, como fonte de carbono e energia; Polimerização ou conjugação, que consiste na combinação de compostos naturais do solo com as moléculas do agrotóxico ou seu metabólito; Acúmulo, que representa a incorporação da molécula original do agrotóxico ao microrganismo; e

efeitos secundários da atividade microbiana como alterações de pH e potencial redox (ALEXANDER, 1981; MUSUMECI, 1992; ARAÚJO, 2002).

O manejo da biodegradação de contaminantes, como por exemplo, agrotóxicos no solo, faz parte de um conjunto de processos e ações denominados de biorremediação, que podem ser utilizados para a biotransformação de um ambiente contaminado de volta ao seu estado original (THASSITOU; ARVANITOYANNIS, 2001). Segundo Caprez (2002 apud PASSOS, 2006), os processos de biorremediação utilizam organismos (plantas ou microrganismos), especialmente selecionados por meio de suas funções catabólicas, para degradação de substâncias tóxicas presentes no solo e água, onde eles degradam o poluente transformando-o em biomassa, água, dióxido de carbono e outros componentes toxicologicamente inertes. O intuito da biorremediação é minimizar o impacto das substâncias recalcitrantes no ambiente, criando condições favoráveis ao crescimento e à atividade microbiana. Para tanto, existem diversas técnicas que podem ser aplicadas, dentre elas:

1) Atenuação Natural ou Biorremediação Intrínseca: nesta técnica é utilizada a microbiota do próprio local para realizar a biorremediação. Essa estratégia pode-se resumir em três eventos básicos: 1) ocorrência de biotransformação dos contaminantes por populações microbianas indígenas; 2) sorção do contaminante com a matriz ou fases minerais que tornam o composto menos biodisponível e, por conseguinte, menos tóxico aos ecossistemas e 3) perda da toxicidade por diluição ou volatilização (FRANKENBERGER; KARLSON, 1991).

2) Bioestimulação: essa estratégia é semelhante à Atenuação Natural. A diferença é que são adicionados ao sistema alguns macronutrientes, como nitrogênio e fósforo, a fim de estabelecer relações entre carbono, nitrogênio e fósforo, adequadas para o aumento das populações microbianas e, conseqüentemente, aumento significativo das taxas de degradação do contaminante (EVANS et al., 2004; TRINDADE et al., 2005).

3) Bioaugmentação: visa melhorar a capacidade de uma matriz contaminada, a fim de remover contaminantes por meio da adição de uma linhagem isolada ou de consórcios de microrganismos potencialmente degradadores. O inóculo a ser utilizado pode ser selecionado do próprio local contaminado (autóctone) ou de outros ambientes impactados (exógeno) (FANTROUSSI; AGATHOS, 2005).

Além da escolha da técnica adequada, o sucesso de um processo de biorremediação depende de inúmeros fatores, dentre eles pode-se destacar a bioquímica e biodisponibilidade do contaminante bem como de uma microbiota competente em

degradar o poluente (BLACKBURN; HAFKER, 1993). Estudos têm demonstrado o isolamento de várias espécies de fungos e bactérias, bem como a utilização destes microrganismos isoladamente ou em associação para biorremediação de solos contaminados com agrotóxicos.

Ermakova et al. (2010) realizaram um estudo de biorremediação de solos contaminados com glifosato. Primeiramente isolaram cepas bacterianas resistentes ao glifosato, de outras amostras de solos adicionadas com este agrotóxico. As bactérias obtidas foram *Arthrobacter* sp. e *Ochrobactrum anthropi*. Foram introduzidas no solo as suspensões microbianas 10^6 UFC/g de cada cepa e mantido um controle, sem adição de microrganismos. Os resultados demonstraram que após a introdução das bactérias a taxa de degradação do glifosato foi máxima durante a primeira semana e no final de 28 dias o teor de glifosato diminuiu 75,2%, com a ação de *Arthrobacter* sp., enquanto que *O. anthropi* reduziu 61,5%. Os autores concluíram que a toxicidade de solos contaminados com glifosato pode ser reduzida por meio da introdução de espécies degradadoras de glifosato e a manutenção de sua alta atividade degradadora, com a otimização das condições de seu habitat.

Mais recentemente, Dellamatrice et al. (2012) utilizaram os fungos basidiomicetos: *Pleurotus ostreatus* e *Phanerochaete chrysosporium*, pertencentes à Coleção de Culturas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), na remediação de solo agrícola, com histórico de aplicação de agrotóxico, contendo os agrotóxicos paraquat, clorotalonil e deltametrina. O experimento foi realizado em laboratório, com a introdução de surfactantes para aumentar a degradação desses produtos no solo. Observou-se degradação completa de paraquat ao final de 42 dias de incubação, com a aplicação do surfactante. O agrotóxico clorotalonil foi degradado predominantemente por *P. chrysosporium* (85%), a partir dos 30 dias de incubação, enquanto o pesticida deltametrina não foi degradado significativamente em relação ao controle.

Silva e Rondon (2013), utilizaram o fungo *Fusarium moliniforme* isolado de *Bambusa vulgaris* (Poaceae), na biorremediação de Roundup®. Foram inoculadas 5×10^5 conídios/ml do fungo, em 12 mL de Roundup®, adicionado de solução nutritiva. Após 21 dias de incubação, observaram que houve um aumento significativo da UFC, quando comparado com o controle (Roundup® com acréscimo de água destilada) indicando a importância da bioestimulação inicial por acréscimos de nutrientes ao processo. Os

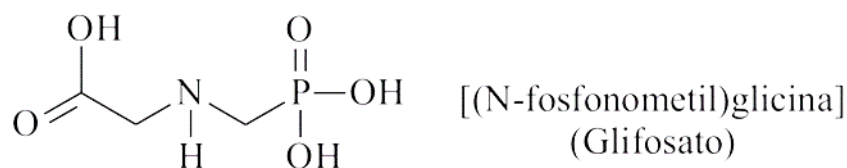
autores concluíram que *F. muliniforme* se adaptou bem na presença dos contaminante e pode ser utilizando na eliminação do agrotóxico do meio.

Gonçalves (2013), estudou a biorremediação de solo contaminado com terbutilazina, com base na bioadição de *Pseudomonas* sp. As cepas foram isoladas anteriormente de solo contaminado com o agrotóxico. O experimento foi realizado em laboratório, com solo sem histórico de aplicação de agrotóxico, adicionado de terbutilazina (0,10 mg/g de solo). Após foram inoculadas nesse solo, 3×10^6 UFC de *Pseudomonas* sp, por grama de solo e obtiveram cerca de 20% de mineralização do agrotóxico ao fim de 7 dias. Com inoculação de 3×10^7 UFC/g solo obtiveram 40% e com 3×10^8 UFC/g solo resultou em cerca de 60% de mineralização, ou seja, verificou-se que a porcentagem da taxa de mineralização da terbutilazina aumentou, provavelmente em relação ao aumento da inoculação de UFC de *Pseudomonas* sp, por grama de solo.

4.7 Glifosato

O glifosato, também conhecido como N-(fosfonometil)glicina (Figura 3) é um herbicida pós-emergente, sistêmico, não seletivo, hidrossolúvel e de amplo espectro. Sua molécula foi descoberta em 1971 por J. E. Franz e introduzida comercialmente em 1974, na Europa, com o nome comercial de Round up® (GROSBARD; ATKINSON, 1985). É amplamente utilizado tanto em áreas agrícolas, quanto urbanas, em todo o mundo. Em 2013 a comercialização mundial de glifosato contabilizou um total de US\$ 5,460 bilhões e estima-se que até 2019 deve atingir um montante de US\$ 8,79 bilhões (GOTTEMS, 2014). No Brasil, a partir do princípio ativo, esse herbicida é comercializado sob a forma de diferentes sais, como o sal potássico, sal de isopropilamina e o sal de amônio (ANVISA, 2014). O glifosato é diluído em meio aquoso, sendo muito pouco solúvel em ácidos orgânicos e praticamente insolúvel em outros solventes orgânicos. Se apresenta bastante estável em presença de luz, fundindo-se a 200 °C, com estabilidade a altas temperaturas (60 °C) (FRANZ et al., 1997). Apresenta ainda, capacidade de atuar como ácido fraco e base fraca, dependendo do pH do meio, o que o caracteriza como um *zwitterion* (PRATA, 2000).

Figura 3. Fórmula estrutural do agrotóxico glifosato.



Fonte: ANVISA, 2011.

O glifosato é absorvido principalmente através das folhas de plantas e é translocado por toda a planta através do floema (ROBERTS, 1998; TOMLIN, 2006). O glifosato inibe competitivamente uma enzima crítica da via do chiquimato, a 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS). Esta enzima desempenha um papel fundamental na biossíntese do intermediário corismato, necessário para a síntese dos aminoácidos essenciais fenilalanina, tirosina e triptofano. Consequentemente, ocorre redução na síntese de proteínas, provocando o término do crescimento e eventualmente, rompimento e morte celular, levando à morte da planta em 4 a 20 dias (FRANZ et al., 1997).

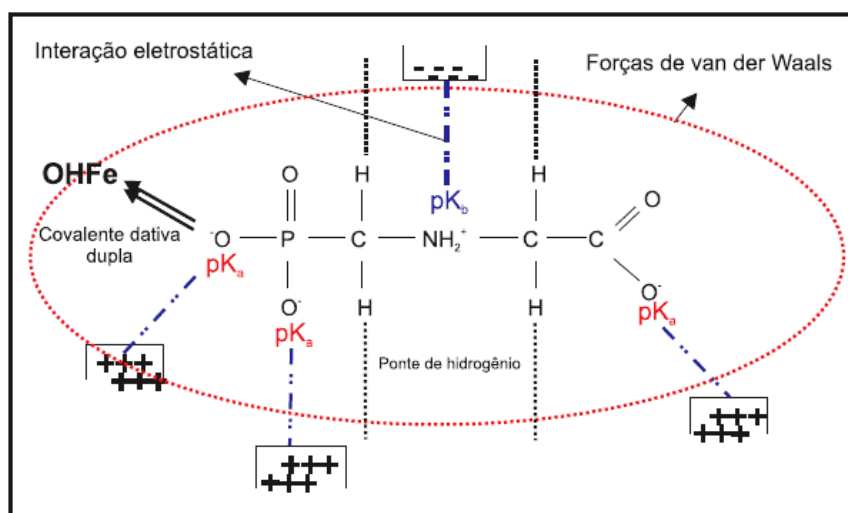
Esta via de biossíntese de aminoácidos aromáticos é encontrada em plantas, bem como fungos e bactérias, mas não em insetos, aves, peixes, mamíferos e seres humanos, proporcionando assim uma toxicidade específica para espécies de plantas (AMARANTE et al., 2002; MORAES; ROSSI, 2010). Apesar do glifosato (princípio ativo) ser citado como pouco tóxico, os surfactantes presentes nas formulações comerciais, em especial as etilaminas, podem apresentar toxicidade igual ou maior que o princípio ativo. Assim, há diversas evidências de efeitos deletérios no ambiente e em animais, principalmente devido à resistência adquirida por algumas espécies de plantas espontâneas, após o uso prolongado do agrotóxico, bem como, a ação em enzimas específicas de organismos animais. Na maioria dos casos, este herbicida não é metabolizado pela planta, razão por que não apresenta seletividade. Somente variedades geneticamente alteradas para tal são resistentes ao glifosato. Desta forma, praticamente toda a concentração do ingrediente ativo aplicado chega ao solo na sua forma original (FRANZ et al., 1997; AMARANTE et al., 2002; TOMLIN, 2006; MORAES; ROSSI, 2010; PRATA, 2000).

Quando o glifosato é aplicado, parte do produto é diretamente absorvido, ficando nas plantas espontâneas e parte é encaminhada para o solo. A sorção/adsorção de herbicidas no solo é um processo importante, uma vez que determina quanto do herbicida ficará retido no solo e quanto estará disponível na solução do solo (persistência). O

composto livre no solo é degradado rapidamente, enquanto que na sua forma adsorvida tem sua degradação desacelerada, ou muitas vezes não apresenta sinais de degradação, podendo permanecer no solo por vários anos (MORAES; ROSSI, 2010).

No solo, o glifosato é caracterizado pela sua alta capacidade de ser adsorvido pelas partículas do solo (CHEAH et al., 1997). Vários mecanismos de ligação têm sido indicados para a adsorção desse herbicida, tais como forças de van der Waals, formação de pontes de hidrogênio com as substâncias húmicas do solo, troca iônica (o glifosato pode apresentar carga positiva e negativa ao mesmo tempo) e formação de ligação covalente com os átomos metálicos dos óxidos do solo (semelhante à adsorção específica dos fosfatos inorgânicos) (Figura 4) (PICCOLO et al., 1994; CHEAH et al., 1997; PICCOLO et al., 1996; PRATA et al., 2000; TONI et al., 2006).

Figura 4. Mecanismos envolvidos na sorção do glifosato.



Fonte: PRATA et al., 2000.

Uma vez adsorvido, o glifosato pode ficar como resíduo ligado, permanecendo no ambiente até sua degradação ou mineralização, que pode durar dias ou meses, dependendo das características do solo (textura, pH, conteúdo de carbono orgânico, entre outras) (TONI et al., 2006). Devido a todas essas variáveis, cada solo apresenta uma característica físico-química diferente e provavelmente apresentará distintas formas de interação com o glifosato.

Em relação à influência das características dos solos na sorção do glifosato, estudos demonstram em solos argilosos, pode ocorrer maior sorção do que em solo

arenoso. Essa diferença pode ser relacionada aos minerais de argila, presentes nos solos argilosos, que podem ser responsáveis pela sorção. Ainda, a retenção pode ser relacionada ao conteúdo de argila e a capacidade de troca de cátions dos solos ou também devido a presença de óxidos metálicos (SPRANKLE et al., 1975; GLASS, 1987; ARANTES, 2007).

Outro fator importante que determina a presença deste produto no solo são os níveis de atividade microbiana (FRANZ et al., 1997), uma vez que os microrganismos são os principais responsáveis pela degradação do glifosato. Aproximadamente 50% da molécula original pode ser metabolizada em 28 dias, chegando a 90% em 90 dias (MORAES; ROSSI, 2010). Portanto, a meia-vida do glifosato no solo é bastante ampla, variando de menos de uma semana até anos e parece depender, em parte, da extensão da ligação ao solo e do nível de atividade microbiana.

4.8 Biodegradação do Glifosato

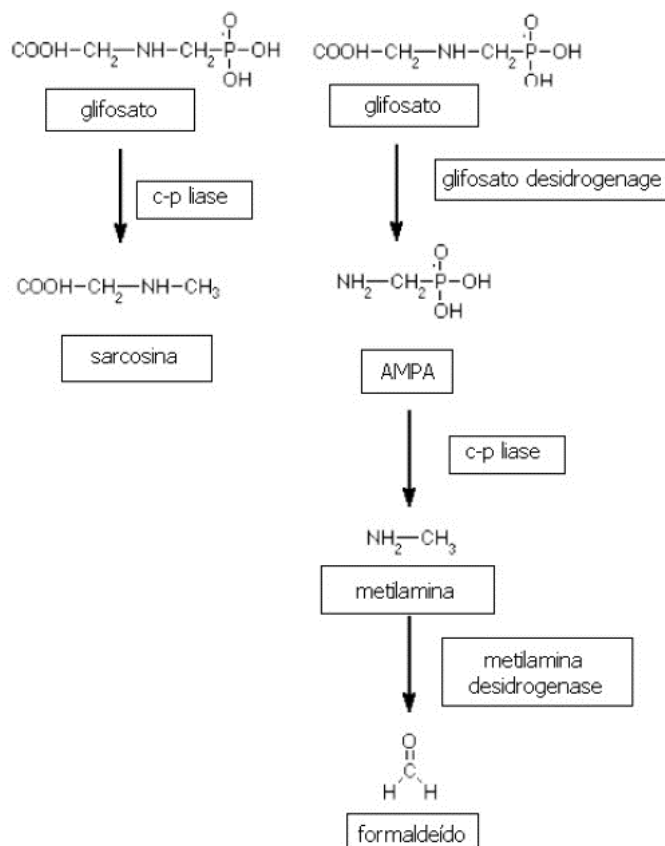
A degradação microbiana de herbicidas é influenciada por diversos fatores, dentre eles as características físicas e químicas do solo (como nutrientes, pH do solo, temperatura, umidade e profundidade) e da própria molécula (tamanho, estrutura química, grupos funcionais, carga elétrica), que podem favorecer sua maior ou menor persistência (SOUZA et al., 1994; HANEY et al., 2000). De maneira geral, os solos tropicais possuem uma microbiota mais ativa, que favorece uma degradação mais rápida do composto, diminuindo assim, sua meia-vida no ambiente. Além disso, horizontes superficiais do solo, rico em matéria orgânica, apresentam atividade biológica mais ativa, promovendo a decomposição rápida do herbicida, enquanto que em horizontes mais profundos, a degradação da molécula é mais lenta em função da menor atividade microbiológica nas camadas mais profundas do solo (MORAES; ROSSI, 2010).

