

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**Avaliação do Impacto do Herbicida Glifosato  
na Microbiota do Solo e Biodegradação por  
Cepas de *Fusarium***

**João Vieira de Castro Júnior  
BIÓLOGO/UFRPE**

**Porto Alegre  
Março/2006**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**Avaliação do Impacto do Herbicida Glifosato  
na Microbiota do Solo e Biodegradação por  
Cepas de *Fusarium***

João Vieira de Castro Júnior

Dissertação de Mestrado apresentada como Requisito parcial para  
obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

**Porto Alegre  
Março/2006**

## AGRADECIMENTOS

- Enfim, quero agradecer a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para realização deste trabalho.
- A Deus por me permitir seguir em frente com meu caminho e terminar meu curso.
- Aos meus pais, que possibilitaram a minha existência e minha vinda a Porto Alegre (cidade que me recebeu de braços abertos), aos meus familiares que apesar de estarem tão longe tenho certeza que estão torcendo por mim.
- Quero agradecer especialmente ao Prof. Marco Ayub, pela grande ajuda e paciência, principalmente no início do curso e por todos os conselhos e orientações que me ajudaram a realizar este trabalho
- Um agradecimento todo especial a Profa. Maria do Carmo R. Peralba, do Laboratório de Química Ambiental, por toda paciência e atenção dada a mim.
- Ao Prof. Pedro Alberto Selbach e a todos do Departamento de Ciência do Solo que me ajudaram a compreender um pouco mais a respeito deste complexo e fascinante mundo da microbiologia do solo.
- A todos os amigos que eu fiz no Laboratório de Biotecnologia por todos os conselhos e ensinamentos que eu aprendi.
- As grandes amigadas que eu fiz no Laboratório de Química Ambiental pela paciência em me ensinar a usar todos aqueles equipamentos.

- A todos os professores que auxiliaram na minha formação, me dando condições de ampliar meus horizontes e descobrir o maravilhoso mundo da microbiologia.
- A todos meus colegas de classe que apesar de todos os momentos difíceis conseguimos supera-los e estamos aqui encerrando mais uma etapa da vida e nos preparando para uma outra nova.
- E é claro a minha Déia, que estava do meu lado a toda hora me incentivando sempre apesar de todos os aborrecimentos que às vezes eu trazia para casa.
- A todos aqueles que apesar de não participarem diretamente do trabalho são essenciais as nossas vidas (funcionários da instituição).
- A Capes pelo apoio financeiro.

## AValiação DO IMPACTO DO HERBICIDA GLIFOSATO NA MICROBIOTA DO SOLO E BIODEGRADAÇÃO POR CEPAS DE *Fusarium*

Autor: João Vieira de Castro Júnior

Orientador: Prof Dr Marco Antonio Zachia Ayub

### RESUMO

Investigou-se o impacto e a biodegradação do glifosato pela microbiota do solo. O solo utilizado foi (Argissolo vermelho distrofico arênico) coletado a 30 e 60 cm de profundidade onde foi quantificado a taxa de CO<sub>2</sub> produzido e as UFC de bactérias e fungos . Foram utilizadas 5 cepas de fungos filamentosos pertencentes do gênero *Fusarium* crescidos em meio de cultura Czapeck com adição de glifosato, no qual foram testadas: a utilização como substrato, a concentração máxima inibitória e a biodegradação em agitador e em biorreator. Foi observado que a introdução do herbicida no solo não apresentou efeito negativo sobre a microbiota e que a população de bactérias cultiváveis foi mais numerosa que a de fungos. Dentre as cepas testadas nenhuma foi inibida pela presença do glifosato, mesmo a altas concentrações. Todas as cepas estudadas foram capazes de biodegradá-lo e utilizá-lo como fonte de nutriente. A formação de consórcio não apresentou maior eficiência na metabolização do composto quando comparado as culturas crescidas puras, sendo a biodegradação em biorreator mais eficiente que aquela realizada em agitador horizontal.

# IMPACT EVALUATION OF HERBICIDE GLYPHOSATE ON SOIL MICROBIOTA AND BIODEGRADATION BY **FUSARIUM** STRAINS

Author: João Vieira de Castro Júnior

Advisor: Prof Dr Marco Antonio Zachia Ayub

## **ABSTRACT**

It was investigated the effect and biodegradation caused by glyphosate herbicide on soil microbiota. The soil was collected at 30 cm and 60 cm depth, which it was quantified the CO<sub>2</sub> rate and CFU of bacterias and fungi. 5 strains of filamentous fungi belonging to *Fusarium* genre were growth on Czapeck medium with addition of glyphosate. The assays were conduced to determinate the hability of use as substrate, the inhibitory concentration and the biodegradation in shaker and bioreactor by *Fusarium* strains. It was observed that the herbicide did not show no negative effect on microbiota and population of bacteria were higher than fungi. Among the strains tested no inhibition was noted by addition of glyphosate even at high concentration. All strains studied were able to biodegrade it and use the herbicide as a nutrient source. The formation of consortium was not better than the strains in pure culture. The biodegradation in bioreactor was better than shaker.

## SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
SUMÁRIO	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 Pesticidas	5
2.1.1 Histórico	5
2.1.2 Conceito	6
2.1.3 Destino no Ambiente	7
2.1.4 Impacto Ambiental	9
2.1.5 Regulamentação, Legislação e Limites	10
2.2 Organofosforados	12
2.3 Glifosato	15
2.3.1 Propriedades, Comportamento no Ambiente e Modo de Ação	15
2.4 Resposta de Microbiota	17
2.5 Toxicidade	20
2.5.1 Em Água	20
2.5.2 Aguda	21
2.5.3 Crônica	21
2.5.4 Exposição Humana	22
2.6 Biodegradação do glifosato	23
2.7 Métodos para Análise	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Solo	28
3.2 Herbicida utilizado	30
3.3 Avaliação do Impacto do Glifosato Pela Liberação do CO <sub>2</sub>	30
3.4 Quantificação de Microrganismos do Solo por Diluição Sucessiva em Placas de Petri	32
3.5 Seleção das condições de cultivo	33
3.5.1 Microrganismos utilizados	33
3.5.2 Inóculo	34
3.5.3 Condições de cultivo	35
3.6 Determinação da biomassa por peso seco	35
3.7 Utilização do glifosato como substrato	36
3.8 Determinação da concentração máxima inibitória	37
3.9 Biodegradação do glifosato	37
3.9.1 Em agitador horizontal	37
3.9.2 Em biorreator	38
3.10 Análise cromatográfica	39
3.10.1 Equipamento utilizado	39
3.10.2 Sistema de reação Pós-coluna	39

3.10.3	Análise do glifosato	40
3.10.4	Processo de clean-up da resina chelex	40
3.10.5	Processo de clean-up da resina aniônica	41
3.10.6	Concentração das amostras	41
3.11	Análises estatística	41
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1	Avaliação do impacto do glifosato pela evolução de CO <sub>2</sub>	42
4.2	Quantificação da microbiota do solo	48
4.3	Utilização do glifosato como substrato	52
4.4	Determinação da concentração máxima inibitória	54
4.5	Biodegradação do glifosato	56
4.5.1	em incubadora horizontal	56
4.5.2	em biorreator	59
4.6	Análises cromatográficas	63
5	CONCLUSÕES	64
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
7.	ANEXOS Tratamentos estatísticos dos dados experimentais	71
	RELAÇÃO DE TABELAS	ix
	RELAÇÃO DE FIGURAS	x



## RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1: Características físico-químicas do solo (Argissolo Vermelho Distrófico Arênico).....	29
Tabela 2: Compostos utilizados no experimento de liberação de CO <sub>2</sub> .....	30
Tabela 3: Quantidade de CO <sub>2</sub> acumulado no diferentes tratamentos (g.kg <sup>-1</sup> )...44	
Tabela 4: Quantidade de CO <sub>2</sub> acumulado nos solo a 30 e 60 cm (g.kg <sup>-1</sup> ).....47	
Tabela 5: Quantificação da população de bactérias do solo a 30 e 60 cm.....49	
Tabela 6: Quantificação da população de fungos do solo a 30 e 60 cm.....50	
Tabela 7: Quantificação da massa celular seca nos diferentes substratos testados (g.l <sup>-1</sup> ).....	52

## RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1: Formula estrutural do DDT.....	5
Figura 2: Destino dos pesticidas no meio ambiente.....	8
Figura 3: Modo de ação das liases C-P.....	13
Figura 4: Formula estrutural do glifosato.....	15
Figura 5: Evolução do CO <sub>2</sub> no solo com adição de diferentes compostos: testemunha (■), tratamento mineral (●), Herbicida GOAL(▲), glifosato (▼), lodo Estação de Tratamento de Efluentes (◆), estercode galinha (◀) e aparas de couro (▶).....	43
Figura 6: Evolução do CO <sub>2</sub> nas amostras de solo a 30 e 60 cm testemunha 30 (■), puro 30 (●), comercial 30 (▲), testemunha 60 (◆), puro 60 (◀), comercial 60 (▶).....	46
Figura 7: Biomassa seca das cepas crescidas a diferentes concentrações de glifosato após 5 dias.....	54
Figura 8: Biodegradação do glifosato em agitador horizontal pelas cepas 91148 (■), 55.1 (●), consórcio (▲) e controle (▼).....	56
Figura 9: Percentual de redução do glifosato entre as diferentes cepas após 10 e 20 dias.....	58
Figura 10: Biodegradação do glifosato em cultura pura e consórcio em biorreator a diferentes condições de aeração no tempo 0 e após 5 dias A-300rpm 2vvm, B-600rpm 4vvm.....	60
Figura 11: Biomassa seca das cepas crescidas em biorreatora diferentes condições de aeração no 2 <sup>o</sup> e 5 <sup>o</sup> dia A-300rpm 2vvm, B-600rpm 4vvm.....	62
Figura 12: Curva padrão do glifosato.....	63

## 1. INTRODUÇÃO

Devido ao aumento exagerado da população e ao rápido desenvolvimento das indústrias, a presença de substâncias não naturais encontradas no planeta tornou-se um grande problema. Em função dessa grande demanda e uso intenso de produtos químicos e xenobióticos, atualmente existe a formação de grandes quantidades de resíduos e nos últimos anos tem havido uma maior preocupação em conhecer o comportamento e destino desses materiais no meio ambiente.