O padrão de degradação da molécula do glifosato no solo é muito variável, dependendo do grupo de microrganismos presentes, das suas exigências nutricionais, dos seus sistemas enzimáticos, que usam o produto como fonte de energia, fósforo, nitrogênio e carbono. Como relatado por Silva et al. (2003), a biodegradação do glifosato pelos microrganismos dos solos resulta em produtos de metabolização cujo comportamento ambiental e efeitos tóxicos ainda são pouco conhecidos. Segundo Liu et al. (1991), existem duas vias principais de degradação microbiana do glifosato: na primeira ocorre a clivagem da ligação C-P do composto, por ação da enzima C-P liase, produzindo

sarcosina que pode ser degradada ao aminoácido glicina, e então a carbono, que é incorporado em alguns aminoácidos como serina, cisteína, metionina, histidina e nas purinas (PIPKE et al., 1987). Entre os microrganismos conhecidos e descritos na literatura como degradadores desse herbicida por esta rota estão *Pseudomonas* sp., *Arthrobacter* sp., *Agrobacterium radiobacter*, *Rhizobium meliloti* (WACKETT; ELLIS, 1999; LIU et al., 1991).

Já na segunda rota, acontece a clivagem da molécula produzindo o ácido aminometilfosfônico (AMPA) (Figura 5). O ácido aminometilfosfônico (AMPA) é o metabólito principal do glifosato. Sua solubilidade em água (20 °C) é maior que 105 mg/L (SANCHO et al., 1996). 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 por esta via (OBOJSKA et al., 2002). Dick e Quinn (1995) sugerem que a via da sarcosina é a preferida pelos microrganismos, no entanto ocorre a presença de AMPA em alguns casos.

Figura 5. Rotas de degradação do agrotóxico glifosato.



Fonte: AMARANTE et al., 2002.

Diversos estudos têm sido realizados para constatar as formas e os mecanismos de degradação do glifosato por microrganismos do solo. Como resultado é possível constatar a habilidade de metabolização do herbicida por diversas espécies de bactérias, dentre elas diversas linhagens de *Escherichia* sp., *Klebsiella* sp., *Shigella* sp., *Enterobacter* sp., *Serratia* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Agrobacterium* sp., *Bacillus* sp. e *Arthrobacter* sp., entre outras, que são capazes de utilizar glifosato como fonte de fósforo, nitrogênio e carbono (KRZYSKO; ORLIK, 1997).

Além das bactérias do solo, alguns fungos, como por exemplo, os gêneros *Rhizopus* sp., *Trichoderma* sp., *Mucor* sp., *Neosartorya* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. foram identificados como sendo capazes de utilizar o glifosato como fonte de fósforo ou carbono para seu desenvolvimento (KRZYSKO; ORLIK, 1997). Eman et al. (2013), identificaram 24 isolados fúngicos do solo pertencentes aos gêneros *Aspergillus* sp.,

Penicillium sp., *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Bipolaris* sp., *Rhizopus* sp., *Trichoderma* sp. e *Rhizoctonia* sp. capazes de crescer em meio mineral enriquecido com glifosato.

Sobre o impacto do glifosato na população microbiana, Araújo et al. (2003) demonstraram em estudo sobre a biodegradação do glifosato no solo, que as populações de fungos e actinomicetos tiveram um aumento significativo com a presença do glifosato, enquanto que as bactérias permaneceram em número constante durante um período de incubação de 32 dias.

Anteriormente, Wardle e Parkinson (1990) isolaram quarenta e dois fungos a partir de solo adicionado de glifosato (0,02, 0,02 e 0,2 mg/g). As espécies *Mucor hiemalis*, *Fusarium oxysporum*, e *Penicillium nigricans* permaneceram em número constante em todas as concentrações testadas. *Mortierella alpina*, *Trichoderma harzianum* e *Arthrinium sphaerospermum* tiveram aumento populacional significativamente estimulado pelo glifosato, enquanto *Cladosporium cladosporioides* apresentou diminuição populacional nas concentrações mais elevadas de glifosato.

Em relação à utilização do glifosato como fonte de nutrientes e energia por microrganismos, Castro (2006) avaliou a utilização de glifosato como fonte de carbono, fósforo e nitrogênio em meio Czapeck adicionado de 100 mg/L de glifosato por fungos filamentosos do gênero *Fusarium*. Observou que houve crescimento das cepas utilizando glifosato como fonte de nitrogênio. No entanto, como fonte de fósforo não foi significativamente utilizado e como fonte de carbono, nenhuma cepa cresceu sem adição de 10% de glicose ao meio.

Ainda, Zabaloy et al. (2008) avaliaram o crescimento de 20 cepas de rizóbios quanto a utilização de glifosato (50 mg/L), como fonte de nutrientes em meio mineral líquido. Destas, apenas uma cepa (*Bradyrhizobium* sp.) apresentou crescimento utilizando glifosato como fonte de carbono.

Os estudos sobre utilização do glifosato como fonte de carbono pelos microrganismos auxiliam na escolha de métodos viáveis na geração de dados associados à biodegradação, fundamentais à elaboração de referências quanto à biodegradabilidade de determinadas substâncias. Ao mesmo tempo, estudos sobre caracterização e perfil de microrganismos específicos que realizam a biodegradação de glifosato podem fornecer subsídios às tomadas de decisão estratégicas na escolha da técnica de biorremediação mais adequada (LOPES et al., 2014).

5 METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no laboratório de Microbiologia, Fisiologia Vegetal e Bioquímica e Genética, da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, *Campus Laranjeiras do Sul* – PR.

5.1 Glifosato

Neste trabalho foi utilizado o agrotóxico glifosato em sua formulação comercial Round up[®], com concentração 360 g/L de princípio ativo. Para os ensaios microbiológicos, o glifosato foi esterilizado utilizando-se filtro de membrana microporosa (0,2 µm).

5.2 Coletas das Amostras de Solo

As amostras de solo foram coletadas em uma propriedade particular, de aproximadamente 17 ha, localizada no município de Laranjeiras do Sul-PR, coordenadas geográficas 25°41'68,4" N, 52°43'55" L (Figura 6). Foi escolhida uma área de lavoura (plantio direto) homogênea, que tem recebido aplicações periódicas de glifosato para manejo de diferentes culturas há aproximadamente 15 anos, para a realização da prospecção de microrganismos. Para tanto, foram feitas 12 coletas de amostras simples, de aproximadamente 100 g, em pontos aleatórios em um caminhar zigzag, com profundidade de 0-10 cm. Estas foram reunidas em um recipiente esterilizado, à medida que foram sendo coletadas. Ao final, as amostras foram misturadas até obter uma amostra composta homogênea (IAPAR, 1996). Desta amostra foram retiradas duas amostras de 500 g e colocadas em sacos plásticos de grau alimentício. Uma amostra foi transportada em caixa térmica com gelo e mantida a 4° C até o isolamento dos microrganismos. A outra amostra foi enviada para o Laboratório de Análise de Solos UTFPR/IAPAR, para análises químicas e físicas (ANDRIGHETTI, 2011).

Figura 6. Imagem via satélite do local de coleta das amostras de solo, no município de Laranjeiras do Sul - PR.



Fonte: Google Maps. Dezembro de 2015.

5.3 Isolamento dos Microrganismos

O procedimento de isolamento dos microrganismos cultiváveis, com potencial de degradação de glifosato, foi realizado segundo Meyer (2011), com modificações. A amostra de solo (500 g) foi transferida da caixa térmica para a geladeira, sob mesma temperatura e mantida por 48 h. Após esse período, foi realizada a primeira inoculação. Para isso, foi separada 25 g da amostra, de forma aleatória e retirado 1 g de solo, inoculado em erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de MM (RICHARD; VOGEL, 1999), composição de macronutrientes KCl 0,7 g/L; KH_2PO_4 2 g/L; Na_2HPO_4 3 g/L; NH_4NO_3 1 g/L; e de micronutrientes (1 mL por litro), composição: MgSO_4 4 g/L; FeSO_4 0,2 g/L; MnCl_2 0,2 g/L; CaCl_2 0,2 g/L, pH 7,2, contendo 100 mg/L de glifosato. Posteriormente, o erlenmeyer foi incubado sob agitação horizontal a 150 rpm, à temperatura de 28 °C. A cada 5 dias foi realizada a transferência subsequente de 1 mL do frasco inicial, para novo frasco sob as mesmas condições, totalizando 15 dias, para assegurar que o crescimento microbiano ocorresse às expensas do glifosato como única fonte de carbono.

Após diluição seriada decimal, foi realizado inoculação da amostra, utilizando a técnica de espalhamento em superfície, em ágar sabouraud para os fungos e ágar nutriente

para as bactérias, enriquecidos com 100, 200 e 300 mg/L de glifosato. Foram inoculadas nas placas as diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} para fungos e 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} para bactérias, em triplicata, para cada concentração de glifosato e incubadas em estufa a 28 °C por 48h para bactérias, 5 dias para fungos. As bactérias, leveduras e fungos filamentosos que apresentaram diferenças visuais foram isolados e armazenadas em tubo de ensaio com volume de 10 mL de ágar inclinado, nutriente (bactérias) e sabouraud (fungos), com 300 mg/L de glifosato, sob a mesma temperatura e posteriormente armazenados a 4° C, até a próxima etapa do experimento.

5.4 Preparo do pré-inóculo

O inóculo bacteriano foi padronizado para a realização do estudo de degradação de diferentes concentrações de glifosato por isolados bacterianos. A partir dos isolados, foi transferido uma alçada para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de Caldo Nutriente, adicionado de 300 mg/l de glifosato, incubados em agitador horizontal, a 28 °C, a 150 rpm por aproximadamente 48 h. Após, as culturas foram centrifugadas a 3000 rpm para obtenção do pellet que foi ressuspensão em MM. Este procedimento foi repetido 3 vezes para remoção de resíduos do meio de crescimento. O inóculo foi padronizado por meio da concentração 0,5 da escala McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células/mL).

O inóculo fúngico foi preparado para realizar o experimento de avaliação da capacidade de degradação e seleção dos fungos filamentosos potencialmente degradadores de glifosato. A partir de culturas fúngicas, crescidas por 7 dias, em tubos contendo ágar Batata Dextrose, BDA, com 300 mg/L de glifosato, incubadas em estufa, a 28 °C, foi retirado, com auxílio da alça de platina, uma amostra do micélio e inoculada no centro da placa de Petri, contendo MM solidificado (1,5% ágar-ágar) com 300 mg/L de glifosato.

5.5 Estudo de degradação de diferentes concentrações de glifosato por isolados bacterianos.

Para avaliar a capacidade de degradação de diferentes concentrações de glifosato pelas bactérias, foram realizados testes utilizando o indicador redox 2,6 diclorofenol indofenol (DCPIP) (MEYER et al., 2012) que possui a capacidade de mudança de

coloração de azul para incolor, quando ocorre a liberação de elétrons no meio em virtude da oxidação da fonte de carbono (glifosato). O DCPIP atua como acceptor artificial de elétrons (HANSON et al.,1993). O indicador foi adicionado ao meio mineral esterilizado e o resultado obtido foi avaliado pela determinação colorimétrica em comprimento de onda de 600 nm.

O procedimento foi conduzido em placas de polietileno de 96 poços, contendo em cada poço 5×10^6 UFC/mL de inóculo bacteriano acrescido de 210 μ L de meio mínimo mineral contendo o indicador DCPIP com as diferentes concentrações de 300, 500 e 700 mg/L de glifosato. Nos controles negativos, não foram adicionados inóculo para verificação de perdas abióticas. O experimento foi incubado a 28 °C, de forma estática e determinada a concentração de DCPIP oxidado em 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120h.

As concentrações de DCPIP (g/L) oxidado nos experimentos foram calculadas utilizando-se uma curva analítica padrão (abs x [DCPIP]), sendo a degradação biológica determinada pelos valores obtidos da diferença das bactérias e seus controles. A velocidade de oxidação, em módulo, (Equação 1) foi determinada em função do módulo da variação da concentração de DCPIP oxidado em diferentes intervalos de tempo pré determinados.

Equação 1.

$$|V_{deg}| = \frac{|\Delta [DCPIP]|}{\Delta tempo}$$

5.6 Avaliação da capacidade de degradação e seleção dos fungos filamentosos potencialmente degradadores de glifosato

Para avaliar a capacidade de crescimento microbiano e capacidade de degradação do glifosato pelos fungos filamentosos previamente isolados, foi realizado plaqueamento em MM solidificado com 1,5% ágar-ágar contendo de 300 mg/L de glifosato, por meio de uma inoculação pontual no centro da placa de Petri. Os cultivos foram mantidos em estufa a 28 °C por 14 dias, sendo medido o diâmetro da área recoberta pelo fungo, a cada 24 horas durante 14 dias, com auxílio de uma régua milimetrada. Foram realizadas seis medidas radiais em cada tempo, por placa, sendo que o experimento foi realizado em

triplicata, em seguida realizada a média das medidas por tempo, para cada uma das triplicatas. Posteriormente foi calculada a velocidade de crescimento radial (VCR) por meio de regressão linear dos raios das colônias, utilizando-se a equação 2.

Equação 2

$$r(t) = a + \text{VCR} \cdot t$$

Onde r é o raio (mm), t é o tempo (h) e VCR é a velocidade de crescimento radial (mm/h) (COLLA et al., 2008).

Os fungos que apresentaram maiores velocidades foram selecionados para a etapa posterior do trabalho.

5.7 Identificação dos Isolados

Para a identificação dos isolados bacterianos foi realizada a coloração de Gram. Os fungos isolados que apresentaram maiores velocidades de crescimento, foram identificados quanto ao gênero, por visualização em microscópio ótico e comparação com a literatura (BARNETT; HUNTER, 1998), após a coloração de lâminas, preparadas pela técnica de microcultivo, em meio BDA sem adição de glifosato (RIDELL, 1950).

5.8 Análises Estatísticas

Os dados, representados pela média e desvio padrão, foram avaliados quanto à normalidade e à homocedasticidade por meio do teste de Shapiro Wilk e teste de Hartley, nesta ordem. Os dados referentes à contagem em placas apresentaram normalidade e homocedasticidade, os dados da VCR e do crescimento dos fungos, não corresponderam aos requisitos, sendo estes transformados, utilizando $\sqrt{x+0,5}$. Após a transformação, os dados da VCR atingiram os requisitos, porém os dados do crescimento dos fungos não. Assim, os dados da contagem em placas e VCR, foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as comparações entre as médias, foram realizadas pelo Teste de Tukey e Teste de Scott-Knott, respectivamente. Para análise do crescimento dos fungos, foram

feitas análises não paramétricas, utilizando teste Kruskal-Wallis, com pós teste Nemenyi (Tukey), utilizando o software R versão 3.1.0.

Na análise das médias da velocidade de crescimento das bactérias, os dados foram normais, segundo o teste de Kolmogorov e Smirnov. Dessa forma, foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as comparações entre as médias foram realizadas pelo Teste de Tukey, utilizando o programa GraphPad InStat. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Coleta e análise físico-química das amostras de solo

As amostras de solo foram coletadas em março de 2015. Foi realizada a classificação físico-química do solo e conforme os dados apresentados na Tabela 2, o mesmo caracteriza-se como solo argiloso, apresentando alto teor de matéria orgânica, fósforo, potássio e magnésio. Este alto teor de argila (82,50%) pode ocasionar maior capacidade de sorção de herbicidas às partículas do solo, devido a elevada superfície específica desses minerais, que podem se ligar ionicamete ao grupo carboxílico na estrutura do glifosato. Outros fatores como pH e teor de matéria orgânica também podem influenciar nesse processo (OLIVEIRA; REGITANO, 2009).

Tabela 2. Composição físico-química da amostra de solo coletada com profundidade de 0 - 10 cm.