Dentre estes produtos podemos citar os herbicidas que atualmente estão entre os mais comercializados no mundo, devido a necessidade de controle das ervas daninhas.

O glifosato é um pesticida da classe dos herbicidas que apresenta elevada eficiência na eliminação de ervas daninhas. Ele é não-seletivo, sistêmico, pós-emergente e representa atualmente 60% do mercado mundial, contabilizando um total de US\$ 1,2 bilhão/ano com a venda do produto (Amarante & Santos, 2002a).

No Brasil cada vez mais o uso de agrotóxicos torna-se freqüente, onde a média calculada em 1970 era de 0,8 kg de ingrediente ativo por hectare, passando a 1,2 kg em 1991, sendo os estados de São Paulo e Paraná os destaques em consumo com médias entre 6,8 kg/ha e 4,2 kg/ha respectivamente (Castro, 2003).

Os efeitos adversos decorrentes da introdução dessas substâncias no meio ambiente podem ocorrer na comunidade biótica, ocasionando desequilíbrios bioquímicos, tais como decomposição da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes.

As alterações que ocorrem no meio afetam as populações microbianas e o seu desenvolvimento e são definidas como fatores de natureza biótica e abiótica (Alexander, 1977).

A ação dos microrganismos sobre materiais estranhos ao meio constitui-se num mecanismo de suma importância, pois a degradação microbiana, na maioria dos casos, contribui para a dissipação da molécula presente no ambiente.

A atividade microbiana é reconhecida como o principal fator que determina a taxa e a extensão em que os xenobióticos são degradados no ambiente. Além disso, a taxa de degradação é influenciada pela biomassa microbiana ativa e disponibilidade do composto para a degradação.(Beigel & Channy, 1999).

Os microrganismos, principalmente bactérias e fungos, têm sido descritos como os principais degradadores de matéria orgânica presente no solo e água, e a introdução de compostos químicos nestes ambientes acabam

servindo como nutrientes, principalmente carbono, nitrogênio e fósforo (Monteiro, 2001).

Os microrganismos exibem estratégias para assimilação ou metabolismo do substrato que são o catabolismo e o cometabolismo. No catabolismo, o substrato absorvido é quebrado em moléculas menores e vão gerar energia, conseqüentemente, a biomassa microbiana aumenta as custas do substrato, e este é diminuído. Por outro lado, no cometabolismo ocorre a transformação de um substrato, entretanto, o crescimento microbiano exige a presença de um substrato secundário biodegradável como fonte de carbono e energia, desta forma transformam o composto sem dele retirar energia para seu desenvolvimento (Alexander, 1977).

A mineralização (degradação completa) é influenciada pelas propriedades quantitativas e qualitativas tanto de microbiota como do tipo e condições do meio, que provêem uma maior ou menor taxa de degradação, além de maior ou menor disponibilidade do composto para os microrganismos atacarem.

Muitos autores têm relatado que a inclusão desses compostos no ambiente aumentam a população microbiana e estimulam a mineralização e disponibilidade de carbono, nitrogênio e fósforo.

A adaptação da população microbiana a uma variedade de compostos químicos no ambiente, bem como os fenômenos de degradação podem ser explicados pela adaptação de um componente específico da comunidade microbiana, o que resulta numa atividade competitiva e subseqüente proliferação desta população, sendo este fenômeno explicado

pelo resultado da interação entre substâncias químicas, microrganismos e condições ambientais (Somasundaram, 1990).

As condições físicas, químicas e biológicas do ambiente, além das variáveis climáticas e características do composto, podem favorecer sua maior ou menor persistência (recalcitrância). Os solos tropicais possuem uma microbiota mais ativa que favorece uma degradação mais rápida do composto, diminuindo assim sua meia-vida no ambiente, podendo variar grandemente de acordo com a adaptação dos microrganismos ao composto e por possuírem enzimas para metabolizá-lo.

Este trabalho teve por objetivo analisar o impacto decorrente da adição de glifosato a microbiota através da evolução de CO<sub>2</sub> e da biomassa, verificar a capacidade das cepas de *Fusarium* em biodegradar o herbicida, estudar a influência da variação de oxigênio na biodegradação e observar formação de produtos intermediários (AMPA) durante a degradação.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Pesticidas

#### 2.1.1 Histórico

Entre 1936 e 1937, os primeiros inseticidas de uso corrente na agricultura no Brasil foram os compostos inorgânicos e os produtos de origem vegetal. Entre os compostos inorgânicos eram utilizados o arsênico branco, de cálcio, de chumbo, a calda bordalesa e o Verde Paris. Nos produtos de origem vegetal destacavam-se as soluções de nicotina, o piretro e a rotenona (Larini, 1999).

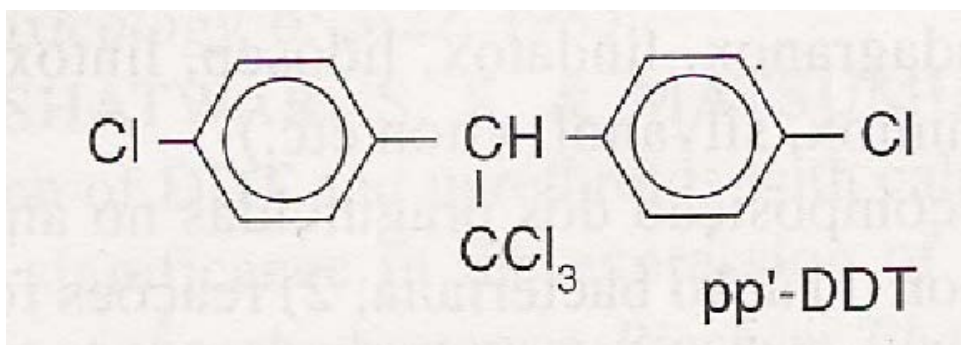


Figura 1: Fórmula estrutural do DDT (Larini, 1999).

O primeiro composto orgânico a ser utilizado na agricultura brasileira foi o DDT, introduzido em 1943 com a denominação de Gesarol (Figura 1). As primeiras amostras deste composto foram recebidas pelo Instituto Biológico de São Paulo.

Pelo notável poder residual, o DDT foi amplamente divulgado e extensivamente utilizado como inseticida e carrapaticida em bovinos. Mais tarde esta mesma eficácia, propalada na época, foi responsável pela restrição do seu emprego apenas aos programas de controle de malária em áreas endêmicas e pela proibição de uso em diversos países.

A utilização de pesticidas em todo território brasileiro teve um aumento considerável depois do grande conflito bélico. A partir deste evento, as vendas de pesticidas aumentaram de US\$ 830 milhões no ano 1986 para US\$ 1.790 milhão em 1996. Ao longo deste período observou-se uma alteração na distribuição da venda por classe de produtos: 27,9% e 20,9% para os inseticidas em 1986 e 1996 respectivamente; 44,1% e 56,1% para os herbicidas; 22,2% e 15,4% para os fungicidas e 5,8% e 5,2% para os acaricidas. O Estado de São Paulo em 1996 ocupava a primeira posição nas vendas destes produtos, seguindo-se do Paraná, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Mato Grosso (Larini, 1999).

### **2.1.2 Conceito**

O termo pesticida literalmente tem o significado de produto com capacidade de destruir pragas, são substâncias que podem matar diretamente um organismo indesejável ou controlá-lo de alguma maneira. Por sua vez, o



termo praga aplica-se aos organismos animais ou vegetais, capazes de reduzir a quantidade ou prejudicar a qualidade dos alimentos, das sementes, forragem, plantas ornamentais, nocivas e madeiras, durante o plantio, produção, colheita, processamento, armazenamento, transporte e uso, ou que podem transmitir doenças ao homem e animais. O termo aplica-se também aos organismos vivos que prejudicam e perturbam a qualidade de vida do homem, ou, ainda, que danificam propriedades e objetos de uso pessoal (Arzocco, 2000).

Os pesticidas são compostos químicos especialmente empregados pelo homem para destruir, repelir ou mitigar pragas (insetos, ácaros, nematódeos, roedores, etc). Têm também função preventiva, e podem ser classificados correlacionando o organismo vivo envolvido no emprego com a sua estrutura química. Podendo ser classificados em acaricida, algicida, avicida, bactericida, desinfetante, fungicida, herbicida, inseticida, larvicida, moluscicida, nematicida, piscicida e raticida (Larini, 1999).

### **2.1.3 Destino no Ambiente**

Uma vez no solo, o pesticida pode ter diferentes destinos: ser adsorvido a partículas do solo, permanecer dissolvido na água presente no solo, volatilizar-se, ser absorvido pelas raízes das plantas ou por organismos vivos, ser percolado ou carregado pela água das chuvas ou sofrer decomposição química ou biológica (Figura 2). A mobilização do pesticida a partir do solo poderá ocorrer pelo carregamento pelas águas das chuvas, por erosão, lixiviação ou volatilização (Dores & De-Lamonica Freire, 1999).

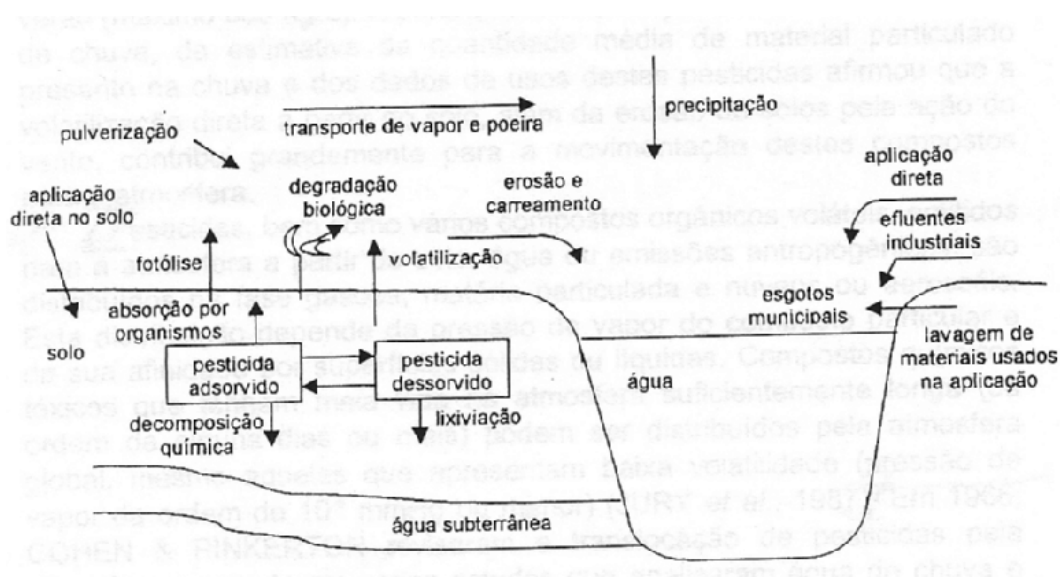


Figura 2: Destino dos pesticidas no meio ambiente (Dores & De-Lamonica Freire, 1999).

O carreamento superficial pode ocorrer com o pesticida dissolvido na água, associado ao material em suspensão na água ou ambos. O movimento superficial da água começa quando a intensidade da chuva excede a taxa de infiltração. Apesar da porcentagem de pesticida aplicado no campo que é perdida por carreamento ser pequena, esta representa provavelmente a rota principal pela qual pesticida agrícola atinge rios ou lagos.

A movimentação do pesticida do solo para a atmosfera, que pode ocorrer por volatilização direta, co-vaporização com a água e associação ao material particulado carregado pelo vento, é também importante para a distribuição destes produtos no ambiente e sua entrada nos ambientes aquáticos. Os pesticidas na atmosfera podem retornar ao ambiente aquático por deposição de poeira, ou precipitação, o que em geral ocorre em local distante do ponto de emissão. O transporte de pesticidas na atmosfera é

considerável e pode ser uma das principais formas pelas quais esses produtos podem atingir oceanos, rios ou lagos.

Pesticidas, bem como vários compostos orgânicos voláteis, emitidos para atmosfera a partir do solo, água ou emissões antropogênicas são distribuídos na fase gasosa, matéria particulada e nuvens ou aerossóis. Esta distribuição depende da pressão de vapor do composto particular e de sua afinidade por superfícies sólidas ou líquidas. Compostos químicos tóxicos que tenham meia vida na atmosfera suficientemente longa (da ordem de dias ou mais) podem ser distribuídos pela atmosfera global, mesmo aqueles que apresentam baixa volatilidade (Dores & De-lamonica Freire, 1999).

#### **2.1.4 Impacto Ambiental**

. Os métodos de avaliação de impactos são instrumentos utilizados para coletar, analisar, avaliar, comparar e organizar informações qualitativas e quantitativas sobre os impactos originados de uma determinada atividade modificadora do meio ambiente

Assim a avaliação de impactos pode ocorrer em dois momentos: antes da ação potencialmente impactante – avaliação “ex ante”, e depois dela – “ex post”. A avaliação “ex ante” para pesticidas é feita, por exemplo, a partir do processo de registro de um novo produto, enquanto a avaliação “ex post” pode ser feita depois de seu uso. A avaliação “ex ante” para fins de registro de pesticidas vem sendo discutida e conduzida há anos e está agora sendo revisada com enfoque em análise de risco ambiental (Spadotto, 2002).

O uso de pesticidas pode causar impacto direto e indireto; locais, regionais e/ou globais; imediatos, de médio ou longo prazo; temporários, cíclicos ou permanentes; reversíveis ou irreversíveis. Em áreas agrícolas, os impactos podem ainda ser de fonte difusa, causada pela contaminação proveniente da aplicação regular, ou pontual, quando ocorre descarga (acidental ou não) durante o transporte e manuseio dos pesticidas. Os impactos podem ocorrer nos meios: físico-químico (abiótico), biótico e socioeconômico, portanto a avaliação de impactos ambientais deve contemplar, sempre que possível, os aspectos ecológicos, sociais e econômicos mantendo estreita relação com o conceito de sustentabilidade agrícola (Spadotto, 2002).

Os impactos provocados pelo uso de pesticidas podem ainda ser intrínsecos e extrínsecos. Como exemplo de impacto intrínseco negativo de pesticidas pode ser citado o problema de residual prolongado no solo comprometendo a sucessão de culturas agrícolas. Quanto ao impacto extrínseco, pode ser citado como exemplo, a contaminação de águas superficiais e subterrâneas usadas para abastecimento de populações urbanas.

### **2.1.5 Regulamentação, Legislação e Limites**

O registro de novo composto com propriedades pesticidas é cada vez mais complexo, exigindo controles ambientais e toxicológicos crescentemente mais rigorosos, a fim de minimizar a presença de seus resíduos e sua ação nociva contra a saúde humana e ao ecossistema em

geral. Neste sentido, podem-se destacar os poucos meses de investigação que eram exigidos para o registro de pesticidas em 1950, frente ao período de cerca de 10 anos imprescindíveis para que se possa concluir todos os ensaios de toxicidade e persistência que a “Environmental Protection Agency (EPA)” exige na atualidade. Assim sendo, a introdução de novos compostos mais seguros e eficazes no mercado é muito lenta e onerosa. Por outro lado, os compostos que causam preocupação internacional por motivos relacionados à proteção do ser humano e do ambiente são proibidos ou severamente restringidos, tanto na sua comercialização quanto aplicação. Destacando diversos pesticidas clorados como o Aldrin, Dieldrin, DDT, Endrin, Heptacloro, etc (Nunes & Ribiero, 1999).

A regulamentação quanto ao uso dos produtos está baseada no estabelecimento de nível de referência, que corresponde à quantidade máxima de resíduo de determinado pesticida que pode ser aceito em cada alimento, quando destinado ao consumo humano, permitindo preservar a saúde do consumidor da ação tóxica destes compostos.

No Brasil, a fixação dos valores de referência é feita pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento, mediante portarias que são publicadas em Diário Oficial. Tais portarias estabelecem os valores de limite de resíduos máximo, as culturas para os quais o princípio ativo é liberado, as formas de aplicação e o tempo de carência, isto é, o tempo estabelecido entre a aplicação do produto e a colheita do alimento.

Convém salientar que cada Governo Estadual conta com seu próprio mecanismo de controle e vigilância, mediante sua Secretária Municipal, o que

dificulta, de certa forma, a regulamentação e a fiscalização a nível nacional. Indubitavelmente, a legislação vigente necessita ser revista com certa urgência, a fim de estabelecer diretriz única para controle e vigilância de resíduos de pesticidas em alimentos e no ambiente (Nunes & Ribeiro, 1999).

## 2.2 Organofosforados

Organofosforados são compostos caracterizados por apresentarem um átomo de carbono ligado covalentemente a um átomo de fósforo, este tipo de composto xenobiótico está cada vez mais presente em produtos de limpeza, médicos, agrícolas e industriais (Krzýsko-Lupicka & Orlik, 1997). Anualmente, milhares de toneladas de fosforados sintéticos são introduzidos no ambiente, primariamente como aditivos de detergentes e agroquímicos. Por causa da estabilidade química das ligações C-P, a remoção destes fosforados no ambiente é muito baixa.

Organofosforados são conhecidos por serem ubíquos na natureza e em alguns ecossistemas eles compreendem a maior parte do fósforo disponível. Os fosforados são produzidos por uma variedade de organismos procariotos e eucariotos, podendo ser encontrados na forma de fosfolípedeos ou como grupos agregados a polissacarídeos e glicoproteínas. Também, uma ampla variedade de antibióticos fosforados são produzidos por microrganismos, principalmente pelo gênero *Streptomyces* (White & Metcalf, 2004).

O uso de organofosforado sintéticos é relativamente recente. Nos últimos 30-40 anos; relatos indicam que a Europa ocidental e os EUA, juntos, produzem em torno de vinte mil toneladas/ano (Ternan *et al*, 1998).

Pela ocorrência de fosforados na natureza, é comum que microrganismos possuam a capacidade de consumir estes compostos. Uma variedade de vias metabólicas que permitem fosforados específicos serem usados como fonte única de carbono ou fósforo têm sido elucidadas (Lee *et al.*, 1992). A mais estudada e conhecida destas vias envolve a enzima liase C-P, que permite a utilização de diversos fosforados como fonte única de fósforo (Kononova & Nesmeyanova, 2001). Acredita-se que esta enzima catalise a clivagem direta de ligações C-P para produzir alcano e fosfato (Figura 3).

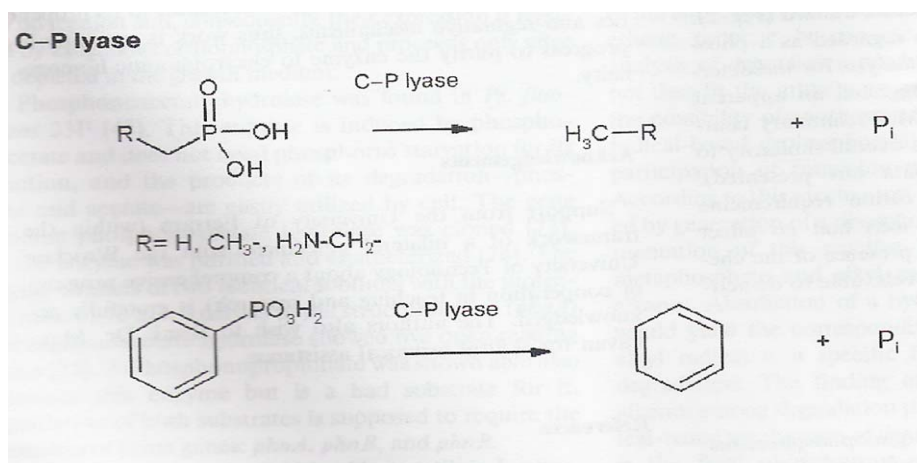


Figura 3. Modo de ação das liases C-P (Kononova & nesmeyanova, 2001)

Muitos estudos para observar a atividade de liases *in vivo* não tiveram sucesso. Contudo, estudos genéticos têm proporcionado evidências biológicas a respeito do mecanismo das enzimas. Pelo fato das liases C-P

manifestarem sua atividade apenas nas células, elas nunca foram realmente encontradas em extratos de células livres, impossibilitando o entendimento do mecanismo de ação da enzima, no entanto, muitos modelos hipotéticos têm sido propostos para explicar seu modo de ação (Kononova & Nesmeyanova, 2001).