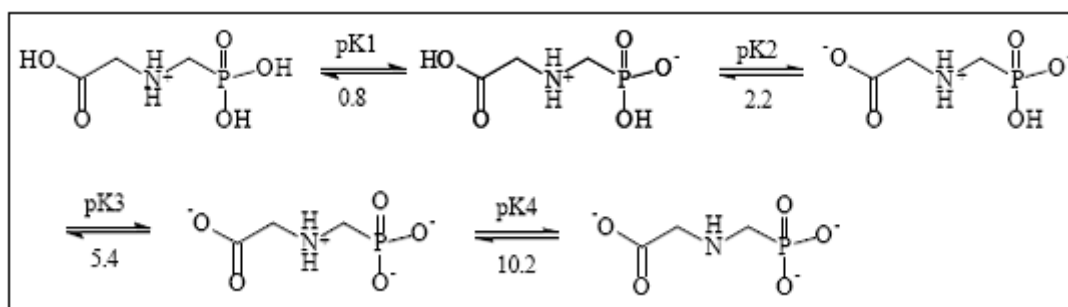
Determinação		Solo
Química	pH em CaCl ₂ (1:2,5)	5,70
	Matéria Orgânica (g.dm ⁻³)	52,27
	P (mg.dm ⁻³)	12,55
	K (cmol _c .dm ⁻³)	0,38
	Ca (cmol _c .dm ⁻³)	8,20
	Mg (cmol _c .dm ⁻³)	4,20
	H+Al (cmol _c .dm ⁻³)	3,52
	Saturação por bases (cmol _c .dm ⁻³)	12,78
	Saturação por bases V (%)	78,40
	CTC	16,30
Física	Argila (%)	82,50
	Areia (%)	2,60
	Silte (%)	14,90
	Tipo 3	Argiloso

O pH determina a forma iônica predominante do agrotóxico na solução do solo, atuando na dissociação dos grupos ácidos e aminos. Este caráter anfótero possibilita ao glifosato se ligar aos grupos funcionais com cargas positivas (principalmente dos óxidos de Fe e Al) e com cargas negativas (principalmente da matéria orgânica e dos minerais de argila silicatadas) da superfície dos solos (OLIVEIRA; REGITANO, 2009). O pH do solo amostrado foi em torno de 5,7. Deste modo, apresenta a possibilidade de três dissociações do glifosato, conforme descrito na Figura 7. Isso pode implicar em uma maior disponibilidade de cargas negativas nas moléculas de glifosato, que poderá alterar suas interações com o solo, positivamente carregado e conseqüentemente, ficar menos biodisponível. Por outro lado, em solos mais básicos, ricos em espécies negativamente carregadas, podem ocasionar diminuição na adsorção do glifosato no solo, devido a presença de três oxigênios negativos (dissociados), resultando em maior repulsão eletrostática entre o glifosato e o solo (TONI et al., 2006) e ficando, portanto,

biodisponível para ser utilizado pelos microrganismos do solo. Logo, se um processo de biorremediação fosse aplicado diretamente neste solo, o mesmo deveria ser tratado, a fim de corrigir seu pH.

O solo analisado apresentou alta concentração de matéria orgânica (52,27 g.dm⁻³) e em altas concentrações, como é o caso deste solo, pode ter um papel importante na retenção do glifosato na matriz do solo. O glifosato ocasiona a desagregação das moléculas que compõe a matéria orgânica (substâncias húmicas), devido à presença das múltiplas pontes de hidrogênio que podem ocorrer entre vários grupos ácidos e grupos contendo oxigênio, presentes em ambas moléculas (TONI et al., 2006; MIANO et al., 1992; PICCOLO et al., 1994).

Figura 7. Dissociação do glifosato, de acordo com seu comportamento zwitteriônico.



Fonte: AMARANTE et al., 2002.

As características físico-químicas do solo e também do glifosato são importantes para entender o processo de retenção deste agrotóxico no solo. Estas, por sua vez, controlam os processos de transformação química e biológica e o transporte no ambiente. Dessa forma, o conhecimento dessas características e do processo de retenção precisam ser consideradas quando se planeja realizar qualquer estudo de biorremediação de glifosato no solo, uma vez que a retenção atua na disponibilidade biológica do contaminante.

6.2 Isolamento e Seleção dos Microrganismos Potencialmente Degradadores

Como pode ser observado na Tabela 3, não foram encontradas diferenças significativas na contagem tanto de bactérias quanto de bolores e leveduras após o período

de incubação, considerando as diferentes concentrações de glifosato utilizadas (100, 200 e 300 mg/L). Este resultado sugere que o aumento nas concentrações testadas do agrotóxico no meio de incubação não influenciou o número de microrganismos encontrados. Provavelmente estes microrganismos estejam adaptados ao agrotóxico utilizando o contaminante como fonte de energia, sem sofrer com seus efeitos tóxicos nessas concentrações, devido a se tratar de uma área com histórico de aproximadamente quinze anos de aplicação intensiva de glifosato.

Tabela 3. Quantificação de microrganismos presentes em diferentes concentrações de glifosato.

Glifosato (mg/L)	(UFC/g solo)**
Bactérias (Incubadas por 48 h)	
100	$41,16 \times 10^6 \pm 3,53^a$
200	$55,80 \times 10^6 \pm 4,47^a$
300	$58,50 \times 10^6 \pm 4,47^a$
Fungos (Incubados por 5 dias)	
100	$17,16 \times 10^3 \pm 1,08^a$
200	$20,33 \times 10^2 \pm 1,78^a$
300	$12,00 \times 10^2 \pm 1,08^a$

*Médias \pm desvio padrão de três repetições, seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade de erro.

** UFC = Unidade formadora de colônia.

Neste sentido, outros trabalhos também demonstraram que não houve alteração da contagem de microrganismos isolados de solos com histórico de aplicação de diferentes concentrações de glifosato. Araújo (2002) observou em estudo sobre biodegradação de glifosato em um solo com histórico de aplicação do herbicida, que o número de bactérias presentes no início e ao final de 32 dias de incubação com 2,16 mg/kg de glifosato adicionado ao solo, permaneceu constante. Mais recentemente, Andrighetti et al. (2014) também não observaram alterações significativas no número de bactérias isoladas de um solo com histórico de aplicação de glifosato há 29 anos, adicionado de 2,52 mg/kg de glifosato, após 32 dias de incubação. Adicionalmente, o glifosato não apresentou nenhum efeito sobre o número de actinomicetos e de esporos fúngicos quando amostras de solo foram incubadas por 27 dias em diferentes concentrações de glifosato (0 a 0,2 mg/g) (WARDLE; PARKINSON, 1990). Ainda, em experimento sobre o número

de microrganismos em solo exposto ao glifosato, Ratcliff et al. (2006) relataram que o número de esporos fúngicos foi levemente aumentado, enquanto que bactérias e hifas fúngicas não foram afetadas após o período de 30 dias de incubação, com adição de 0 a 50 e 5000 mg/kg de glifosato ao solo. Weaver et al. (2007) também não observaram efeito significativo na abundância de espécies de fungos em solos com adição de 0,140 mg/g de glifosato. Os resultados apresentados quanto à contagem de microrganismos na presença de glifosato estão de acordo com o relatado na literatura e indicam que mesmo dobrando ou triplicando a concentração desse agrotóxico, não caracterizou um efeito negativo no número de microrganismos.

Posteriormente, foi realizado o isolamento dos microrganismos presentes nas três diferentes concentrações que apresentaram diferenças visuais na morfologia colonial. Obteve-se como resultado do isolamento: 25 bactérias, 6 leveduras e 18 fungos filamentosos.

Do total das 25 bactérias inicialmente isoladas (identificadas de B01 a B25), 10 não apresentaram crescimento quando cultivadas na presença de 300 mg/L de glifosato, após 24 h de incubação, provavelmente devido à não tolerarem uma concentração mais elevada do agrotóxico. Foram realizados testes de coloração de Gram com as 15 cepas que permaneceram viáveis após 18 h de incubação (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4. Morfologia das cepas bacterianas isoladas na presença de 300 mg/L de glifosato.

<i>Bactéria</i>	<i>Forma</i>	<i>Gram</i>
B03	Bacilo	Negativo
B05	Bacilo	Positivo
B06	Bacilo	Negativo
B07	Bacilo	Negativo
B08	Bacilo	Negativo
B09	Bacilo	Negativo
B11	Bacilo	Positivo
B12	Coco Bacilo	Positivo
B14	Bacilo	Positivo
B17	Coco bacilo	Negativo
B19	Coco bacilo	Negativo
B20	Bacilo	Negativo
B22	Bacilo	Positivo
B24	Coco bacilo	Negativo
B25	Bacilo	Negativo

Tabela 5. Frequência da coloração e da forma das cepas bacterianas isoladas na presença de 300 mg/L de glifosato.

<i>Forma/Gram</i>	<i>Quantidade</i>	<i>Frequência</i>
Bacilo positivo	4	26%
Bacilo negativo	7	47%
Coco bacilo positivo	1	7%
Coco bacilo negativo	3	20%
Total	15	100%

Analisando os dados da Tabela 5, duas formas bacterianas foram identificadas: bacilos e coco bacilos, havendo predomínio da primeira forma. Além disso, observou-se maior quantidade de gram negativos, tanto para bacilos quanto para coco bacilos. Do mesmo modo, Tarouco (2009 apud ANDRIGHETTI, 2011), verificou que a maioria das bactérias isoladas de solos contaminados com glifosato eram gram-negativas com formato bastonete. Esse resultado pode ser justificado em razão de que as bactérias são o grupo de microrganismos que, em geral, apresentam maior biomassa nos solos. Além disso, a maioria das bactérias gram-negativas pertencem ao Filo Proteobacteria, sendo o maior e mais diverso dentro do domínio Bacteria (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Durante o armazenamento 9 bactérias – B03, B05, B14, B17, B19, B20, B22, B24 e B25 e 4 fungos – F15, F16, F17 e F18 perderam a capacidade de crescer em ágar nutriente e ágar sabouraud, respectivamente, acrescido de 300 mg/L de glifosato. Isso pode ter sido provocado por diversos fatores como mutações naturais, toxicidade do glifosato ou ainda, pode ter ocorrido o processo de repressão catabólica (PAPANASTASIOU; MAIER, 1982; MANGAT; ELEFSINIOTIS, 1999).

Segundo Pham et al. (2004), herbicidas podem causar efeitos tóxicos em microrganismos por induzir um aumento do estresse oxidativo e consequentes danos à membrana celular, proteínas e DNA. A repressão catabólica ocorre quando os mecanismos de regulação da expressão dos genes necessários para a utilização de fontes secundárias de carbono pelos microrganismos são bloqueados pela presença de um substrato preferido. Este tipo de processo pode ser observado na presença de diversos agrotóxicos (PAPANASTASIOU; MAIER, 1982; MANGAT; ELEFSINIOTIS, 1999). Na maioria das bactérias, a repressão catabólica ocorre por meio das enzimas envolvidas no transporte e fosforilação de açúcares, que desempenham um papel essencial na geração de sinais intracelulares levando à transdução dos diferentes mecanismos para repressão catabólica (STULKE; HILLEN, 1999). Logo, podem ter ocorrido algum destes processos, levando à supressão da capacidade de degradação do glifosato no presente trabalho.

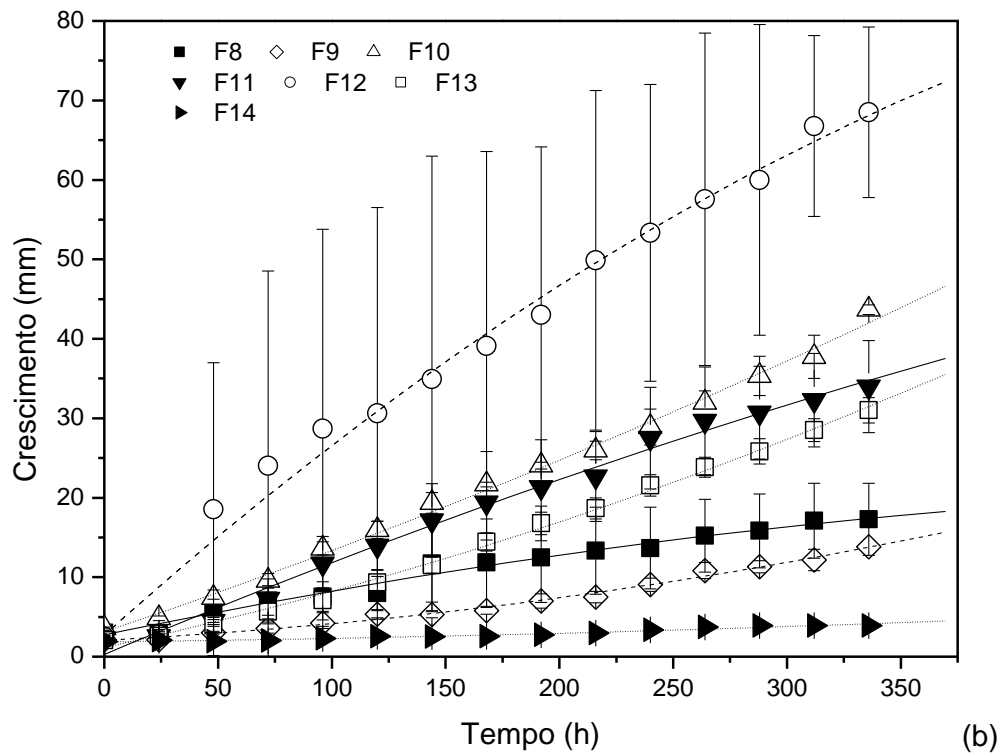
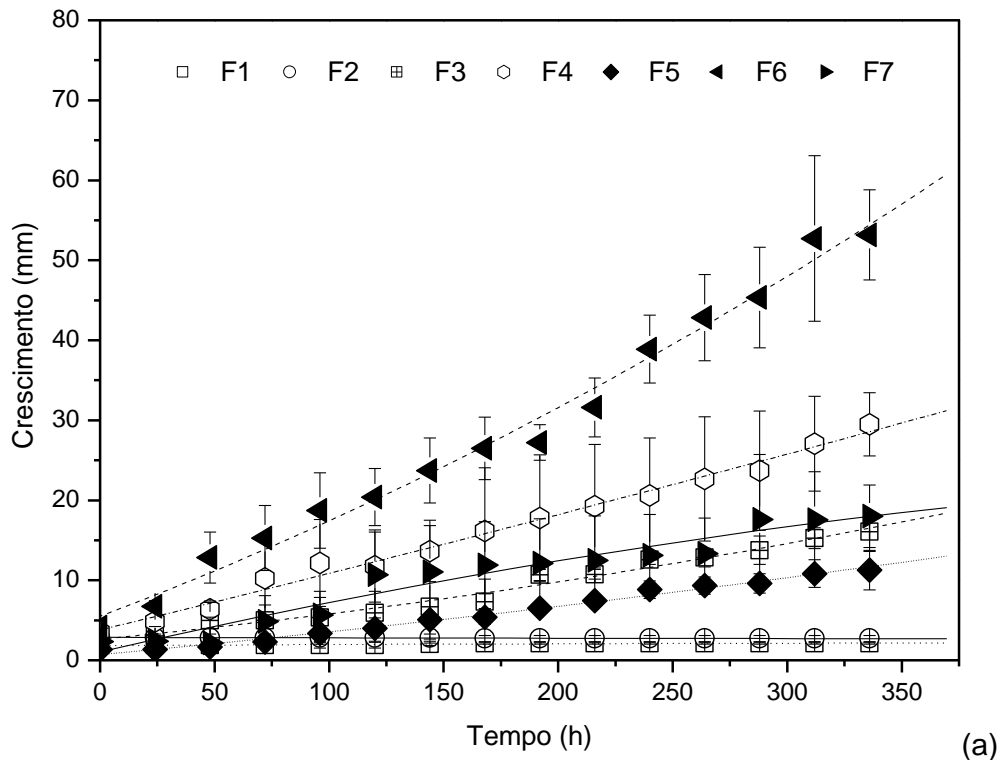
Esses microrganismos que não sobreviveram no meio contendo 300 mg/L de glifosato, não foram selecionados para as etapas subsequentes, uma vez que a estabilidade fisiológica da linhagem de um microrganismo de interesse é importante para que ele se mantenha estável ao longo de todas as etapas envolvidas (SCHMIDELL et al., 2001).