Muitos trabalhos têm mostrado ampla ocorrência de microrganismos degradadores de fosforados na natureza, incluindo bactérias Gram-positivas e negativas. A habilidade de degradar fosforados pelo mecanismo de liases C-P ocorre muito mais geralmente entre as Gram-negativas que entre as Gram-positivas (Kononova & Nesmeyanova, 2001). Entretanto, existem muito poucos relatos de utilização como fonte de nutrientes de fosforados por leveduras.

Muitos trabalhos de investigação de metabolismo por microrganismos têm sido feitos quase que exclusivamente com bactérias, sendo poucos os trabalhos com fungos, exceto alguns gêneros como *Penicillium* e *Aspergillus niger* que utilizam um grande número de produtos fosforados e mesmo neste, nenhuma enzima que metabolise esses compostos foi isolada, sendo necessário mais estudos com fungos degradadores para total entendimento do papel dos microrganismos na biodegradação de fosforados, principalmente do glifosato. (Kim *et al*, 2005).

Krzýsko-Lupicka & Orlikl. (1997) observaram através do estudo que houve crescimento significativo em 26 linhagens testadas de fungos em meio contendo compostos com ligação C-P como fonte de fósforo, não sendo constatado nenhum crescimento em meio deficiente em carbono ou nitrogênio.



## 2.3. Glifosato

### 2.3.1 Propriedades, Comportamento no Ambiente e Modo de Ação.

O glifosato (N-fosfometilglicina) é um aminoácido branco, sem odor, cristalino, tem fórmula molecular  $C_3H_8NO_5P$  e peso molecular 169,1 g/mol (Figura 4).

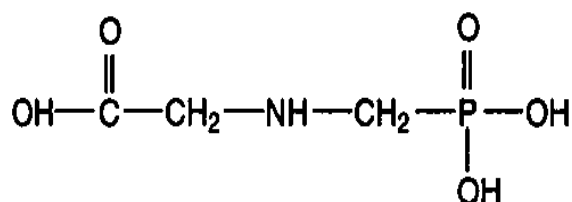


Figura 4. Fórmula estrutural do glifosato

A pressão de vapor a 45 °C é  $1,84 \times 10^{-7}$  mm Hg. O glifosato é facilmente diluído em meio aquoso, porém é muito pouco solúvel em ácidos orgânicos (como ácido trifluoroacético) e praticamente insolúvel em outros solventes orgânicos, fundindo-se a 200 °C, com estabilidade a altas temperaturas (60 °C) (Franz *et al.*, 1997).

A dissociação em função do pH é indicada pelo pKa: pK1= 0,8; pK2= 2,16; pK3= 5,46 e pK4= 10,14 (Amarante & Santos, 2002b).

O glifosato é geralmente formulado no herbicida como sal monoaniônico. As formulações são vendidas pela Monsanto com os seguintes

nomes: Roundup, Rodeo, Landmaster, Pondmaster, Ranger, etc. A formulação apresentada pelo Roundup contém 41% do glifosato (princípio ativo) na forma salina e o restante surfactante (Franz *et al*, 1997).

Pelo fato do produto apresentar baixa pressão de vapor a sua volatilização no ambiente é quase inexistente, porém pode ocorrer translocação a outras áreas através da pulverização incorreta, sendo levado pelo vento causando prejuízo a plantas desejáveis.

Experimentos conduzidos pela agência de proteção ambiental americana (EPA) atestaram que o glifosato é estável na água a pH 3, 5, 6 e 9 (35<sup>0</sup>C), sendo também estável a fotodegradação por luz natural a pH 5, 7 e 9. Schuette (1998), relata que o xenobiótico apresenta pequena propensão à decomposição hidrolítica e que a taxa de degradação é mais lenta na água.

No solo o herbicida está geralmente ligado às partículas por adsorção, sendo este produto adsorvido rapidamente e fortemente após a primeira hora de aplicação. O glifosato tende a se manter inativo em contato com o solo, desde que ele esteja na sua forma adsorvida. O composto livre no solo é degradado rapidamente, enquanto que na forma adsorvida tem a sua degradação desacelerada, ou muitas vezes não apresenta sinais de degradação, podendo permanecer no solo por vários anos (Castro, 2003).

O glifosato atua pela inibição da ação da enzima chamada 5-enol-piruvilshiquimato-3 fosfato sintase (EPSPS), localizada no cloroplasto e responsável por um dos passos da via metabólica do ácido shiquímico (Franz *et al*, 1997). O herbicida é translocado rapidamente através das plantas devido a sua mobilidade pelo floema. Ele é absorvido principalmente pela folhagem,

mas dependendo do tipo de solo e das condições pode ocorrer absorção pelas raízes.

## **2.4 Resposta da Microbiota**

A presença do glifosato no solo pode causar mudanças na população microbiana. Segundo Araújo *et al.*, (2003), o glifosato ao ser adicionado ao solo aumentou temporariamente o número de bactérias e a atividade microbiana, e que em ambientes com histórico de aplicação do produto a degradação é mais acelerada comparado a um solo sem histórico de aplicação.

Atualmente, pela adição cada vez maior de compostos tóxicos ao ambiente está aumentando a preocupação com os possíveis efeitos danosos destes produtos na população microbiana e até mesmo com relação à fertilidade do solo.

A cada dia nota-se que a eficiência de alguns pesticidas aplicados em solos após vários anos têm diminuído, provavelmente devido à adaptação dos microrganismos a estes produtos, levando a rápida degradação logo após a aplicação.

Nicholson & Hirsch (1998), investigaram os efeitos causados por pesticidas em populações de bactéria isoladas de solos muito impactados, e concluíram após testes genotípicos, fenotípicos e de atividade que a composição das populações microbianas torna-se diferente quando se compara um solo impactado a um sem histórico de impactação.

As enzimas contribuem na atividade biológica do seres vivos e sua eficiência pode ser fortemente influenciada pelo uso de pesticidas que são componentes estranhos ao meio. Sanino & Gianfreda (2001), estudaram o efeito do glifosato na atividade de três enzimas (invertase, urease e fosfatase) e observaram que em todas elas houve influencia na atividade. Dependendo do tipo de solo em que a enzima se encontrava, pôde-se observar que não houve inativação ou houve um decréscimo de até 43% na sua atividade, provavelmente pela presença do grupamento fosfato da molécula que age como inibidor competitivo.

Quando herbicidas são adicionados ao ambiente estes podem exercer influencia positiva ou negativa em organismos não alvo, tais como os fungos. A introdução de xenobióticos pode interferir com o crescimento e atividade destes organismos podendo levar a alterações na ciclagem de nutrientes do solo, fluxo de energia e todos os processos envolvendo fungos.

Vários métodos têm sido utilizados para avaliar a resposta fúngica a herbicidas, porém esses métodos são utilizados na maioria das vezes em cultura pura, não sendo, contudo, os mesmos resultados obtidos quando os experimentos são realizados em campo.

Através dos estudos realizados por Wardle & Parkinson (1992), para investigar a influência do glifosato em diferentes concentrações na comunidade fúngica do solo, percebeu-se que o glifosato afetou o modo como os fungos interagem entre si, especialmente em altas concentrações ( $>0,2\text{mg.g}^{-1}$  solo), alterando a produção de substâncias fungistáticas ou a sensibilidade dos

indivíduos para com estas substâncias, ocorrendo a redução do antagonismo entre as espécies.

Carrillo e Honrubia (2003), demonstraram que o glifosato, bem como outros herbicidas (simazine e hexazinona) têm pouco ou nenhum efeito no crescimento fúngico e que a estimulação ou inibição depende da linhagem e da dose utilizada. Segundo eles, o herbicida estimulou o crescimento micelial em *Lactarius delicosus* pelo aumento da biomassa e do diâmetro da colônia a doses inferiores a  $1\text{mg g}^{-1}$ , doses maiores apresentaram efeito contrário, sendo observada significativa inibição. *Pisolithus tinctorius* não apresentou nenhum aumento na biomassa, sendo o glifosato depressor de seu crescimento a baixas doses.

Vários estudos têm sido conduzidos com microrganismos da rizosfera, especialmente com as micorrizas pelo importante papel no crescimento das plantas.

Estudos realizados com glifosato e terbutilazina mostraram que suas associações a fungos ectomicorrizícos podem ser benéficas, causando estimulação no crescimento de algumas espécies pertencentes ao gênero *Suillus*, quando comparado com outros herbicidas. Provavelmente esta estimulação do crescimento indique que esses microrganismos são capazes de degradar estes xenobióticos (Laatikainen e Tonski 2002).

## 2.5 Toxicidade

### 2.5.1 Em água

O glifosato raramente tem sido detectado em água potável, pela forte ligação com o solo e a rápida degradação. A concentração máxima já relatada pela literatura foi de  $45 \mu\text{g. l}^{-1}$  após aplicação de altas doses em solo próximo a uma estação de energia na Inglaterra. Apesar do fato não ter ocorrido em água potável, serve como exemplo para o possível comportamento do glifosato em água (Smith *et al*, 1996).

As águas superficiais podem ser tratadas diretamente com o herbicida para o controle de ervas aquáticas, o que pode causar a presença do produto na água de beber, mas acredita-se que os vários tratamentos de purificação como adição de cloro e ozônio venham a remover o composto da água (Smith *et al*, 1996).

Na água de beber é difícil considerar o limite acima do qual irá caracterizar exposição aguda ou crônica, pois cada região adota um limite específico. No Reino Unido pode-se considerar como risco de exposição aguda acima de  $1,7\mu\text{g.l}^{-1}$ , e como risco de exposição crônica  $0,1\mu\text{g.l}^{-1}$ , modelo este que é seguido pela União Européia. Baseados em cálculos realizados pela agência americana (US EPA) de acordo com o consumo diário de água por peso corporal a dose aguda seria  $0,36\mu\text{g. kg}$  de peso (adultos) e a dose crônica  $0,21\mu\text{g. kg}^{-1}$  (adultos). (Williams *et al*, 2000).

### **2.5.2 Aguda**

A toxicidade aguda do glifosato tem sido estudada em animais de laboratório, é constatado que os valores orais e dérmicos  $DL_{50}$  em ratos são maiores que  $5000\text{mg.kg}^{-1}$  de peso corporal em ratos, sendo classificados de acordo com US EPA como categoria IV (a menos tóxica). No entanto, este produto pode impedir a ação de funções enzimáticas nos animais, sendo comprovado através de estudos feitos em abdômen de ratos (Amarante & Santos, 2002a).

Apesar da baixa toxicidade, alguns dos componentes de seus produtos formulados apresentam-se mais tóxicos que o princípio ativo, sendo o surfactante utilizado tóxicos para peixes (Amarante & Santos, 2002b).

### **2.5.3 Crônica**

Embora a toxicidade aguda seja considerada baixa, alguns autores consideram que o herbicida possa causar sérios efeitos crônicos.

Ratos da espécie Sprague-Dawley foram alimentados por 26 meses com glifosato a concentrações 0, 60, 200 e 600 ppm não sendo observado nenhum efeito crônico, porém o índice de células tumorais nos machos alimentados com doses altas foi maior que o grupo controle (Lankas, 1981). Com tratamento estendido por dois anos aumentando as concentrações para 2.000, 8.000 e 20.000 ppm foi observada perda de peso entre as fêmeas, degeneração ocular nos machos, aumento do fígado, elevação do pH da urina

e a incidência de inflamação na mucosa gástrica das fêmeas (Stout & Ruecker, 1990)

Segundo estes estudos o herbicida pode causar defeitos graves em espécies animais, quando administrados em doses elevadas por períodos prolongados. Também o fato de ser não seletivo conduz a destruição de ambientes naturais e fontes de alimentos de alguns pássaros e anfíbios, levando a redução das populações (Amarante & Sanots, 2002a).

#### **2.5.4 Exposição humana**

Com relação à exposição ocupacional foi feita uma análise em trabalhadores para avaliar a exposição ao glifosato em curto prazo, após uma semana de uso não foi verificado problemas na pressão sanguínea, eletrocardiograma, função pulmonar ou batimentos cardíacos. Porém muito ainda está incerto sobre os efeitos do glifosato na população. Baseados nas informações de Pease *et al* (1993) produtos relacionados ao glifosato são a terceira causa mais comum de irritação na pele e nos olhos entre trabalhadores rurais. Contudo, ainda é limitado o número de estudos de caso de contaminação por exposição entre trabalhadores rurais.

Casos de ingestão acidental ou intencional têm sido relatados. A exposição acidental geralmente apresenta pequenos efeitos, nenhum caso de morte foi relatado até o momento. Contudo, ingestão intencional é responsável por um grande número de complicações, produzindo hipotensão, falência renal,



e em alguns casos a morte que pode ocorrer dentro de poucos dias da ingestão (Williams *et al.*, 2000).

## **2.6. Biodegradação do glifosato**

A degradação do glifosato no ambiente tem sido amplamente estudada. Sua rápida detoxificação no solo é resultado da ligação às partículas de sedimento e a degradação microbiana.

O principal produto de degradação no solo foi identificado como ácido aminometilfosfônico (AMPA), sugerindo que o primeiro passo no metabolismo do herbicida seja a clivagem da ligação C-N. O glifosato inicialmente forma AMPA e glioxilato que são processados pela via do glioxalato. A enzima responsável pela degradação inicial é uma oxidoreductase capaz de metabolizá-lo sob condições aeróbicas e anóxicas. Uma via alternativa para a degradação presente em microrganismos envolve o ataque inicial a ligações C-P produzindo fosfato inorgânico e um análogo de aminoácido a sarcosina (Ternan *et al.*, 1998).

A utilização microbiana do glifosato como fonte de fósforo tem sido bem estudada, porém poucos resultados têm sido apresentados quando este é utilizado na limitação de nitrogênio e carbono (Williams *et al.*, 2000 ). Em todos os experimentos descritos na literatura, os microrganismos foram capazes de metabolizar o produto apenas em limitação de fósforo, seja através da ação das liases C-P formando sarcosina, ou com a produção do AMPA (Obojska & Lecjzak, 1999).

Ao estudar a degradação do glifosato por um grupo de Streptomicetos (Obojska & Lecjak, 1999), observaram que estes microrganismos poderiam utilizar o xenobiótico não apenas como fonte de fósforo, mas também como fonte de nitrogênio com o aparecimento da sarcosina como metabólito intermediário.

Kishore & Jorde (1987) estudaram o metabolismo do glifosato em bactérias do gênero *Pseudomonas* PG 2982 através da adição de C<sub>14</sub>, onde o primeiro produto do metabolismo é a sarcosina, sendo observado degradação apenas quando uma fonte de carbono foi adicionada.

A formação de sarcosina como intermediário do glifosato segundo Kishore & Jorde (1987) demonstra que existe mais de uma via para a degradação do herbicida.

O glifosato foi convertido a AMPA em experimentos realizados com *Flavobacterium sp* onde a presença de fosfato inorgânico não impediu a formação de AMPA. (Balthazor & Hallas, 1986).

Forlani *et al* (1999) adicionaram 10 mmol do herbicida ao solo para realizar estudos sobre a habilidade de microrganismos isolados de diferentes localidades em degradar o glifosato, foi observado que em solos esterilizados por autoclavação não houve redução na concentração do glifosato descartando a possibilidade de degradação química, enquanto que em solos *in natura* apresentaram redução progressiva na quantidade do herbicida. Em nenhum dos casos foi detectado quantidades representativas dos seus principais metabólitos sarcosina e AMPA.

Diversos estudos têm sido feitos 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 bactéria, dentre elas diversas linhagens de *Escherichia*, *Agrobacterium*, *Bacillus* entre outras são capazes de utilizar o glifosato como fonte de fósforo, nitrogênio e carbono. Contudo, o conhecimento da degradação no ambiente é ainda incompleta, devido à falta de estudo com espécies fúngicas.

O glifosato, ao ser introduzido como fonte única de fósforo ou carbono, diminui o número total de linhagens e auxilia no crescimento de apenas um grupo limitado de espécies fúngicas. Sendo as espécies *Trichordema*, *Mucor* e *Fusarium* predominantes em meios contendo o xenobiótico (Krzysko- Lupicka & Orlik, 1997).

Krzysko- Lupicka & Orlik, (1997) relataram que linhagens de fungos isolados do solo não foram capazes de crescer em meio onde o glifosato foi utilizado como fonte de carbono ou nitrogênio. A ausência de fosfato permitiu o crescimento significativo de algumas espécies principalmente *Trichoderma harzianum*, *Scopulariopsis sp* e *Aspergillus niger*.

## **2.7. Métodos para análise**

As dificuldades de obtenção de um método simples para determinação desses compostos são principalmente devido as suas propriedades, tais como relativa solubilidade em água, sua insolubilidade em

solventes orgânicos e seu comportamento complexo. Portanto, a disponibilidade de métodos sensíveis e confiáveis para determinação do glifosato e seus metabólitos, ou produtos de degradação, ainda apresenta um importante desafio para a química analítica ambiental (Amarante & Santos, 2002a).

Devido à elevada polaridade do glifosato e sua tendência em formar espécies iônicas, a maioria dos procedimentos de extração do herbicida baseiam-se em reações ácido-base, onde o composto, inicialmente ligado a espécies iônicas do solo através do grupo fosfato, passa então, a interagir com os íons da solução.

A eficiência no processo de extração do glifosato e AMPA está diretamente relacionada com o tipo de solo. Em geral, melhores resultados são observados para solos orgânicos.

Em amostras de água são feitas, em geral, utilizando-se resinas de troca iônica ou, ainda, com prévia derivatização e transformação em compostos apolares que podem ser, mais facilmente extraídos (Amarante & Santos, 2002a).

A técnica de cromatografia gasosa (CG) é a segunda mais amplamente empregada para determinação de glifosato. Para determinação do herbicida por CG, faz-se necessário uma prévia derivação para obtenção de composto volátil. (Kudzin *et al.*, 2002).

A alta polaridade do glifosato e AMPA tem levado a muitos estudos baseados em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A dificuldade desta análise se refere à forma de detecção dos compostos, visto que ambos

não possuem grupos cromóforos que possam ser detectados diretamente por detectores colorimétricos ou de UV. Faz-se necessário o uso de reações de derivatização, a fim de obter um derivado que responda a estes detectores (Amarante & Santos, 2002b).

Uma importante desvantagem em compostos isolados da água é sua alta polaridade, que não permite a extração com solventes orgânicos, fazendo com que seja mais demorado. Devido à forma iônica do glifosato, resinas aniônicas e catiônicas são usadas para sua extração nesta técnica (Mallat & Barcelot., 1998).

Cromatografia iônica (CI), desde sua introdução na metade da década de 70, se tornou uma ferramenta importante para detectar substâncias iônicas; as substâncias hidrofílicas podem ser determinadas rapidamente e convenientemente. O glifosato é um tipo de aminoácido que possui um forte grupo fosfato ionizado, e é uma substância hidrofílica, sendo assim, é possível o uso de CI para análise do mesmo (Zhu *et al.*, 1999).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia – BiotecLab, Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, e no Laboratório de Química Ambiental no Instituto de Química, UFRGS .

#### **3.1 Solo**

O solo utilizado foi classificado como Argissolo Vermelho Distrófico Arênico (Unidade de mapeamento Bom Retiro, RS). As amostras foram coletadas na Estação Experimental Agronômica situada no município de Eldorado do Sul, sendo o material peneirado e estocado a temperatura ambiente. As amostras foram levadas para laboratório para posterior análise físico-química apresentando-se como solo com baixo cultivo, com fatores limitantes severos, sem boas condições de crescimento, com as seguintes características (Tabela 1).

Tabela 1. Características físico-químicas do solo (Argissolo Vermelho Distrófico Arênico)

Fatores	Proporção
pH (H <sub>2</sub> O)	4,3
SMP	5,3
P	15 mg/L
K	24 mg/L
Matéria orgânica	1,2 %
Carbono	0,68 %
Nitrogênio total	0,16 %
Umidade	10 %

Os experimentos foram realizados adicionando-se diferentes materiais ao solo descrito acima em potes de vidro (volume 1,2 L) com tampa hermética e vedante de borracha, utilizando-se duas repetições por tratamento, sendo todos os tratamentos comparados à testemunha (tratamento sem adição de materiais).