6.3 Avaliação do crescimento e identificação dos fungos filamentosos

No presente trabalho foram isolados 18 fungos com características miceliais diferentes e destes, 14 permaneceram viáveis. Os quatorze fungos foram avaliados quanto à capacidade e velocidade de crescimento radial usando glifosato como única fonte de carbono (Figura 8 a; b). Como pode ser observado, até as primeiras 48 h de incubação não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no crescimento radial, no entanto, após este período, o fungo F6 apresentou crescimento estatisticamente superior aos demais até o tempo 120 h. Após isso, o fungo F12 e o F6 se igualaram e continuaram superiores aos demais. A partir do tempo 216 h, o fungo F12 apresentou crescimento estatisticamente maior em relação aos demais, permanecendo assim, até o final do experimento. Além destes, os fungos F10, F11, F13 e F4, apresentaram taxas de crescimento diferentes estatisticamente entre si, porém elevadas, na maioria dos tempos. Já os fungos F3, F5, F7, F8 e F9 apresentaram um perfil moderado de crescimento (estatisticamente iguais entre si), enquanto que os fungos F1, F2 e F14 não cresceram e foram estatisticamente iguais entre si. Para os fungos que não cresceram, podem ter ocorrido distúrbios nos processos energéticos, de biossíntese ou de divisão mitótica ocasionados pelo agrotóxico (KRZYSKO-LUPICKA; SUDOL, 2008; BUNDGARD-NIELSEN; NIELSEN, 1995) ou ainda, ser característica genética do fungo apresentar crescimento mais lento. Esses microrganismos poderiam possuir a capacidade de acumular, transportar o glifosato e tolerá-lo, mas sem apresentar a capacidade de degradá-lo e utilizá-lo como fonte exclusiva de energia (WARDLE; PARKINSON, 1990; DICK; QUINN, 1995).

É importante ressaltar que, nesta abordagem experimental, as concentrações de glifosato utilizadas foram mais elevadas do que as relatadas em outros estudos com fungos (KRZYSKO – LUPICKA e ORLIK, 1997; WARDLE e PARKINSON, 1990; EMAN, 2013). Baseado no exposto, pode-se sugerir que estes fungos são microrganismos altamente promissores para serem utilizados em estudos futuros de biorremediação.

Figura 8. Crescimento radial micelial. (a) e (b) Média da medida dos raios das triplicatas em mm/h, MM contendo [glifosato] = 300 mg/L. Barra de erros representa o desvio padrão.



Como pode ser observado na Tabela 6, foi possível identificar oito gêneros de fungos filamentosos e dois falsos fungos que possivelmente utilizaram glifosato como única fonte de carbono.

O grupo de organismos denominado genericamente de “fungos” é bastante diversificado filogeneticamente e possui representantes dos três reinos: Protozoa, Chromista e Fungi (ALEXOPOPULOS et al., 1996). Os Reinos Protozoa e Chromista, abrigam algumas Classes que possuem morfologia e modo de vida semelhante aos fungos. De acordo com a classificação da 10ª edição do *Dictionary of the Fungi* (2008) e do *Internacional Code of Botanical Nomenclature* (2006), considera-se que os falsos fungos, representados neste trabalho como F11 e F13, pertencem portanto ao Reino Chromista e possivelmente à classe *Oomycetes* (AMORIM et al., 2011). Os oito demais fungos identificados, pertencem ao Reino Fungi e fazem parte dos fungos verdadeiros (AMORIM et al., 2011). Os gêneros *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Geotrichum* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp. e *Trichoderma* sp. pertencem ao Filo Ascomycota. Esses seis gêneros, apresentam como característica básica a formação, após a meiose, de esporos sexuais, os ascósporos, dentro de uma estrutura em forma de saco, o asco. O gênero *Rhizoctonia* sp. pertence ao Filo Basidiomycota, possuem em comum uma estrutura reprodutiva denominada basídio, que produz os basidiósporos, análogos aos ascósporos, mas são produzidos fora do basídio (PELCZAR et al., 1997).

Tabela 6. Identificação em nível de gênero dos fungos isolados que apresentaram crescimento em MM com glifosato (300 mg/L) como única fonte de carbono.

Fungos	Gênero
F3	<i>Cladosporium</i> sp.
F4	<i>Geotrichum</i> sp.
F5	* n.d
F6	<i>Fusarium</i> sp.
F7	<i>Trichoderma</i> sp.
F8	<i>Penicillium</i> sp.
F9	<i>Rhizoctonia</i> sp.
F10	<i>Penicillium</i> sp.
F11	Falso fungo
F12	<i>Aspergillus</i> sp.
F13	Falso fungo

* n.d = gênero não determinado.

Como pode ser observado na Figura 9 (a), o micélio do fungo do gênero *Aspergillus* sp., apresentou aspecto da colônia de cotonosa a aveludada. No início, branco no centro e verde nas bordas e com o passar do tempo a cor verde predominou. Ainda, a colônia apresentou contorno regular com bordos inteiros. De acordo com Peña (1998), o gênero *Aspergillus* sp. apresenta uma ampla variação na coloração, sendo encontradas colônias com colorações em tons de verde, amarelo, cinza, marrons, preto e branco. Com relação ao microcultivo (Figura 9b), foi possível observar o conidióforo típico e fiáldes com a presença de conídios (AMORIN et al., 2011). As colônias do gênero *Penicillium* sp. também apresentaram aspecto cotonoso e aveludado. Uma das colônias (Figura 11a) apresentou no início, coloração branca e com o tempo foi ficando amarelada com algumas manchas verde-claro. A outra colônia (Figura 10a) apresentou coloração branca levemente esverdeada nas bordas. Esses resultados estão de acordo com as características relatadas por Peña (1998) para esse gênero, que comumente apresenta colônias de crescimento rápido, filamentosas, lanosas ou com textura cotonosa. São inicialmente brancos e, em seguida, tornam-se azul-verde, cinza-verde, verde-oliva, cinza ou amarelada ou rosa, com o tempo. Assim como o gênero *Aspergillus* sp., também foi possível observar no microcultivo de *Penicillium* sp. (Figuras 10b e 11b) o conidióforo e fiáldes com a presença de conídios (AMORIN et al., 2011).

Figura 9. (a) Crescimento micelial de *Aspergillus* sp. em ágar BDA, sem glifosato. (b) Microcultivo em ágar BDA, sem glifosato, aumento microscópio óptico 1000X.

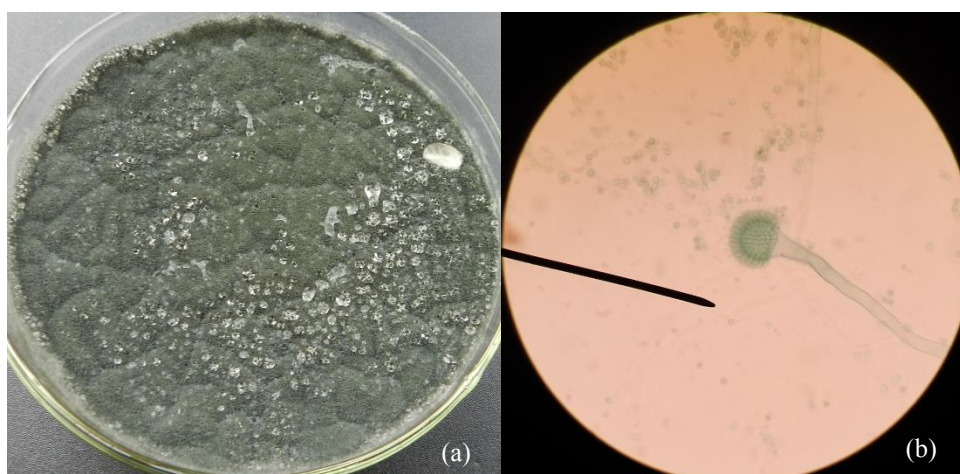


Figura 10. (a) Crescimento micelial de *Penicillium* sp. em ágar BDA, sem glifosato. (b) Microcultivo em ágar BDA, sem glifosato, aumento microscópio óptico 1000X.

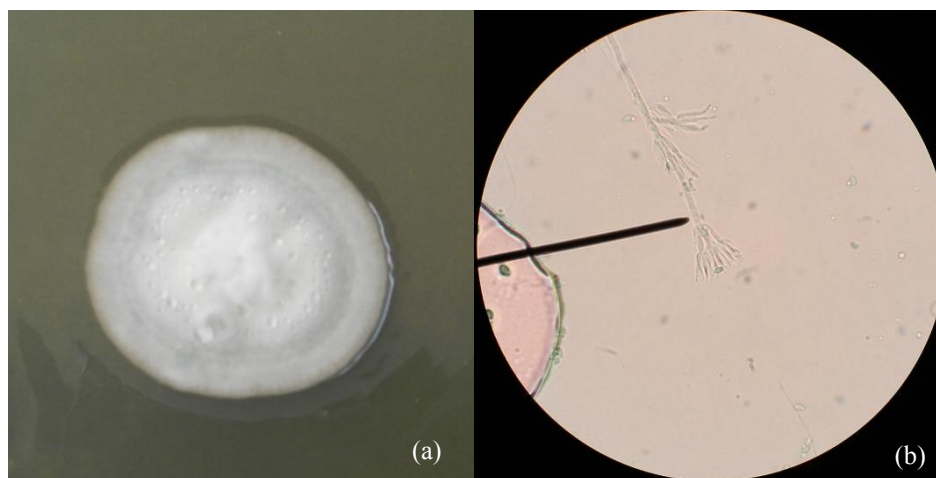
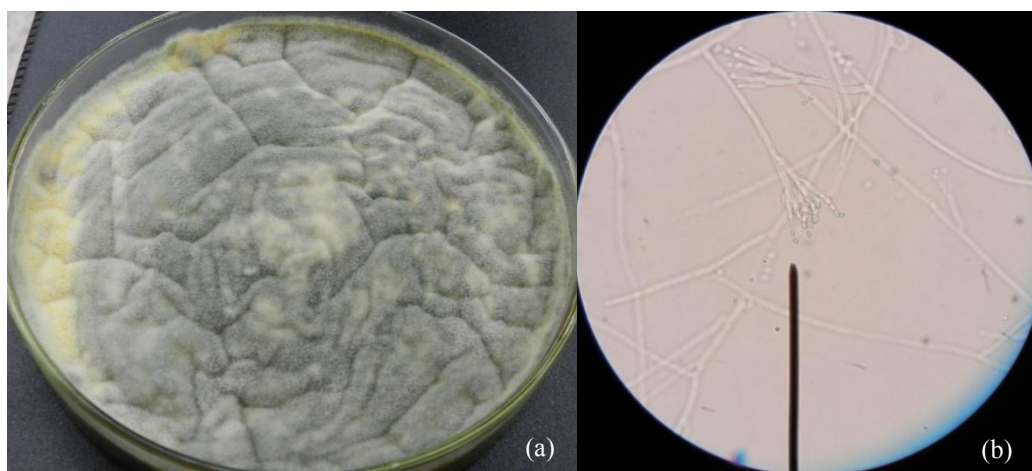


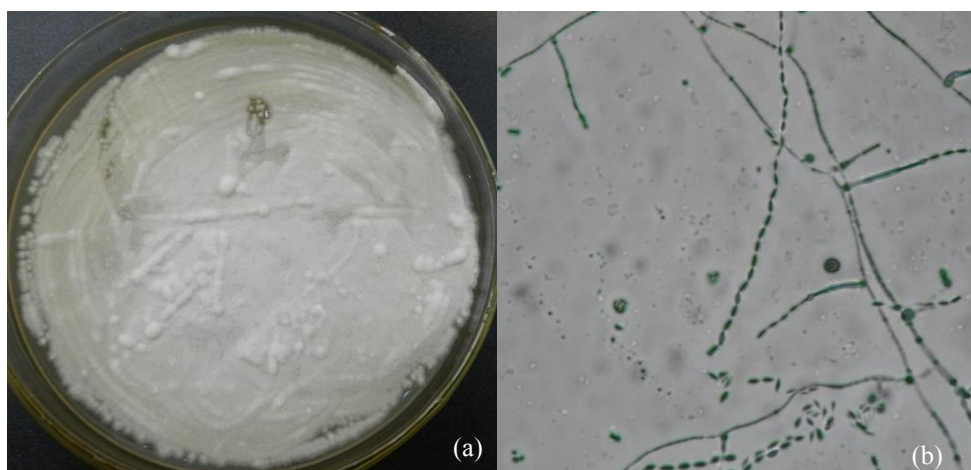
Figura 11. (a) Crescimento micelial de *Penicillium* sp. em ágar BDA, sem glifosato. (b) Microcultivo em ágar BDA, sem glifosato, aumento microscópio óptico 1000X.



O gênero *Geotrichum* sp., apresentou morfologia colonial aveludada, hialina e quando volumosa branca, com contorno irregular e bordos ciliados (Figura 12a). Em relação ao microcultivo, não foram observados conidióforos e conídios organizados em forma de cadeia (Figura 12b) (BARNETT; HUNTER, 1998). Dessa forma, foi possível identificar este gênero pela presença de hifas hialinas ramificadas que podem se fragmentar em esporos, denominados artroconídios (ANVISA, 2004). Pertence a ordem

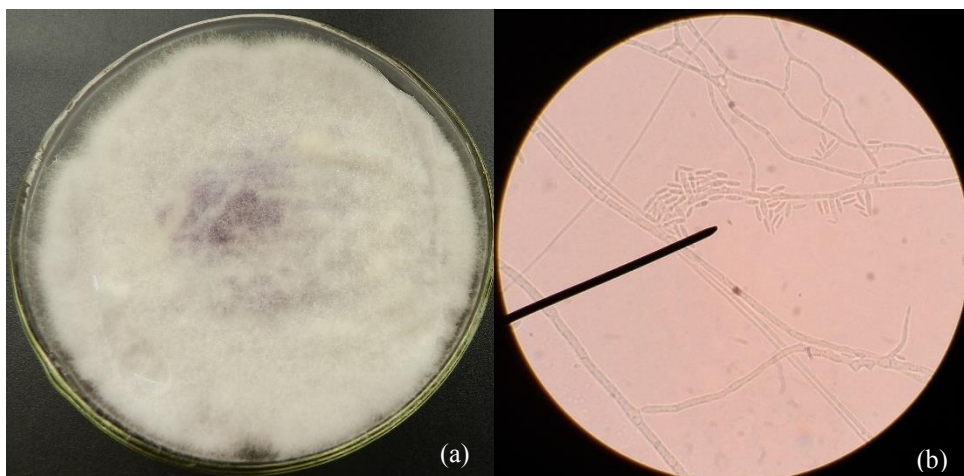
Saccharomycetales (INDEX FUNGORUM, 2015), está presente em ambientes diversos e pode causar doenças em plantas e animais (BARNETT; HUNTER, 1998).

Figura 12. (a) Crescimento micelial de *Geotrichum* sp. em ágar BDA, sem glifosato. (b) Microcultivo em ágar BDA, sem glifosato, aumento microscópio óptico 1000X.



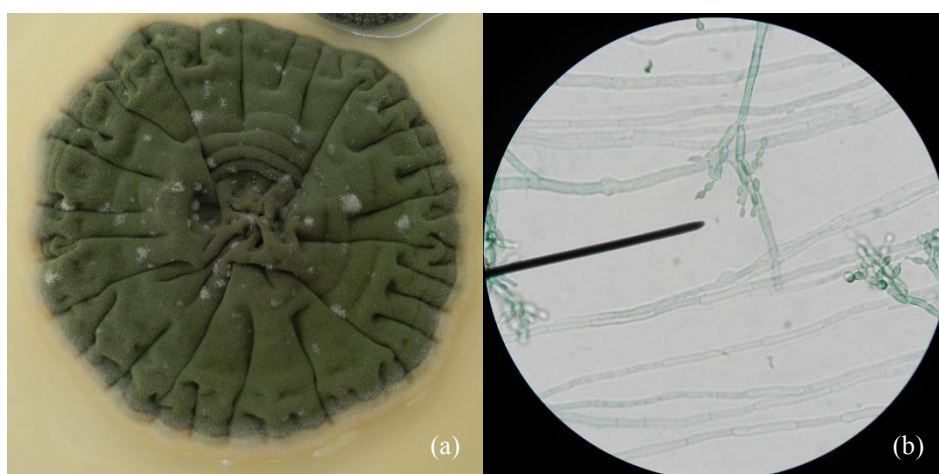
O gênero *Fusarium* sp. exibiu crescimento micelial rápido, com colônia de aspecto cottonoso, primeiramente com coloração branca e aos poucos, surgimento de coloração roxa no meio (Figura 13a). Segundo Barnett e Hunter (1998), em geral, o gênero *Fusarium* sp. apresenta micélio extenso e cottonoso, muitas vezes com algum tom de rosa, roxo, ou amarelo no meio. Observou-se no microcultivo a presença de esporos com extremidades pontiagudas, ligeiramente curvados (BARNETT; HUNTER, 1998) (Figura 13b). Este gênero faz parte da ordem Hypocreales e apresenta ampla gama de espécies patogênicas (AMORIN et. al., 2011).

Figura 13. (a) Crescimento micelial de *Fusarium* sp. em ágar BDA, sem glifosato. (b) Microcultivo em ágar BDA, sem glifosato, aumento microscópio óptico 1000X.