Foram pesados 500 g (peso seco) de solo, sendo completados com água destilada (quando necessário) para se atingir a capacidade de campo em torno de 80 %, sendo em seguida homogêneos fechados e deixados em potes.

### 3.2 O herbicida utilizado

Nos experimentos o herbicida glifosato foi utilizado tanto na sua forma comercial contendo (43% L<sup>-1</sup>) de princípio ativo, sendo utilizado sem ser diluído. Nos ensaios de biodegradação foi utilizado o produto na sua forma pura (princípio ativo 95%), sendo este doado gentilmente pela Milenia Produtos Agroquímicos.

### 3.3 Avaliação do Impacto do Glifosato pela Liberação de CO<sub>2</sub>

No primeiro experimento foram aplicados ao solo diferentes tipos de compostos, sendo cinco orgânicos e um mineral (Tabela 2), para avaliar o impacto do glifosato comparado a outros produtos.

Tabela 2. Compostos utilizados no experimento de liberação do CO<sub>2</sub>

Tratamentos	Quantidades aplicadas
Branco	(20 mL HCl)
Testemunha	-
Lodo Estação de Tratamento Efluentes	20 t/ha
Glifosato	5 L/ha
NPK	500 kg/ha
Aparas de couro	15 t/ha
Herbicida Goal	4 L/ha
Esterco de Galinha	15 t/ha



A quantificação do CO<sub>2</sub> liberado foi realizada nos seguintes períodos 2, 4, 7, 14, 20 e 24 dias após adição dos materiais.

Um segundo experimento foi feito, onde avaliou-se a resposta da microbiota de solo isolados a diferentes profundidades.

Foram testados solos coletados de 0-30 cm e solo coletado 30-60 cm de profundidade. Foi utilizado o herbicida glifosato em duas formulações: composto puro (95% de pureza); e produto comercial vendido em lojas (43 % concentração, líquido), para avaliar o impacto na microbiota do solo. O glifosato foi aplicado ao solo nas seguintes concentrações, glifosato puro 100 mg.kg<sup>-1</sup> solo (peso seco) e o produto comercial 100 mL.kg<sup>-1</sup> (peso seco), sendo em seguida homogeneizado e o CO<sub>2</sub> liberado foi quantificado durante 2, 4, 8, 11, 19 e 31 dias após a adição do herbicida.

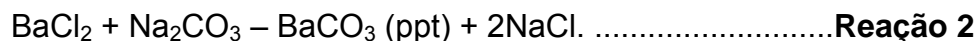
A metodologia utilizada foi descrita por Alef (1995), que quantifica o dióxido de carbono desprendido na respiração microbiana do solo.

Foram utilizados frascos respirométricos, nos quais foram colocados no seu interior copinhos plásticos contendo 20 mL de NaOH 0,5 M, em seguida esses potes foram fechados hermeticamente para evitar o CO<sub>2</sub> atmosférico no sistema. O CO<sub>2</sub> desprendido pela microbiota reage com o NaOH presente no recipiente plástico, de acordo com a seguinte reação:



Periodicamente, ao longo do experimento, os recipientes contendo NaOH eram retirados dos frascos adicionando-se 1,0 mL de BaCl<sub>2</sub> a 30 %

(m/v) e três gotas de fenolftaleína a 1% que reagem com o  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , formando cloreto de bário e cloreto de sódio:



Em seguida, é feita a titulação com HCl a 0,5M para determinar quanto de  $\text{CO}_2$  participou da reação. Através da seguinte equação:

$$\text{mg CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} = (\text{mL HCL Branco}) - (\text{mL HCl do tratamento}) \times \text{N (HCl)} \times \text{Eq. g CO}_2.$$

Sendo a quantificação feita periodicamente, paralelamente aos tratamentos foi feita a prova em branco sem adição de solo para quantificar o  $\text{CO}_2$  presente no pote.

### **3.4 Quantificação de microrganismos do solo por diluição sucessiva em placas de Petri**

A determinação do número de microrganismos do solo foi realizada através do plaqueamento em placas de Petri, segundo Jahnel *et al.* (1999), através de sucessivas diluições em série.

Foram retirados 10 g de solo com 10 % de umidade dos frascos respirométricos e estas amostras foram adicionadas em Erlenmeyers contendo 90 ml de água destilada esterilizada. Os recipientes foram agitados por 15 minutos manualmente para suspender as células microbianas. A partir destes

recipientes, foi retirado 1 ml de amostra que foi homogeneizado em tubos de ensaio contendo 9 ml de água esterilizada, sendo preparado as diluições, para bactérias de  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  e para fungos de  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$ . Os meios de cultura utilizados foram o ágar-nutriente (5 g de peptona, 3 g de extrato de carne, 10 g de NaCl, 10 g de ágar, dissolvidos em 1 litro de água destilada) para bactérias; e o meio de Martin (1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5 g de peptona, 10g de dextrose, 0,033 g de rosa bengala, 0,05 g de estreptomicina, 10 g de ágar, dissolvidos em 1 litro de água destilada) para fungos.

O plaqueamento foi realizado com alça de Drigalsky utilizando 0,1 ml de cada diluição, com auxílio de micropipeta, em placas de Petri estéreis. Em seguida as placas foram incubadas invertidas durante 1 semana a 28 °C. Após este período foram feitas observações da presença de colônias (UFC). As contagens das colônias foram feitas no início e no final do experimento, sendo as UFCs determinadas a partir da média de 2 repetições da melhor diluição.

### **3.5 Seleção das condições de cultivo**

#### **3.5.1 Microrganismos utilizados**

No presente trabalho, foram utilizadas cepas de fungos filamentosos, todos elas pertencentes ao gênero *Fusarium*.

Cepas:

91148 *Fusarium. oxysporum*

55.1 *F. oxysporum*

130 *F. oxyporum*

132 *Fusarium sp*

77b *F. oxyporum*

Todos os microrganismos utilizados foram isolados de solo de plantações da cana de açúcar, sendo gentilmente cedidos pelo Laboratório de Genética e Biologia Molecular da ESALQ-USP (Piracicaba).

### 3.5.2 Inóculo

Os fungos foram crescidos em placa de Petri em meio de Czapeck (CZ), (modificado segundo Strof *et al*, (1997), contendo, por litro de água destilada, pH 6: 30 g Glicose; 0,5 g MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 0,5 g KCl, 3 g NaNO<sub>3</sub>, 0,01 g FeSO<sub>4</sub> e 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), contendo glifosato (30 mg.L<sup>-1</sup>) durante cinco dias a temperatura ambiente. Desta placas foi feita uma suspensão de esporos diluídos em água destilada, sendo feita a leitura dessa suspensão em espectrofotômetro Micronal modelo B 395, A= 600 nm.

Para determinar a quantidade de esporos utilizada nos experimentos, foi preparada uma solução com concentração igual a  $2,6 \times 10^7$  esporos.mL<sup>-1</sup>, sendo esta concentração de esporos utilizada como padrão para todos os experimento. Todas as análises foram feitas em duplicata.

### **3.5.3 Condições de cultivo**

Para selecionar as condições de cultivos das cepas, foram preparadas suspensões de esporos de cada microrganismo, sendo estes adicionados em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio CZ com glifosato (30 mg.L<sup>-1</sup>) Cada tubo de ensaio foi colocado sob agitação (150 rpm) a diferentes temperaturas (temp ambiente, 30<sup>0</sup> e 37<sup>0</sup>C) e pHs (4,5, 6 e 7), para escolher a melhor condição de crescimento.

A temperatura a 30<sup>0</sup> C e pH 6 foi a escolhida porque as cepas apresentaram melhor crescimento nestas condições.

### **3.6 Determinação da biomassa por peso seco**

O experimento foi utilizado para quantificar a variação da biomassa microbiana através do peso seco.

Foram retirados 10 mL dos ensaios com microrganismos com auxílio de micropipetas de 5 mL em ambiente esterilizado e estes eram adicionados a tubos de centrifuga Falcon previamente secos e pesados com capacidade para 15 mL, os tubos eram fechados e colocados para centrifugar a 3.500 rpm a uma temperatura 4<sup>0</sup>C por 15 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e adicionada água destilada até completar 10 mL, sendo os micélios ressuspendidas e homogeneizadas. A lavagem dos micélios foi realizada três vezes com posterior descarte do sobrenadante. Os tubos foram levados a secagem em estufa a 60<sup>0</sup>C até atingirem peso constante.

A quantificação da massa seca foi feita pela diferença entre o peso dos tubos após a adição da biomassa com a pesagem inicial.

### **3.7 Utilização do glifosato como substrato**

Para testar a habilidade dos fungos em utilizar o glifosato como substrato foi preparada uma suspensão de esporos padrão ( $2,6 \times 10^7$ ) diluída em água destilada e inoculada em 100 mL de meio mineral CZ suplementado com 100mg de glifosato em Erlenmeyers de 250 mL. Os Erlenmeyers foram levados para um agitador a 150 rpm a 30 °C durante um período de treze dias. Ao final do 5<sup>o</sup> e 13<sup>o</sup> dia do experimento foi retirada uma alíquota de 10 mL e quantificada a biomassa por peso seco para observação da utilização do glifosato como substrato. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas, sendo o resultado expresso pela média das duas repetições.

Para o estudo foi preparado o meio CZ nas seguintes condições:

- a) meio de cultura com adição de 10% de glicose
  - b) meio de cultura sem adição de glicose
  - c) meio de cultura sem adição de  $\text{NaNO}_3$
  - d) meio de cultura sem adição de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
  - e) meio de cultura completo (controle)
- Todos os nutrientes foram substituídos por glifosato.

### **3.8 Determinação da concentração máxima inibitória**

Para determinar a concentração máxima inibitória foi preparado 100 mL do meio de cultura CZ em Erlenmeyers de 250 mL adicionado de glifosato nas concentrações ( $10 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ), um meio sem adição de glifosato foi utilizado como controle, sendo inoculados ( $2,6 \times 10^7$ ) de suspensão de esporos. Os experimentos foram conduzidos sob agitação a 150 rpm a  $30^\circ\text{C}$  durante 5 dias. No final do 5<sup>o</sup> dia foram retirados 10 mL de cada ensaio e avaliados quanto a influencia do glifosato entre eles pelo peso seco.

### **3.9 Biodegradação do glifosato**

Para os ensaios de bidegradação foram selecionadas as cepas 91148 e 55.1, sendo todos realizados em duplicata.

#### **3.9.1 Em agitador horizontal**

O estudo de biodegradação em shaker foi conduzido através da inoculação de uma solução com  $2,6 \times 10^7$  de esporos em Erlenmeyers contendo 100 mL do Meio CZ sem adição de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . O meio foi suplementado com  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  de glifosato e colocado sob agitação e 150 rpm a  $30^\circ\text{C}$  por um período de 20 dias.

Os microrganismos foram inoculados como cultura pura ou em consórcio, quando em consórcio as suspensões foram diluídas até a mesma concentração da cultura pura.

Foi preparado meio de cultura com adição de glifosato em erlenmeyers sem adição de microrganismos para detectar a degradação abiótica.

No decorrer dos experimentos foram retiradas amostras para posterior análise por cromatografia, 1 mL foi retirado assepticamente com auxílio de micropipeta no 10<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> dia. Essa amostra retirada foi diluída em balão volumétrico 10.000 vezes.

### **3.9.2 Em bioreator**

Bioreatores BBraun MD com capacidade para dois litros foram utilizados para analisar a biodegradação do glifosato, onde foram preparados 950 mL de meio CZ com ausência de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 50mL (de solução de esporos a  $2,6 \times 10^7$  + água esterilizada), totalizando um litro. O glifosato foi utilizado na mesma quantidade que o ensaio anterior e a temperatura foi mantida constante a 30 °C.

A influência do oxigênio na biodegradação foi estudada através da variação da rotação e quantidade de oxigênio injetado no sistema. Em um experimento utilizou-se 300 rpm e 2 vvm e no outro 600 rpm e 4 vvm de  $\text{O}_2$ . Foram realizados estudos com cultura pura e com os microrganismos em consórcio, sendo retirada 1 mL de amostra no começo do experimento e outra



após 5 dias, como anteriormente citadas as alíquotas também foram diluídas 10.000 vezes.

Alíquotas de 10 mL foram retiradas durante o ensaio para acompanhar o aumento da biomassa no 2<sup>o</sup> e no 5<sup>o</sup> dia

### **3.10 Análise cromatográfica**

#### **3.10.1 Equipamento utilizado**

As análises foram feitas utilizando-se um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) Shimadzu série LC-10A, equipado com três módulos para bombeamento isocrático com fluxo constante Shimadzu LC-10D, acoplado a um forno Shimadzu CTO-10A, para aquecimento da coluna analítica mantido a 50 °C constante. A coluna utilizada no CLAE foi uma AMINEX de troca iônica (250mm x 4,6mm x 9 µm) na forma K<sup>+</sup> da Biorad (Castro, 2003).

A velocidade de fluxo da fase móvel foi de 0,5 mL/min e os fluxos para as soluções oxidativas e OPA foram de 0,4 mL/min. Toda operação foi feita utilizando-se água deionizada.

#### **3.10.2 Sistema de reação Pós-coluna**

O glifosato foi separado e detectado através de uma reação pós-coluna específica para aminas primárias, ele foi oxidado com hipoclorito de sódio, sendo o produto da reação de oxidação acoplado com o-paraftaldeído

na presença de mercaptoetanol para emanar fluorescência no qual pode ser detectada com monitor de fluorescência usando excitação a 350 nm e emissão medida a 400nm.

### **3.10.3 Análise do glifosato**

As amostras retiradas dos ensaios de biodegradação foram todas diluídas  $10^{-4}$  vezes, todas elas foram colocadas em balão volumétrico com capacidade para 100 mL e acidificadas a pH 2,0 +/- 0,4 com 6 M de ácido clorídrico, sendo em seguida filtradas com membranas de nylon 0,45  $\mu$ m de diâmetro de poro, para posterior aplicação na resinas trocadoras de cátions e anions Chelex e AG1-X8 respectivamente.

### **3.10.4 Processo de clean-up da resina chelex**

Foram transferidos 15 mL da resina Chelex na forma férrica para uma coluna de vidro contendo 7-8 mL de água deionizada. Em seguida a amostra foi aplicada na coluna de titulação a uma velocidade de 6-7 mL.min<sup>-1</sup>, após aplicação da amostra as paredes foram lavadas com 50 mL de água. Adicionalmente foi utilizado 100 mL de ácido clorídrico 0,2 M deixando a torneira da coluna totalmente aberta para eliminação dos descartes. Uma solução de 22 mL de ácido clorídrico foi despejado na coluna a uma velocidade de 4 mL/min, sendo os 7 primeiros descartados e os 15 mL finais coletados em

Beckers juntamente com uma solução de 10 mL ácido clorídrico para posterior utilização na resina AG1-X8.

### **3.10.5 Processo de clean-up da resina Aniônica**

Foi preparada uma coluna de vidro com dimensões 22 cm de altura x 1,7 cm de diâmetro adicionando 7 mL de resina trocadora de anions AG1-X8, ativando-a com adição de 15mL de ácido clorídrico 6M antes de aplicar o eluato coletado na resina Chelex.. O eluato da coluna Chelex foi passado pela coluna trocadora de anions com a torneira totalmente aberta. Foram aplicados mais 10 mL de ácido clorídrico 6M para lavagem do recipiente de coleta da resina Chelex, e um total de 35 mL de eluato foi coletado em balão de destilação de 250 mL.

### **3.10.6 Concentração das amostras**

Finalizado o processo de troca aniônica, o eluato foi concentrado utilizando-se Rotavapor até atingir a secagem completa em banho-maria a 60 °C. O resíduo que permaneceu no balão foi diluído com 4 mL e levado para injeção no cromatográfico líquido.

### **3.11 Análises estatísticas**

Para realizar as análises estatísticas foram utilizados os testes Anova com fator duplo sem repetição seguida do Turkey a 5%.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Avaliação do impacto do glifosato pela liberação de CO<sub>2</sub>**

A influência dos diferentes xenobióticos sobre a microbiota do solo é discutida a seguir. Estudos de degradação de pesticidas no solo são essenciais para medir a persistência e os produtos formados pela degradação dos mesmos e por permitir a predição da quantidade que estará presente no solo e os prováveis riscos à sua exposição

.O glifosato, quando se encontra livre no solo, é degradado rapidamente a CO<sub>2</sub> pela atividade microbiana, enquanto que no seu estado adsorvido sua degradação é mais lenta, persistindo inativo durante anos (Amarante & Santos, 2002a).

Os resultados do aumento da biomassa obtidos através da evolução de CO<sub>2</sub> pela microbiota do solo no período de 24 dias estão apresentados na Figura 5.

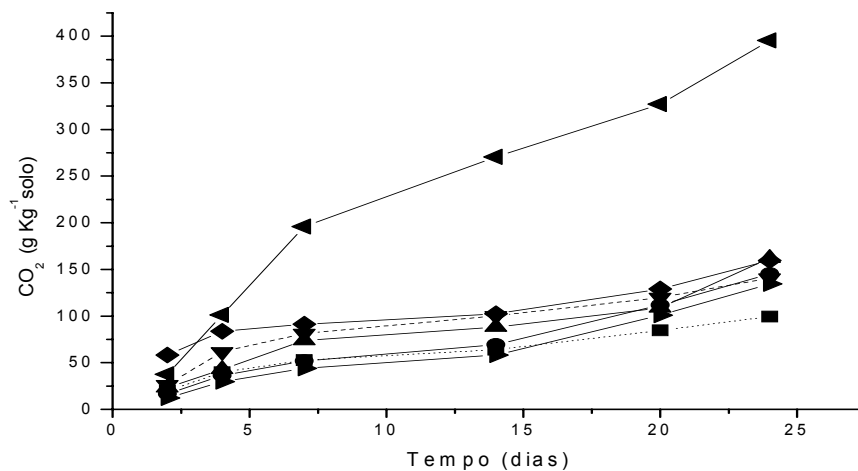


Figura 5. Evolução do CO<sub>2</sub> no solo com adição de diferentes compostos: testemunha (-■-), tratamento mineral (●), Herbicida GOAL(▲), glifosato (-▼-), lodo ETE(◆), esterco (▲) e aparas de couro (▶), \*ETE: estação de tratamento de efluentes.

Observa-se que houve variação na quantidade de CO<sub>2</sub> desprendido no decorrer do experimento que variou de 99,3 g (testemunha) até um máximo de 395 g no tratamento onde foi aplicado o esterco após o término dos 24 dias (tabela 3), sendo este resultado maior que os demais tratamentos.

Chear *et al* (1998), demonstraram que uma vez aplicado ao solo, a taxa de degradação dos herbicidas variam de acordo com o tipo do solo, em solos com grande quantidade de matéria orgânica a degradação é baixa, provavelmente pelo composto encontrar-se adsorvido neste, enquanto que, em solos arenosos existe rápida degradação, devido principalmente aos processos microbiológicos e a baixa adsorção.

Tabela 3. Quantidade de CO<sub>2</sub> acumulado nos diferentes tratamentos (g.kg<sup>-1</sup>)

dias	Tratamento				Lodo		Aparas
	Testemunha	Mineral	GOAL	Glifosato	ETE	Esterco	couro
2	19,8	16,5	23,1	26,4	58,3	37,4	12,1
4	39,6	36,3	42,9	61,6	83,6	101,2	29,7
7	52,8	51,7	73,7	81,4	91,3	195,8	44
14	63,8	69,3	88	100,2	102,3	270,6	58,3
20	84,5	111,8	108,7	120	129	327	100,8
24	99,3	145,4	162,1	140,7	159,6	395,3	134,4

\* ETE: estação de tratamento de efluentes

Houve diferença estatística (ver anexos) entre os tratamentos, onde a adição de esterco produziu a maior liberação de CO<sub>2</sub>, provavelmente por proporcionar maior estímulo e conseqüentemente maior aumento da microbiota quando comparado aos demais tratamentos, mostrando que existem certos compostos que são mais fáceis de serem degradados e utilizados como fonte de nutrientes e energia.