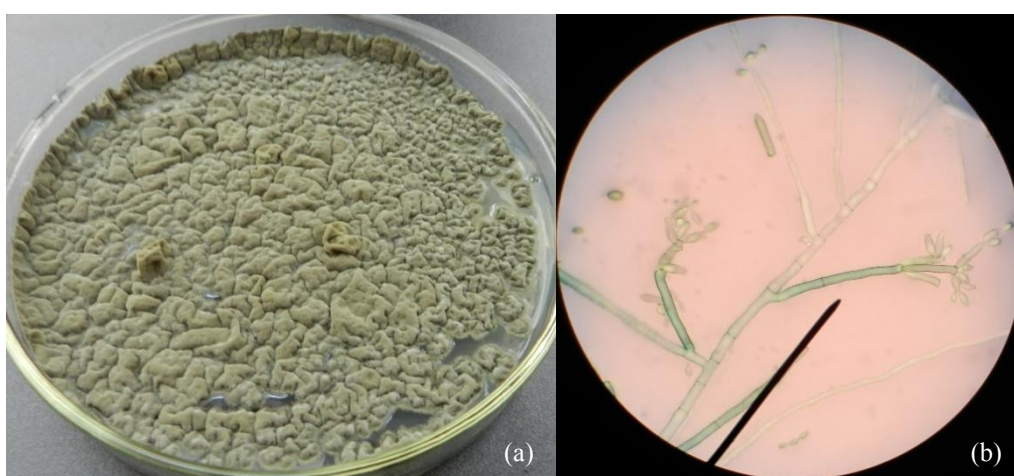
O gênero *Cladosporium* sp., apresentou colônia com aspecto aveludado, coloração verde-escuro, topografia cerebriforme e contorno regular (Figura 14a). Pode-se observar em relação ao microcultivo, esporos de coloração verde escura, ovoides, tipicamente em forma de limão. Foi observada a presença de conidióforos, de coloração verde-escuro, eretos, ramificados próximo ao ápice e agrupados (BARNETT; HUNTER, 1998) (Figura 14b). O gênero *Cladosporium* sp., pertence a ordem Capnodiales (INDEX FUNGORUM, 2015) e pode causar algumas doenças em plantas e animais (BARNETT; HUNTER, 1998).

Figura 14. (a) Crescimento micelial de *Cladosporium* sp. em ágar BDA, sem glifosato. (b) Microcultivo em ágar BDA, sem glifosato, microscópio óptico 1000X.



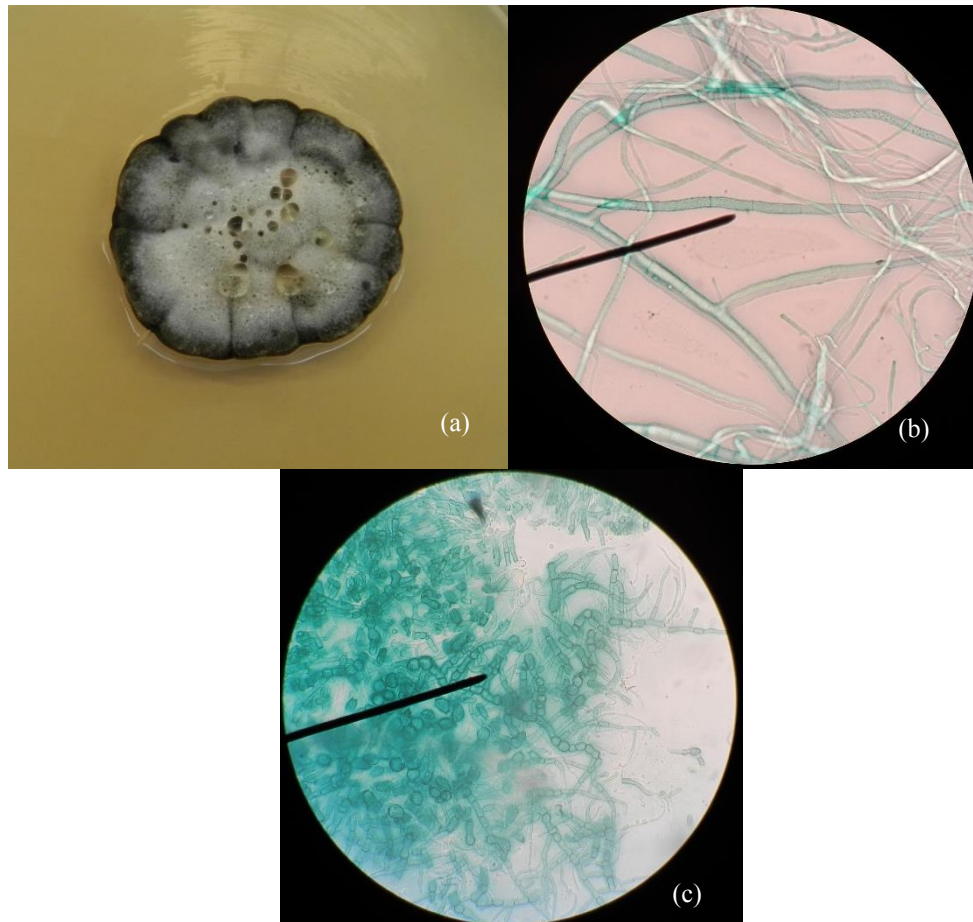
Para o gênero *Trichoderma* sp., foi observada colônia com característica aveludada, de coloração verde-escuro, contorno irregular e bordos denteados (Figura 15a). No microcultivo, foi possível observar conidióforos ramificados, com fiáides em grupos, esporos ovais, em cachos terminais de pequeno porte, com manchas verdes (BARNETT; HUNTER, 1998) (Figura 15b). Este gênero pertence à ordem Hypocreales e são em sua maioria, saprófitos do solo ou de madeira com algumas espécies relacionadas como parasitas em outros fungos (AMORIN et al., 2011; BARNETT; HUNTER, 1998).

Figura 15. (a) Crescimento micelial de *Trichoderma* sp. em ágar BDA, sem glifosato. (b) Microcultivo em ágar BDA, sem glifosato, aumento microscópio óptico 1000X.



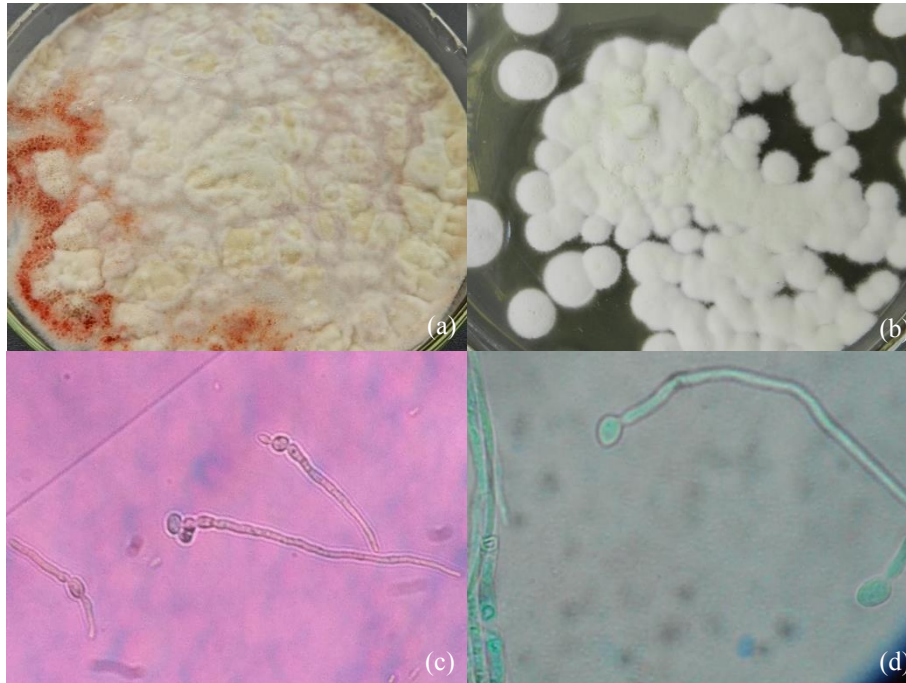
O gênero *Rhizoctonia* sp., pertencente à ordem Cantharellales, apresentou colônia cotonosa e aveludada, com bordos regulares, coloração branca no meio e bordos cinza escuro (Figura 16 a). Em relação ao microcultivo, verificou-se a presença de hifas septadas, bem definidas e foram observados mais de dois núcleos dentro de cada célula vegetativa da hifa, sendo então, classificada como multinucleada (OLIVEIRA et al., 2014) (Figura 16 b). Esse gênero ocorre exclusivamente na forma micelial, não produzindo esporos, sobrevive no solo por meio da formação de escleródios. Na Figura 16 (c), foi possível identificar os escleródios, que são estruturas resistentes, formadas por agregados compactos de hifas somáticas e massas arredondadas (AMORIN et. al., 2011; BARNETT; HUNTER, 1998).

Figura 16. (a) Crescimento micelial de *Rhizoctonia* sp. em ágar BDA, sem glifosato. (b) e (c) Microcultivo em ágar BDA, sem glifosato, aumento microscópio óptico 1000X.



Os falsos fungos F11 e F13, apresentaram aspecto da colônia semelhante a um fungo filamentoso verdadeiro (Figura 17 a e b). Em relação ao microcultivo, foi possível observar a formação de zoósporo e esporângio (Figura 17 c e d) (AMORIN et. al., 2011).

Figura 17. (a) Crescimento micelial de falso fungo F13 em ágar BDA, sem glifosato. (b) Crescimento micelial de falso fungo F11 em ágar BDA, sem glifosato. (c) Microcultivo F13 em ágar BDA, sem glifosato, aumento microscópio óptico 1000X. (d) Microcultivo F11 em ágar BDA, sem glifosato, aumento microscópio óptico 1000X.



Após avaliada a capacidade de crescimento dos fungos e realizada a identificação dos mesmos, foi calculada a velocidade de crescimento conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7. Velocidade de crescimento radial dos fungos, em mm/h.

Fungos	VCR (mm/h)	Gêneros
F3	0,73 ± 0,00 ^e	<i>Cladosporium</i> sp.
F4	0,75 ± 0,01 ^d	<i>Geotrichum</i> sp.
F5	0,72 ± 0,00 ^e	n.d.**
F6	0,80 ± 0,01 ^b	<i>Fusarium</i> sp.
F7	0,74 ± 0,01 ^e	<i>Trichoderma</i> sp.
F8	0,73 ± 0,01 ^e	<i>Penicillium</i> sp.
F9	0,73 ± 0,00 ^e	<i>Rhizoctonia</i> sp.
F10	0,78 ± 0,00 ^c	<i>Penicillium</i> sp.
F11	0,77 ± 0,01 ^c	Falso fungo
F12	0,83 ± 0,02 ^a	<i>Aspergillus</i> sp.
F13	0,76 ± 0,00 ^d	Falso fungo

* Médias ± desvio padrão de três repetições, seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

** n.d. = gênero não determinado.

Os gêneros dos fungos filamentosos que apresentaram maior velocidade de crescimento, foram *Aspergillus* sp. (F12), seguido de *Fusarium* sp. (F6), *Penicillium* sp. (F10) e um falso fungo (F11), com terceira maior velocidade de crescimento. Os fungos *Geotrichum* sp. (F4) e um falso fungo (F13), apresentaram quarta maior velocidade. Cabe ressaltar que os fungos F11 e F13 pertencem ao grupo dos falsos fungos. Com a menor velocidade de crescimento, foram identificados os fungos pertencentes aos gêneros *Cladosporium* sp. (F3), *Trichoderma* sp. (F7), *Penicillium* sp. (F8) e *Rhizoctonia* sp. (F9).

Com relação aos estudos de degradação de glifosato por fungos autóctones, Wardle e Parkinson (1990) avaliaram o crescimento das seguintes espécies de fungos isolados de solo com uso de glifosato: *Mucor hiemalis*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium nigricans*, *Mortierella alpina*, *Trichoderma harzianum*, *Sphaerospermum arthrinium* e *Cladosporium cladosporioides*, em meio ágar malte adicionado de glifosato (002, 0,02 e 0,2 mg/g). Das espécies testadas, somente *P. nigricans* teve seu crescimento significativamente estimulado na presença de glifosato enquanto *C. cladosporioides* foi inibido na presença do herbicida. Além disso, os gêneros *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Neosartorya* sp. e *Trichoderma* sp. foram capazes de crescer em meio Martin modificado suplementado com glifosato (16,91 mg/mL) como a única fonte de carbono (KRZYSKO – LUPICKA; ORLIK, 1997).

Considerando a qualidade e quantidade dos fungos autóctones presentes em solo contaminado com glifosato, Krzysko – Lupicka e Sudol (2008) fizeram experimento com a incubação de solo em meio mineral Czapeck adicionado de 169 mg/L de glifosato. Após

30 dias de incubação foram identificados os gêneros: *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Trichoderma* sp., *Mucor* sp. e *Scopulariopsis* sp. Após 180 dias de incubação, apenas os fungos pertencentes ao gênero *Fusarium*: *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*, conseguiram suportar a seletividade da ação do agrotóxico em uma faixa de concentrações de 84,5 mg/L a 253,65 mg/L de glifosato. No entanto, o crescimento das espécies de *Fusarium* foi inibido na concentração de 338,2 mg/L de glifosato.

Nas condições experimentais do presente trabalho, a partir de todos os fungos isolados, apenas três não foram capazes de crescer na alta concentração de glifosato utilizado (300 mg/L). Estes resultados demonstram que os gêneros que apresentaram velocidades de crescimento elevadas estão adaptados a este agrotóxico e o solo amostrado continha uma grande variedade de potenciais degradadores de glifosato, provavelmente, por se tratar de uma área que já fazia uso intensivo do herbicida a 15 anos, o que acabou adaptando os microrganismos presentes naquele ambiente. Além disso, Sailaja e Satyaprasad (2006) observaram que o glifosato estimulou o crescimento de fungos sem influenciar o número de espécies presentes a partir de uma amostra de solo, predominando *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Trichoderma* sp.

Recentemente, Correa (2014) realizou a identificação de gêneros fúngicos tolerantes ao glifosato, isolados de uma amostra de solo da floresta amazônica, e obteve como resultado os gêneros: *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. Adicionalmente, o gênero *Aspergillus* sp. foi identificado como melhor degradador em diferentes concentrações de glifosato (0, 50, 100, 200 e 300 mg/L) a partir de amostras de solos provenientes de fazendas na Arábia Saudita (EMAN et al., 2013).

Estes resultados sugerem que o uso recorrente de glifosato pode influenciar na qualidade da microbiota do solo, em virtude da frequência em que os mesmos gêneros aparecem na literatura (KRZYSKO – LUPICKA; SUDOL, 2008; CORREA, 2013; SAILAJA; SATYAPRASAD, 2006). No entanto, o gênero *Geotrichum* sp., isolado neste estudo, aparece como uma exceção entre os degradadores de glifosato.

6.4 Avaliação preliminar de degradação de glifosato pelos isolados bacterianos

Na etapa de preparo do inóculo, foram inoculadas nos frascos erlenmeyers as cepas B3, B6, B8, B9, B11, B12, B17 e B20, no entanto somente as cepas B6, B7, B8, B9, B11 e B12 apresentaram crescimento e, portanto, foram utilizadas para os testes de

degradação. As cepas que não cresceram possivelmente perderam a capacidade de degradar o glifosato, ou este tornou-se tóxico a elas na concentração utilizada.

Como pode ser observado na Figura 17 e Tabela 8, a velocidade de degradação de DCPIP, foi estatisticamente maior que as demais, nas primeiras 6 h, para as bactérias B6 e B12, sendo estas iguais estatisticamente. As bactérias B7, B8 e B6 obtiveram maiores velocidades nos períodos de 6 a 12, 12 a 24 e 24 a 48 h respectivamente. Após as 48 h, todas apresentaram redução na velocidade e apenas a B8 apresentou velocidade significativamente maior, em relação às demais.

Com relação à concentração 500 mg/L (Figura 18 e Tabela 9), observou-se, que a cepa B12 apresentou estatisticamente maior velocidade de degradação no tempo 0 a 6 h, sendo que após 12 h reduziu consideravelmente. A cepa B7 obteve a segunda maior velocidade de degradação e também apresentou diminuição após o mesmo intervalo de tempo. A cepa B11 apresentou velocidade estatisticamente maior que as demais no tempo 6 a 12 h, enquanto que no tempo 12 a 24 h, a B8 foi a que mais se destacou, se diferenciando das demais. No intervalo de 24 a 48 h, o isolado B6 apresentou a maior velocidade, estatisticamente diferente das demais. Após 48 h, pode-se observar que todas as bactérias diminuíram a velocidade de degradação.

Para a concentração de 700 mg/L de glifosato (Figura 19 e Tabela 10), os valores das velocidades de todas as bactérias foram relativamente mais baixos, em comparação com as outras concentrações, demonstrando que estas cepas podem ter sofrido inibição à medida que a concentração de glifosato aumentou. As cepas B8 e B11 apresentaram velocidades maiores estatisticamente, que as demais, no período de 0 a 6 h. Em geral, todas as bactérias tiveram uma queda na velocidade no período de 6 a 24 h e após, a velocidade começou a subir novamente até 96 h. Esses resultados demonstram que devido a concentração de glifosato ser mais elevada, o tempo de adaptação ao meio (fase lag) foi um pouco maior, em relação às concentrações mais baixas, indicando que as mesmas começaram a sofrer com a toxicidade do meio. Verificou-se, a partir destes resultados, que os isolados bacterianos investigados neste trabalho apresentaram capacidade de degradação, tendo em vista os resultados encontrados por Zabaloy et al. (2008) que analisaram o crescimento de 20 cepas de rizóbios quanto à utilização de glifosato (500 mg/L), como fonte de nutrientes em meio mineral líquido. Destas, apenas uma cepa (*Bradyrhizobium* sp.) apresentou crescimento utilizando glifosato como fonte de carbono. Ainda, Partoazar et al. (2011), avaliou utilização do glifosato como fonte de carbono (500 mg/L) em meio mineral, por bactérias isoladas de um solo contaminado com este

agrotóxico em comparação com um solo não contaminado. Perceberam que ocorreu aumento na população microbiana, isolada do solo com histórico de aplicação de glifosato, em relação à população microbiana do solo não contaminado. Nesse mesmo trabalho, os autores sugeriram que as bactérias do solo contaminado, foram adaptadas ao efeito tóxico do glifosato e que elas foram capazes de utilizá-lo como fonte de nutriente.

Figura 18. Média da |velocidade| de oxidação de DCPIP (g/L/h) $\times 10^5$, na presença de 300 mg/L de glifosato. Barra de erros representam o desvio padrão.

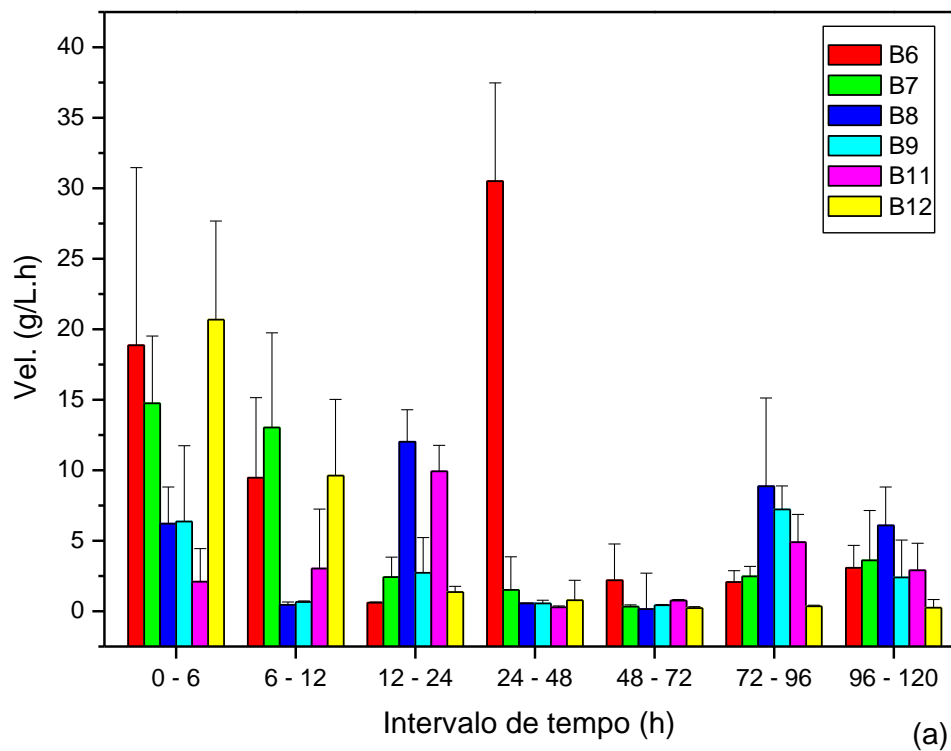


Tabela 8. Média da |velocidade| de oxidação de DCPIP (g/L/h) $\times 10^5$, na presença de 300 mg/L de glifosato.

Tempo	Bactérias					
	B6	B7	B8	B9	B11	B12
0 - 6	18,87 \pm 12,58 a	14,73 \pm 4,78 ab	6,20 \pm 2,59 bc	6,37 \pm 5,36 bc	2,09 \pm 2,35 c	20,68 \pm 6,98 a
6 - 12	9,47 \pm 5,67 ab	13,03 \pm 6,72 a	0,45 \pm 0,20 c	0,65 \pm 0,08 c	3,03 \pm 4,21 bc	9,61 \pm 5,41 ab
12 - 24	0,60 \pm 0,06 b	2,41 \pm 1,43 b	12,01 \pm 2,27 a	2,72 \pm 2,50 b	9,92 \pm 1,85 a	1,37 \pm 0,38 b
24 - 48	30,50 \pm 6,96 a	1,50 \pm 2,35 b	0,56 \pm 0,01 b	0,54 \pm 0,23 b	0,28 \pm 0,08 b	0,77 \pm 1,40 b
48 - 72	2,19 \pm 2,58 a	0,00 \pm 0,00 a	0,16 \pm 2,53 a	0,43 \pm 0,03 a	0,76 \pm 0,06 a	0,23 \pm 0,08 a
72 - 96	2,06 \pm 0,81 bc	2,48 \pm 0,70 bc	8,85 \pm 6,26 a	7,22 \pm 1,65 ab	4,90 \pm 1,96 abc	0,34 \pm 0,07 c
96 - 120	3,08 \pm 1,59 ab	3,61 \pm 3,52 ab	6,07 \pm 2,73 a	2,39 \pm 2,66 ab	2,90 \pm 1,92 ab	0,24 \pm 0,59 b

*Médias \pm desvio padrão de três repetições, seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade de erro.

Figura 19. Média da |velocidade| de oxidação de DCPIP (g/L/h) $\times 10^5$, na presença de 500 mg/L de glifosato. Barra de erros representam o desvio padrão.

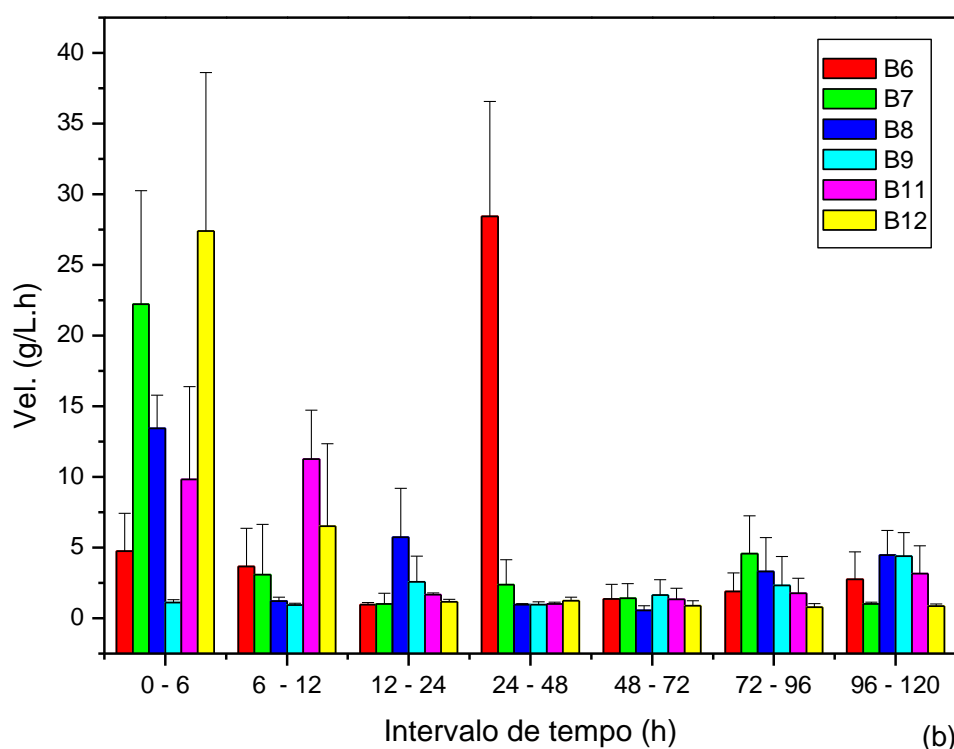


Tabela 9. Média da |velocidade| de oxidação de DCPIP (g/L/h) $\times 10^5$, na presença de 500 mg/L de glifosato.

Tempo	Bactérias					
	B6	B7	B8	B9	B11	B12
0 - 6	4,73 \pm 2,68 cd	22,23 \pm 8,01 ab	13,44 \pm 2,33 bc	1,12 \pm 0,20 d	9,82 \pm 6,55 cd	27,40 \pm 11,21 a
6 - 12	3,66 \pm 2,69 b	3,07 \pm 3,57 b	1,21 \pm 0,27 b	0,93 \pm 0,12 b	11,26 \pm 3,46 a	6,51 \pm 5,82 ab
12 - 24	0,96 \pm 0,13 b	1,01 \pm 0,74 b	5,73 \pm 3,44 a	2,58 \pm 1,81 b	1,66 \pm 0,13 b	1,16 \pm 0,16 b
24 - 48	28,43 \pm 8,12 a	2,37 \pm 1,77 b	0,94 \pm 0,08 b	0,96 \pm 0,18 b	0,99 \pm 0,14 b	1,24 \pm 0,24 b
48 - 72	1,36 \pm 1,04 a	1,40 \pm 1,04 a	0,56 \pm 0,31 a	1,63 \pm 1,09 a	1,33 \pm 0,78 a	0,87 \pm 0,37 a
72 - 96	1,88 \pm 1,31 ab	4,57 \pm 2,67 a	3,30 \pm 2,40 ab	2,32 \pm 2,03 ab	1,76 \pm 1,05 ab	0,78 \pm 0,25 b
96 - 120	2,76 \pm 1,93 ab	1,00 \pm 0,14 b	4,45 \pm 1,76 a	4,39 \pm 1,65 a	3,16 \pm 1,96 ab	0,86 \pm 0,15 b

*Médias \pm desvio padrão de três repetições, seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade de erro.

Figura 20. Média da |velocidade| de oxidação DCPIP (g/L/h) $\times 10^5$, na presença de 700 mg/L de glifosato. Barra de erros representam o desvio padrão.

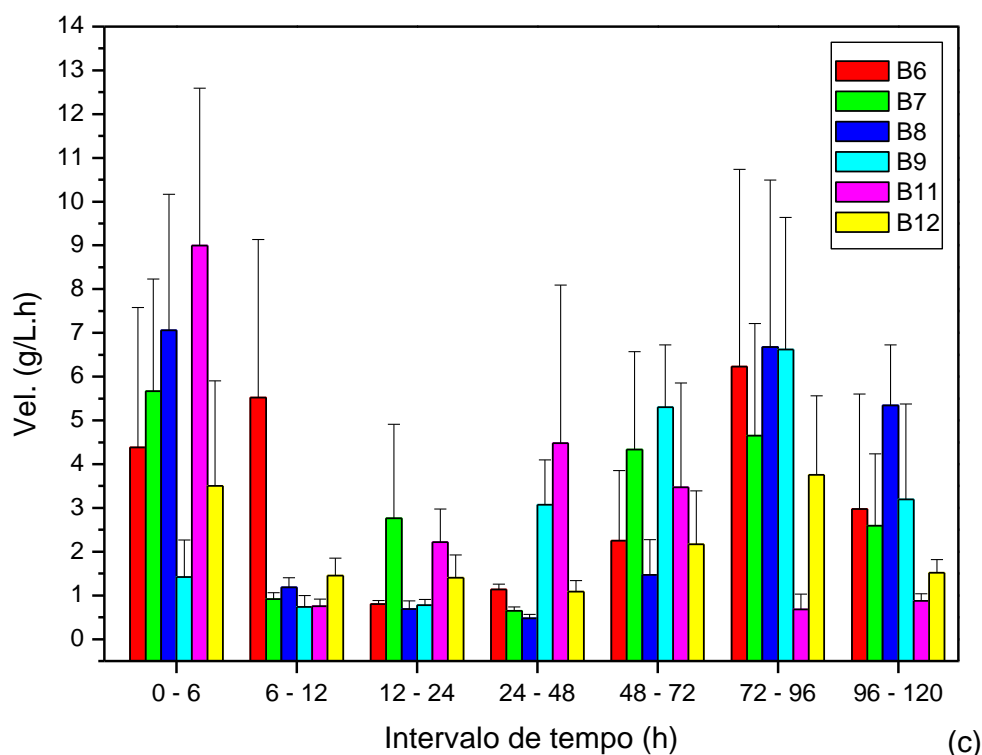
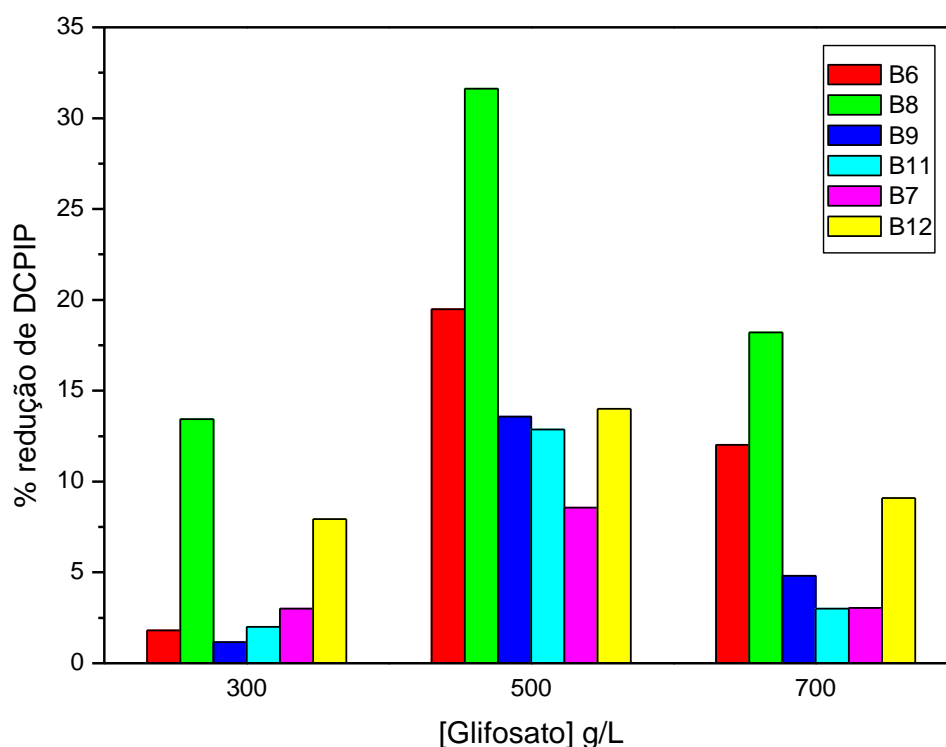


Tabela 10. Média da |velocidade| de oxidação DCPIP (g/L/h) $\times 10^5$, na presença de 700 mg/L de glifosato.

Tempo	Bactérias					
	B6	B7	B8	B9	B11	B12
0 - 6	4,37 ± 3,20 abc	5,66 ± 2,57 abc	7,05 ± 3,11 ab	1,41 ± 0,84 c	8,99 ± 3,59 a	3,50 ± 2,39 bc
6 - 12	5,52 ± 3,61 a	0,91 ± 0,14 b	1,18 ± 0,22 b	0,73 ± 0,26 b	0,75 ± 0,16 b	1,45 ± 0,39 b
12 - 24	0,80 ± 0,08 b	2,75 ± 2,14 a	0,69 ± 0,18 b	0,77 ± 0,13 b	2,22 ± 0,75 ab	1,40 ± 0,52 ab
24 - 48	1,13 ± 0,12 b	0,64 ± 0,08 b	0,47 ± 0,08 b	3,06 ± 1,03 ab	4,48 ± 3,61 a	1,08 ± 0,25 b
48 - 72	2,25 ± 1,59 b	4,33 ± 2,24 ab	1,46 ± 0,80 b	5,30 ± 1,42 a	3,47 ± 2,37 ab	2,17 ± 1,22 b
72 - 96	6,22 ± 4,51 a	4,65 ± 2,56 ab	6,68 ± 3,81 a	6,62 ± 3,01 a	0,67 ± 0,34 b	3,75 ± 1,80 ab
96 - 120	2,97 ± 2,62 ab	2,59 ± 1,64 ab	5,34 ± 1,38 a	3,19 ± 2,18 ab	0,87 ± 0,16 b	1,51 ± 0,29 b

*Médias \pm desvio padrão de três repetições, seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade de erro.

Figura 21. Percentagem de degradação de glifosato, expresso em percentual de DCPIP reduzido*, em 120h.



* O DCPIP reduzido foi calculado por meio do módulo da diferença entre a concentração final e a inicial, após calculado a porcentagem deste valor em relação a concentração de DCPIP inicial.

Em geral, todas as bactérias apresentaram as maiores velocidades de degradação nas concentrações de 300 e 500 mg/L e possivelmente, conseguiram degradar o glifosato, mesmo que parcialmente, em todas as concentrações testadas. A cepa B8 foi a que mais se destacou em relação à porcentagem de oxidação de DCPIP, entre as concentrações testadas. Sendo que a mesma, apresentou velocidade estável, na maioria dos intervalos de tempo.

Em consonância com estes resultados, Travaglia et al. (2015) observaram o crescimento das cepas: *Pseudomonas* sp. e *Azospirillum* sp., utilizando glifosato como fonte de carbono, em meio mineral modificado com glifosato (250, 500 e 1000 mL/L). As cepas apresentaram maior crescimento na concentração 250 mL/L, sendo que o aumento na concentração de glifosato acarretou na diminuição do crescimento dos isolados. Ambas as cepas testadas, na concentração 250 mL/L, atingiram crescimento máximo às 72 h de incubação.

Ainda, Bazot e Lebeau (2008) realizaram experimento com inoculação de *Pseudomonas* sp. em meio mineral adicionado de 80 mg/L de glifosato. Estas, foram capazes de mineralizar o glifosato no prazo de 72 h com uma taxa máxima de degradação de 3,05 mg/L/h. Anteriormente, Dick e Quin (1995) relataram que *Pseudomonas* sp. cresceram de forma eficiente utilizando glifosato como fonte de fósforo, em meio mineral fornecido com glifosato (42,44 mg/L).

Observa-se, com base nas Figuras 17 e 18, que as cepas bacterianas testadas, possivelmente não apresentaram ou tiveram uma fase lag muito breve, com exceção da concentração de 700 mg/L de glifosato (Figura 19), que apresentou uma fase lag mais longa. Nas concentrações 300 e 500mg/L, a fase logarítmica foi percebida no período de 12 a 24h enquanto que em 48h possivelmente ocorreu a fase linear. Após as 48h, pode-se perceber o processo de desaceleração do crescimento. Diferentemente, Roslycky (1982) observou que a população de bactérias, isoladas de um solo com histórico de aplicação de glifosato, atingiu valores máximos no período de 3 a 14 dias, nas concentrações de 0,1 a 0,5 mg/g de glifosato. Com base nos resultados apresentados sobre a velocidade de oxidação de DCPIP, sugere-se que, as bactérias testadas no presente estudo, são adaptadas ao glifosato e podem ser utilizadas em futuros estudos de biorremediação.

Antagônico a esses resultados, Forlani et al., (1999) avaliou a utilização de glifosato, como fonte de carbono, por cepas microbianas isoladas de um solo tratado com glifosato. A incubação foi realizada em meio mineral adicionado de 338 mg/L de

glifosato. Das 1200 cepas bacterianas isoladas, nenhuma apresentou crescimento na presença do glifosato, como única fonte de carbono ou nitrogênio.

Neste estudo, embora tenha ocorrido interação do glifosato com o indicador DCPIP, observado pela mudança de coloração do controle (azul para incolor), de maneira geral, esse método se mostrou relevante na identificação de microrganismos capazes de degradar glifosato. Esta interação observada no grupo controle, possivelmente ocorreu devido ao caráter ácido do agrotóxico em pH 7,0 que por sua vez, libera íons H⁺, ocasionando a redução do DCPIP.

CONCLUSÃO

- ✓ Foi possível isolar bactérias e fungos cultiváveis de amostras de solo com histórico de aplicação de glifosato.
- ✓ Dos 18 fungos filamentosos, potenciais degradadores, 11 apresentaram crescimento micelial utilizando o glifosato como única fonte de carbono, pertencentes aos gêneros: *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Geotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Penicillium* sp., além de dois falsos fungos e um exemplar que não foi possível determinar o gênero.
- ✓ O gênero *Geotrichum* sp. apareceu como uma exceção entre os degradadores de glifosato, uma vez que não é citado na literatura.
- ✓ Os gêneros que mais se destacaram foram: *Aspergillus* sp. *Fusarium* sp. *Penicillium* sp. e *Geotrichum* sp. e os dois falsos fungos, sendo que estes podem ser considerados como promissores para futuros estudos de biorremediação.
- ✓ Com relação às bactérias, foram isoladas 25 cepas morfologicamente diferentes, possíveis degradadoras de glifosato, destas, seis permaneceram viáveis até o início da realização do experimento de degradação.
- ✓ Todas as seis cepas apresentaram velocidade de degradação de DCPIP nas diferentes concentrações de glifosato testadas, indicando a possível degradação deste e apresentaram maiores velocidades de degradação na concentração de 500 mg/L.

- ✓ A cepa B8 apresentou maior porcentagem de redução de DCPIP e possivelmente de glifosato, entre as três diferentes concentrações, com velocidade estável na maioria dos intervalos de tempo.
- ✓ A baixa velocidade de degradação de glifosato observada na concentração 700 mg/L, indica que o aumento na concentração de glifosato no meio pode ocasionar efeito inibitório às cepas bacterianas testadas.
- ✓ Com base nos estudos apresentados, foi possível concluir que tanto os fungos quanto as bactérias são microrganismos promissores que podem ser utilizados em técnicas de biorremediação e com isso auxiliar na eliminação do glifosato no solo. Esse processo pode ainda, diminuir o tempo de espera da conversão da produção convencional em produção agroecológica nas áreas de transição.

PERSPECTIVAS

Para dar continuidade nos estudos de biodegradação dos microrganismos autóctones que utilizam glifosato como fonte de carbono, se faz necessária a finalização da etapa de identificação das bactérias quanto ao gênero/espécie. Além disso, é essencial a realização de testes de degradação com os fungos que se destacaram, em diferentes concentrações de glifosato como única fonte de carbono, visando avaliar a cinética de degradação dos mesmos. Complementar os experimentos de otimização do meio de cultivo para a degradação do glifosato.

Ainda, realizar um estudo complementar com análises de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL-EM) para identificação dos produtos de degradação e com isso, compreender a rota metabólica utilizada pelos microrganismos, realizar estudos de toxicidade e biodegradação dos metabólitos formados. Posterior a isso, verificar a viabilidade em realizar estudos futuros de biorremediação, seja *in situ* ou *ex situ*, para potencializar a remoção desse agrotóxico de solos contaminados.

BIBLIOGRAFIA

ABRAMOVAY, R. **Paradigmas do capitalismo agrário em questão**. São Paulo-Rio de Janeiro, Campinas: Hucitec, Anpocs, Unicamp, 1992. 275 p.

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

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4 ed. New York: Wiley, 1996. 865 p.

ALTIERI, M. A. Agroecologia, agricultura camponesa e soberania alimentar. **Revista NERA**, v. 13, p. 22–32, 2010.

ALTIERI, M. A. **Agroecology: the scientific basis of alternative agriculture**. Boulder: Westview Press, 1987. 173 p.

ALTIERI, M. A. The ecological impacts of transgenic crops on agroecosystem health. **Ecosystem Health**, v. 6, p. 13-23, 2000.

AMARANTE, O. P. J.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, p. 589-593, 2002.

AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. 4 ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. 704 p.

ANDRIGHETTI, M. S.; NACHTIGALL, G. R.; QUEIROZ, S. C. N.; FERRACINI, V. L.; AYUB, M. A. Z. Biodegradação de glifosato pela microbiota de solos cultivados com macieira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, p. 1643-1653, 2014.

ANDRIGHETTI, M. S. **Biodegradação de glifosato por bactérias isoladas de solos cultivados com macieira com diferentes históricos de aplicação deste herbicida**. 2011, 109f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em

Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, 2011.

ARANTES, S. A. C. M. **Retenção e degradação de ¹⁴C-glifosato e remobilização dos seus resíduos ligados em diferentes classes de solos.** 121 p. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba – São Paulo, 2007.

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

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

AUGUSTO, L. G. S.; CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; FARIA, N. M. X.; BÚRIGO, A. C.; FREITAS, V.M.T.; GUIDUCCI FILHO, E. **Dossiê ABRASCO: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.** Rio de Janeiro: ABRASCO. 2ª Parte, 2012. 135 p.

AUGUSTO, L. G. S.; RIGOTTO, M. R.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A. C.; CARNEIRO, F. F. (Org.). **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.** Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. 624 p.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi.** 4. ed. Minnesota: APS press, 1998. 218 p.

BAZOT, S.; LEBEAU, T. Simultaneous mineralization of glyphosate and diuron by a consortium of three bacteria as freeand/or immobilized-cells formulations. **Applied Microbial and Cell Physiology,** v. 77, p. 1351–1358, 2008.

BEIGEL, C.; CHARNAY, M. P.; BARRIUSO, E. Degradation of formulated and unformulated triticonazole fungicide in soil: effect of application rate. **Soil Biology & Biochemistry,** v. 31, p. 525-534, 1999.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 65-68, 2003.

BLACKBURN, J. W.; HAFKER, W. R. The impact of biochemistry, bioavailability and bioactivity on the selection of bioremediation techniques. **Trends in biotechnology**, v. 11, p. 328-333, 1993.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Monografias de Agrotóxicos**, 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6e400500474594899c26dc3fbc4c6735/G01.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 16 nov. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Nota técnica reavaliação toxicológica do ingrediente ativo foratolotox**, 2014. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c480ff804f1d75bba8ddbcc88f4b6a31/Nota+T%C3%A9cnica+do+forato.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 12 nov. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Programa de Análise de Resíduo de Agrotóxico em Alimentos (PARA), dados da coleta e análise de alimentos de 2010**. Brasília: ANVISA, 2011. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>. Acessado em: 12 set. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Deteção e Identificação dos Fungos de Importância Médica, Módulo VII**, 2004. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/0912db004e257975b0efb3c09d49251b/M%C3%B3dulo+7+%E2%80%93+Detec%C3%A7%C3%A3o+e+identifica%C3%A7%C3%A3o+de+micobact%C3%A9rias+de+import%C3%A2ncia+m%C3%A9dica.pdf?MOD=AJPERES>. Acessado em: 20 dez. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Seminário de Mercado de Agrotóxico e Regulação**, 2012. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu++noticias+anos/2012+noticias/seminario+volta+a+discutir+mercado+de+agrototoxicos+em+2012>>. Acesso em: 20 abr. 2015.

BRASIL, Ministério da Saúde, **Modelo de atenção integral à saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília, 2011. Disponível em: https://executivanutricao.files.wordpress.com/2011/04/modelodeatencao4_2011.pdf. Acesso em: 11 nov. 2015.

BRASIL. **Decreto n, 4074 de dezembro de 2002**. Disponível em <http://www.planalto.gov.br>. Acessado em 09 jul. 2014.

BRASIL. **Decreto no 6.323, de 27 de dezembro de 2007**. Disponível em <http://www.planalto.gov.br>. Acessado em 04 fev. 2016.

BRASIL. **Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003**. Disponível em <http://www.planalto.gov.br>. Acessado em 04 fev. 2016.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 6 de outubro de 2011**. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br>. Acessado em 05 fev. 2016.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 17, de 18 de junho de 2014**. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br>. Acessado em 05 fev. 2016.

BRUM, A. J. A. **Modernização da Agricultura: trigo e soja**. Petrópolis: Vozes; Ijuí: FIDENE, 1988. p. 31-89.

BUNDGARD–NIELSEN, K., NIELSEN, P.V. Fungicidal effect of disinfectants against 25 fungal contaminants commonly found in bread and cheese manufacturing. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 268–275, 1995.

CAPORAL, R. F.; PETERSEN, P. Agroecologia e Políticas Públicas na América Latina:

O Caso do Brasil. **Agroecología**, v. 6, p. 63-74, 2012.

CAPREZ, M. A. C. BORGES, A. L. N. BISPO, M. G. PEREIRA, D. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**, v. 30, p. 32-37, 2002.

CASTRO J. J. V. **Avaliação do Impacto do Herbicida Glifosato na Microbiota do Solo e Biodegradação por Cepas de Fusarium**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, RS, 2006.

CATTANI, D.; CAVALLI, V. L. L. O.; RIEG, C. E. H.; DOMINGUES, J. T.; DAL CIM T.; TASCIA, C. I.; SILVA, F. R. M. B.; ZAMONER, A., Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: Involvement of glutamate excitotoxicity. **Toxicology**, v. 320, p. 34–45, 2014.

CAVALLI, V. L. L. O.; CATTANI, D.; RIEG, C. E. H.; PIEROZAN, P.; ZANATTA, L.; PARISOTTO, E. B.; WILHELM FILHO, D.; SILVA, F. R. M. B.; PESSOA-PUREUR, R.; ZAMONER, A. Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65 p. 335–346, 2013.

CHEAH, U. B.; KIRKWOOD, R. C.; LUM, K. Y. Adsorption, desorption and mobility of four commonly used pesticides in Malaysian agricultural soils. **Pesticide Science**, v. 50, p. 53-63, 1997.

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

CONWAY, G. R. **The doubly green revolution: food for all in the 21st century**. London, UK: Penguin Books, 1997. 335 p.

CORREA, L. O. **Degradação De Glifosato (N-Fosfometil-Glicina) Por Fungos Isolados De Solo Da Floresta Amazônica**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais). Universidade Do Estado Do Amazonas, Escola De Ciências Da Saúde. Programa De Pós-Graduação Em Biotecnologia e Recursos Naturais Da Amazônia. Manaus, 2013.

COSTABEBER, J. A.; CAPORAL, F. R. **Possibilidades e alternativas do desenvolvimento rural sustentável. Agricultura familiar e desenvolvimento rural sustentável no Mercosul**. Santa Maria: Editora da UFSM-Pallotti, 2003. p. 157-194.

DELGADO, G. C. **Do “Capital financeiro na agricultura” a economia do agronegócio: mudanças cíclicas em meio século (1965 – 2012)**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2012.

DEKKER, J. H.; DUKE, S. O. Herbicide-resistant field crops. **Advances in Agronomy**, v. 54, 1995. 69 p.

DELLAMATRICE, P. M.; COSTA, L. S.; MARQUES, S. A.; VIANA, M. S.; ARAÚJO, R. S. Degradação de agrotóxicos por fungos basidiomicetos em solo agrícola contendo altos níveis de três produtos diferentes. **Pesticidas: ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 22, p. 7–16, 2012.

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

EMAN, A.; ABDEL-MEGEED, A.; SULIMAN, A. M. A.; SADIK, M. W.; SHOLKAMY, E. N. Biodegradaditon of Glyphosate by fungal strains isolated from herbicides polluted-soils in Riyadh area. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 2, p. 359-381, 2013.

ERMAKOVA, I. T.; KISELEVA N. I.; SHUSHKOVA, T.; ZHARIKOV, M.; ZHARIKOV, G. A.; LEONTIEVSKY, A. A. Bioremediation of glyphosate-contaminated soils. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, p. 585–594, 2010.

EVANS, F. F.; ROSADO, S.; SEBASTIAN, G. V.; CASELLA, R.; MACHADO, P. L. O. A.; HOLMSTROM, C.; KJELLEBERG, S.; VAN ELSAS, J. D.; SELDIN, L. Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 49, p. 295–305, 2004.

FALK, J. W.; CARVALHO, L. A.; SILVA, L. R.; PINHEIRO, S. R. S.; Suicídio e doença mental em Venâncio Aires-RS: consequência do uso de agrotóxicos organofosforados? In: Salão de Iniciação Científica, 8., 1996, Porto Alegre, RS. **Livro de resumos**. Porto Alegre: UFRGS/PROPESQ, 1996.

FANTROUSSI, S.; AGATHOS, S. N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 268–275, 2005.

FORLANI, G.; MANGIAGALLI, A.; MIELSEN, E.; SUARDI, C. M., MENSINK, H.; JANSSEN, P. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, p. 991-997, 1999.

FRANCIS, C. A. **Multiple Cropping Systems**. New York: MacMillan, 1986, 383 p.

FRANCO, R.; L. I. S.; RODRIGUEZ-ROCHA, H.; BURNS, M.; PANAYIOTIDIS, M. I. Molecular mechanisms of pesticides-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, p. 289-300, 2010.

FRANKENBERGER, W. T. J. R.; KARLSON, U. Bioremediation of seleniferous soils. In: HINCHEE, R. E.; OLFENBUTTEL, R. F. **On-Site Bioreclamation: Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment**. Stoneham, MA: Butterworth-Heinemann, 1991. p. 239–254.

FRANZ, J. E.; MAO, M. K.; SIKORSKI, J. A. **Glyphosate: a unique global herbicide**. Washington: American Chemical Society, 1997. p. 653.

FURTADO, C. **O mito do desenvolvimento econômico**. Rio de Janeiro: Paz e Terra, 1974. 117 p.

GAVRILESCU, M. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. **Engineering in Life Sciences**, v. 5, p. 497- 526, 2005.

GEVAO, B.; SEMPLE, K. T.; JONES, K. C. Bound pesticide residues in soils: A review. **Environmental Pollution**, v. 108, p. 3-12, 2000.

GILL, R. J.; RAMOS-RODRIGUEZ, O.; RAINE, N. E. Combined pesticide exposure severely affects individual – and colony – levels traits in bees. **Nature**, v. 491, p. 105-109, 2012.

GLASS, R. L. Adsorption of glyphosate by soils and clay minerals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, p. 497-500, 1987.

GOLDSMITH, E. Pesticides create pests. **The Ecologist**, v.10, p. 94-97, 1980.

GONÇALVES, J. S. **Estratégias de biorremediação para solos contaminados com o herbicida terbutilazina com base na bioadição de *Pseudomonas* sp.** 2013. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada). Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Programa de Pós Graduação em Microbiologia Aplicada, Lisboa, 2013.

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.

GOTTEMS, L. **Mercado de glifosato deve alcançar US\$ 8,79 bilhões nos próximos 6 anos.** Agrolink, 2014. Disponível em: http://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/noticia/mercado-de-glifosato-deve-alcancar-us-8-79-bilhoes-nos-proximos-6-anos_191694.html. Acesso em: 9 mar. 2016.

GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. **The herbicide Glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p. 490.

GUZMÁN, E. S. **Ética Ambiental y Agroecología: elementos para una estrategia de sustentabilidade contra el neoliberalismo y la globalización económica**. Córdoba: ISEC-ETSIAM, Universidad de Córdoba, España, 1999. 30 p.

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

HANSON, K. G.; DESAI, J. D.; DESAI, A. J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v.7, p. 745-748, 1993.

HARPER, S. Sorption-desorption and herbicide behavior in soil. **Weed Science**, v.6, p. 207-225, 1994.

HAWKINS, A. C.; HARWOOD, C. S. Chemotaxis of *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) to the herbicide 2, 4 - Dichlorophenoxyacetate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 968-972, 2002.

IAPAR, INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. **Amostragem de solo para análise química: plantio direto e convencional, culturas perenes, várzeas, pastagens e capineiras**. Londrina: IAPAR, Circular 90, 1996. 28 p.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; GONÇALVES, L. S.; JONG, D. D.; FREITAS, B. M.; CASTRO, M. S.; ALVES DOS SANTOS, I.; VENTURIERI, G. As abelhas e o desenvolvimento rural no Brasil. **Mensagem Doce**, v. 80, p. 3-18, 2005.

IBAMA, INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos - Boletim Anual de Produção, Importação, Exportação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil**. Brasília – DF, 2014. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>. Acessado em 10 dez. 2015.

INDEX FUNGORUM. **MycoBank**. Disponível em:
<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>, acesso em janeiro, 2016.

KER, J. C.; CURTI, N.; SCHAEFER, C. E.; TORRADO, P. V. **Pedologia: fundamentos**, Viçosa, MG: SBCS, 2012. 343 p.

KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R. J.; MEYER, A. Distúrbios do sistema reprodutivo humano e exposição a pesticidas no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, p. 435-445, 2002.

KRZYSKO-LUPICKA T.; SUDOL T. Interactions between glyphosate and autochthonous soil fungi surviving in aqueous solution of glyphosate. **Chemosphere**, v. 71, p. 1386–1391, 2008.

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, p. 2601-2605, 1997.

LAPPE, F. M.; COLLINS, J.; ROSSET, P.; ESPARZA, L. **World Hunger: Twelve Myths**, 2. ed. New York: Grove Press, 1998. p. 270.

LEÃO, I. Z. C. C. O Desenvolvimento Econômico Brasileiro Segundo Ignácio Rangel. **Economia & Tecnologia**, v. 10, p. 109-116, 2007.

LERBS, W.; STOCK, M.; PARTHIER, B. Physiological aspects of glyphosate degradation in *Alcaligenes* sp., strain GL. **Archives of Microbiology**, v. 153, 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, p. 1799–1804, 1991.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.

190 p.

LOPES, P.R.M., OLIVEIRA, L.M., MONTAGNOLLI, R.N., TAMADA, I.S., CRUZ, J.M., CONTIERO, J., BIDOIA, E.D. Método colorimétrico aplicado à degradação de óleo lubrificante por *Pseudomonas aeruginosa* e biossurfactante. In: BENTO F. M.; HIDALGO G. E. N.; GAYLARDE C. C.; SHIRAKAWA M. A.; CAMARGO F. A. O. **8th Latin American Biodeterioration and Biodegradation Symposium**. Porto Alegre: Evangraf, 2014. 136p.

MANGAT, S. S.; ELEFSINIOTIS, P. Biodegradation Of The Herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) In Sequencing Batch Reactors. **Water Resource of Great Britain**, v. 33, p. 861–867, 1999.

MARIANO, A. P.; KATAOKA, A. P. A. G.; ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 346–353, 2007.

MATTOS, L. **Marco referencial em agroecologia**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 70 p.

MAZON, L. M. **Estudo exploratório entre trabalhadores rurais expostos ocupacionalmente a agrotóxicos com provável atividade disruptora endócrina**. Trabalho de Conclusão de Curso (Enfermagem), Universidade Estadual de Santa Catarina, Palmitos, SC, 2007.

MEYER, D. D. **Avaliação da biodegradabilidade de misturas de diesel e biodiesel (B0, B20 e B100) em dois solos com diferentes granulometrias**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). 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, RS, 2011.

MEYER, T. N.; RESENDE, I. L. C.; ABREU, J. C. Incidência de suicídios e uso de agrotóxicos por trabalhadores rurais em Luz (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 32, p. 24-30, 2007.

MIANO, T. M.; PICCOLO, A.; CELANO, G.; SENESI, N. **Science of The Total Environment**, v. 123, p. 83–92, 1992.

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

MORAES, P. V. D.; ROSSI, P.; Comportamento ambiental do glifosato. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 9, p. 22-35, 2010.

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

MUSUMECI, M, R. Defensivos agrícolas e sua interação com a microbiota do solo, In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. 1. ed. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 341-356.

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

OLIVEIRA JR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE M. H. **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. 1. ed. Curitiba-PR: Omnipax, 2011. 348 p.

OLIVEIRA JR, R. S.; REGITANO, J. B. Dinâmica de Pesticidas no Solo, In: ALLEONI, L. R. F.; MELO, V. F. **Química e Mineralogia de Solos**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, 2009. p. 188-241.

OLIVEIRA, A. C. C.; SOUZA, P. E.; POZZA, E. A.; FIGUEIRA, A. R.; AVELAR, G. D.; GOMES, E. A.; MONTEIRO, F. P. Caracterização morfológica, genética e patogenicidade de isolados de *Rhizoctonia solani* provenientes de algodoeiros no Brasil. **Bioscience Journal**, v. 30, p. 512-524, 2014.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA (FAO). **O estado da segurança alimentar e nutricional no Brasil: um retrato multidimensional**. Relatório 2014. Brasília: FAO, 2014. Disponível em: https://www.fao.org.br/download/SOFI4_Brasil.pdf. Acesso em: 15 set. 2015.

PAPANASTASIOU, A. C.; MAIER, W. J. Kinetics of Biodegradation of 2,4-Dichlorophenoxy-acetate in the Presence of Glucose. **Biotechnologist and Bioengineering**, v. 24, p. 2001 – 2011, 1982.

PARANÁ, Secretaria de Estado da Saúde, Superintendência de Vigilância em Saúde, Centro Estadual de Saúde do Trabalhador. **Protocolo de Avaliação das Intoxicações Crônicas por Agrotóxicos**. Curitiba, 2013. Disponível em: http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/CEST/Protocolo_AvaliacaoIntoxicacaoAgrototoxicos.pdf. Acessado em: 28 nov. 2014.

PARRÓN, T.; REQUENA, M.; HERNÁNDEZ, A, F.; ALARCÓN, R. Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 256, p. 379-385, 2011.

PASCHOAL, A. Biocidas – morte a curto e a longo prazo. **Revista Brasileira de Tecnologia**, v. 14, p. 17-27 1983.

PASSOS, C. T. **Estudo da biodegradação do fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus sp.*** Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Fundação Universidade Federal do Rio Grande – FUR. Porto Alegre, RS, 2006.

PARTOAZAR, M.; HOODAJI, M.; TAHMOURESPOUR. The effect of glyphosate application on soil microbial activities in agricultural land. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 19419-19424, 2011.

PEÑA, C. Q.; SHAMUN, V. M.; LUCANA, C. C.; MIRANDA, M. C.; GIMÉNEZ, A. T. Aislamiento, Identificación y Perfil Biológico de especies fúngicas. **BIOFARBO**, v. 6, p. 17-23, 1998.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. Saúde e ambiente em sua relação com o consumo de

agrotóxicos em um pólo agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, 2007.

PELCZAR, M. J. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia; conceitos e aplicações**. 2. ed., São Paulo: Pearson Makron Books, 1997.

PHAM, C. H.; MIN, J.; GU, B. Pesticide Induced Toxicity and Stress Response in Bacterial Cells. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 72, p. 380–86, 2004.

PICCOLO, A.; CELANO, G.; CONTE, P. Adsorption of glyphosate by humic substances. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2442-2446, 1996.

PICCOLO, A.; CELANO, G.; Hydrogen bonding interactions between the herbicide glyphosate and water-soluble humic substances. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 13, p. 1737-1741, 1994.

PIPKE, 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, p. 2868–2870, 1987.

PIRES, D. X.; CALDAS, E. D.; RECENA, M. C. P. Uso de agrotóxicos e suicídios no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, p. 598-605, 2005.

POLLEGIONI, L.; SCHONBRUNN, E.; SIEHL, D. Molecular basis of glyphosate resistance – different approaches through protein engineering. **FEBS Journal**, v. 278, p. 2753-2766, 2011.

PRATA, F.; LAVORENTI, A.; REGITANO, J. B.; TORNISIELO, V. L. Influência da matéria orgânica na sorção e dessorção do glifosato em solos com diferentes atributos mineralógico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 947-951, 2000.

PROCÓPIO, S. O.; SANTOS, J. B.; SILVA, A. A.; PIRES, F. R.; RIBEIRO, J. I. J.; SANTOS, E. A. Potencial de espécies vegetais para a remediação do herbicida Trifloxysulfuron-Sodium. **Planta Daninha**, v. 23, p. 9-16, 2005.

RATCLIFF A. W., BUSSE M. D., SHESTAK C. J. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. **Applied Soil Ecology**, v. 34, p. 114–124, 2006.

REMY, J. C.; MARIN-LAFLECHE, A. L'Entretien organique des terres, Cout d'une politique de l'humus, **Entreprises Agricoles**, v. 4, p. 63-67, 1976.

RIBAS P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos pesticidas: impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, v. 10, p. 149-158, 2009.

RICHARD J. Y., VOGEL T. M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 44, p. 93-100, 1999.

RIDDELL, R. W. Permanent Stained Mycological Preparations Obtained by Slide Culture. **Mycologia**, v. 42, p. 265–270, 1950.

ROBERTS, T. R. **Metabolic pathways of agrochemicals-part 1: herbicides and plant growth regulators**. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 1998. p. 396-399.

RODRIGUES, L. **Estudo de Agrotóxicos Usados em Agricultura Através da Técnica de Difração de Raios X**. 75p. Dissertação (Engenharia Nuclear). Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, 2012.

ROMEIRO, R. A.; Perspectivas para Políticas Agroambientais, Dimensões do agronegócio brasileiro: políticas, instituições e perspectivas. In: RAMOS, P.; BUAINAIN A. M.; BELIK, W.; REYDON B. P., GUEDES, S. N. R.; HOFFMANN R.; SILVA, J. G.; TAKAGI, M.; ROMEIRO, A. R.; SILVEIRA, J. M. F. J.; BORGES, I. C.; FONSECA, M. G. **Dimensões do agronegócio brasileiro políticas, instituições e perspectivas**. Brasília: MDA, 2007. p. 282-317.

ROSLYCKY, E. B. Glyphosate and the response of the soil microbiota. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 14, p. 87–92, 1982.

ROUSH, R. T.; TABASHNIK, B. E. **Pesticide resistance in arthropods**. London: Chapman and Hall, 1990. 303 p.

RUEPPEL, M. L.; BRIGHTWELL, Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, p. 517-528, 1977.

SAAB, A. A.; PAULA, R. A. O mercado de fertilizantes no Brasil Diagnósticos e propostas de políticas. **Revista de Política Agrícola**, v. 7, p. 7–24, 2008.

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

SANCHO, J. V.; HIDALGO, C.; HERNANDEZ, F. Rapid determination of glyphosate residues and its main metabolite AMPA in soil samples by liquid chromatography. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 62, p. 53-63, 1996.

SHMIDELL, W.; BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Blucher, 2001. 541 p.

SILVA, M. D.; PERALBA, M. C. R.; MATTOS, M. L. T. Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do Arroio Passo do Pilão. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 19-28, 2003.

SILVA, M. B.; RONDON, J. N.; Utilização de bambu na biorremediação de solo contaminado. **Revista. Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 10, p. 2175–2184, 2013.

SOUZA, A. P. **Atividade de oxyfluorfen, 2,4-D e glifosate, em solos de diferentes texturas na presença e na ausência de composto orgânico**. 71 f. Dissertação (Mestrado

em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 1994.

SPADOTTO, C. A. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29 p.

SPRANKLE, P.; MEGGITT, W. F.; PENNER, D. Absorption, action, and translocation of glyphosate. **Weed Science**, v. 23, p. 235 – 240, 1975.

STULKE, J.; HILLEN, W. Carbon catabolite repression in bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 195–201, 1999.

TADEO, J. L.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; PÉREZ, R. A.; FERNÁNDEZ, M. D. Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables. **Journal of Chromatography**, v. 882, p. 175-191, 2000.

TAROUCO, C. P. **Cinética e Fisiologia da biodegradação de glifosato por bactérias isoladas de solos expostos a este herbicida**. 80 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre - RS, 2009.

THASSITOU, P. K.; ARVANITOYANNIS, I. S. Bioremediation: a novel approach to food waste management. **Trends in Food Science and Technology**, v. 12, p. 185-196, 2001.

TOMLIN, C. D. S. **The Pesticide Manual: A World Compendium**. 14. ed. Hampshire, UK: British Crop Protection Council, 2006. p. 545-548.

TONI, L. R. M.; SANTANA, H.; ZAIA, D. A. M. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. **Química Nova**, v. 29, p. 829-833, 2006.

TRAVAGLIA, C.; MASCIARELLI, O.; FORTUNA, J.; MARCHETTI, P. C.; LUCERO, M.; ZORZA, E.; LUNA, V.; REINOSO, H. Towards sustainable maize production: Glyphosate detoxification by *Azospirillum* sp. and *Pseudomonas* sp. **Crop Protection**, v. 77, p. 102–109, 2015.

TRINDADE, P. V. O.; SOBRAL, L. G.; RIZZO, A. C. L.; LEITE, S. G. F.; SORIANO, A. U. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. **Chemosphere**, v. 58, p. 515 – 522, 2005.

VEIGA, M. M., SILVA, D. M., VEIGA, L. B. E., FARIA, M. V. C. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, p. 2391-2399, 2006.

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

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

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

WILLIAMS, G. M.; KROES, R.; MUNRO I. C. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans, Regulatory. **Toxicology and Pharmacology**, v. 31, p. 117–165, 2000.

YAMASHITA, M. G. N. **Análise de rótulos e bulas de agrotóxicos segundo dados exigidos pela legislação federal de agrotóxicos e afins e de acordo com parâmetros de legibilidade tipográfica**. 108p. Dissertação (Mestrado em Desenho Industrial). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Arquitetura, Artes e Comunicação. Bauru – SP, 2008.

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.

ANEXOS

Curva padrão da concentração de DCPIP em g/L.