A evolução do CO<sub>2</sub> do solo tem sido utilizada como índice de atividade microbiana, biomassa ativa e, ainda, do metabolismo do carbono lábil do solo (Souza *et al.*, 1994). Estes resultados sugerem que a microbiota do solo é capaz de utilizar os diferentes materiais utilizados no experimento como fonte de carbono para o seu metabolismo, proporcionando um incremento na respiração microbiana.

Sanino & Gianfredo, (2001), estudaram o efeito do glifosato sobre certas enzimas do solo e concluíram que algumas delas não foram afetadas quanto a sua atividade, enquanto que em alguns casos pode haver efeito

estimulativo de algumas enzimas pela presença do composto, porém a altas concentrações pode haver inibição competitiva.

Os resultados obtidos pela respiração mostram que nenhum composto que foi utilizado no experimento significativamente teve um efeito negativo na população microbiana quando comparados a taxa de produção de CO<sub>2</sub> pela testemunha.

A habilidade dos microrganismos em degradar substratos complexos é bem conhecida e é cada vez mais comum observar que alguns xenobióticos tornam-se menos eficientes após aplicações contínuas, devido à capacidade de adaptação da microbiota a estes xenobióticos (Nicholson & Hirsch, 1998).

Comparando-se o CO<sub>2</sub> liberado no tratamento com o herbicida glifosato em relação aos resultados obtidos pelos demais tratamentos (mineral, aparas, lodo ETE e GOAL), estes apresentaram resultados significativamente semelhantes quanto ao impacto produzido por eles sobre a população de indivíduos presentes no solo.

Roslycky (1982), estudou o efeito do glifosato sobre a microbiota do solo e observou que a degradação do produto consiste de uma rápida fase inicial, seguida por uma diminuição após o 7<sup>o</sup> dia.

Os resultados encontrados para a atividade microbiana dos solos coletados a 30 e 60cm, avaliados pela técnica da evolução do CO<sub>2</sub>, estão mostrados na Figura 6.

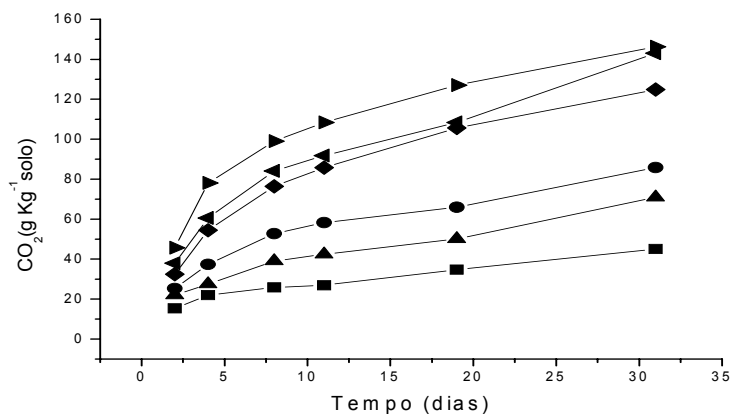


Figura 6. Evolução do CO<sub>2</sub> nas amostras de solo coletados a 30 cm e 60 cm. Testemunha 30 (■), Puro 30 (●), comercial 30 (▲), testemunha 60 (◆), Puro 60 (◄), comercial 60 (►).

Comparando os resultados avaliados, observa-se que houve atividade microbiana em todos os tratamentos e que a adição do herbicida glifosato na sua formulação comercial (43 %) ou na sua forma pura (95 %) não apresentou inibição no crescimento da população quando comparado ao resultado apresentado pela testemunha. Este resultado assemelha-se ao proposto por Nicholson & Hirsch, (1998) que estudaram o impacto de diferentes pesticidas como glifosato e benomil não sendo observado impacto negativo sobre a microbiota quando comparado ao controle (sem adição de pesticida).

Pôde-se observar que nos solos coletados a 30 cm e 60 cm houve variação na quantidade de CO<sub>2</sub> entre os tratamentos apresentados na tabela 4, porém estatisticamente (ver anexos) quando os resultados são comparados entre o solo coletado a mesma profundidade, estas variações não foram significativas entre eles, podendo-se inferir que a adição do glifosato na sua



forma comercial ou pura não surtiu efeito na população microbiana presente no solo a 30 e 60 cm.

Resultados similares foram observados por Araújo *et al*, (2003), ao descrever que houve pequeno aumento no número de microrganismos, mas nenhum efeito positivo ou negativo foi constatado ao inocular glifosato em argissolo.

Tabela 4 Quantidade de CO<sub>2</sub> acumulado nos solos a 30 e 60cm de profundidade (g.kg<sup>-1</sup>).

dias	test 30	Puro 30	Comer 30	Test 60	Puro 60	Comer 60
2	15,4	25,3	22	32,45	37,95	45,65
4	22	37,4	27,5	54,45	60,5	78,1
8	25,85	52,8	39,05	76,45	84,15	99
11	26,95	58,3	42,35	85,8	91,85	108,35
19	34,65	66	50,05	105,6	108,35	127,05
31	45,1	85,8	70,95	124,85	143	146,3

Não houve variação significativa entre as diferentes profundidades de acordo com a taxa de respiração apresentada, no solo a 30 cm e 60 cm pôde-se observar que houve atividade microbiana pela quantidade de CO<sub>2</sub> liberado demonstrando que o herbicida quando incorporado a este ambiente pode ter sido utilizado como substrato e fonte de energia, concordando com Wardle e Parkinson (1990) que sugerem que a produção de CO<sub>2</sub> está relacionada à decomposição do glifosato no solo.

Estes resultados evidenciam que solos com aplicação desses materiais têm a capacidade de ativar a microbiota mais rapidamente sendo

esses produtos mais facilmente degradáveis e utilizáveis pela microbiota do solo.

A atividade microbiana é um importante fator que influencia o comportamento destes materiais no ambiente. Segundo Haney *et al.*, (2000) a aplicação de xenobióticos pode vir a estimular a atividade dos microrganismos do solo. Outros autores também explicam que pode haver aumento da atividade microbiana, através da mineralização do carbono e nitrogênio.

## **4.2 Quantificação da microbiota do solo**

As contagens dos microrganismos nas amostras de solo dos diferentes tratamentos são apresentados nas tabelas 5 e 6.

Muitos microrganismos presentes em diversos ambientes são capazes de metabolizar o glifosato, principalmente através da liases C-P, tais como *Pseudomonas fluorescens* e *Burkholderia cepacia*, confirmando que populações bacterianas são capazes de degradar tais xenobióticos (Obojska & Lecjak, 1999).

A tabela 5 mostra os resultados das contagens feitas para a população bacteriana. Observa-se que não houve variação significativa no número de indivíduos entre os diferentes tipos de tratamento.

Tabela 5. Quantificação da população de bactérias do solo a 30 e 60cm.

Tratamento	UFC/g solo (dia 1)	UFC/g solo (dia 31)
Testemunha 30 cm	$1,78 \times 10^5$	$2,63 \times 10^5$
Puro 30 cm	$1,33 \times 10^5$	$2,89 \times 10^5$
Comercial 30 cm	$1,11 \times 10^5$	$2,45 \times 10^5$
Testemunha 60 cm	$1,07 \times 10^5$	$2,38 \times 10^5$
Puro 60 cm	$1,48 \times 10^5$	$2,41 \times 10^5$
Comercial 60 cm	$1,78 \times 10^5$	$3,70 \times 10^5$

Observa-se, de uma maneira geral, que o número de bactérias foi bem maior em todos os tratamentos quando comparadas ao número de fungos (Tabela 6).

Araújo *et al.*, (2003) ao estudar o impacto causado pelo glifosato na microbiota do solo, observou que não houve diferença significativa no número de bactérias após 32 dias de experimento e que a adição de glifosato resultou num maior aumento da população fúngica quando comparado ao controle.

Observa-se que o número de bactérias encontradas variou de  $2,45 \times 10^5$  UFC a  $2,89 \times 10^5$  UFC no solo a 30 cm, e  $2,38 \times 10^5$  UFC a  $3,7 \times 10^5$  UFC a 60 cm de profundidade no decorrer dos 31 dias.

Nos solos onde foi aplicado o herbicida glifosato, o número de bactérias foi significativamente semelhantes àqueles encontrados na testemunha no final do experimento.

De acordo com os resultados apresentados acima, a adição do glifosato não teve efeito negativo na população de bactérias, pois não houve inibição do crescimento em nenhum dos solos testados comparando-se a quantificação no início do experimento e após 31 dias.

Significativamente, não houve diferença entre os tratamentos, podendo-se inferir que a adição do herbicida tanto na sua formulação comercial quanto na formulação pura não apresentou o efeito sobre a microbiota.

Anderson (1978) relatou que os compostos quando utilizados normalmente nas doses recomendadas, não têm efeitos adversos sobre os microrganismos do solo.

Estes resultados confirmam os observados no experimento de liberação de CO<sub>2</sub> (Figura 6), onde o glifosato utilizado não teve efeito inibidor no aumento da biomassa, porém vale salientar que esses experimentos mostram apenas o resultados dos microrganismos cultiváveis não levando em consideração todo o restante da microbiota.

Em relação aos fungos, os resultados mostrados na tabela 6 mostram que o número de fungos observados nos tratamentos foi bem inferior ao apresentado pelas bactérias.

Tabela 6. Quantificação da população de fungos do solo a 30 e 60 cm

Tratamento	UFC/g solo (dia 1)	UFC/g solo (dia 31)
Testemunha 30 cm	0,67 x 10 <sup>3</sup>	0,78 x 10 <sup>3</sup>
Puro 30 cm	0,15 x 10 <sup>3</sup>	0,32 x 10 <sup>3</sup>
Comercial 30 cm	0,56 x 10 <sup>3</sup>	0,33 x 10 <sup>3</sup>
Testemunha 60 cm	0,33 x 10 <sup>3</sup>	0,59 x 10 <sup>3</sup>
Puro 60 cm	0,55 x 10 <sup>3</sup>	0,61 x 10 <sup>3</sup>
Comercial 60 cm	0,89 x 10 <sup>3</sup>	0,98 x 10 <sup>3</sup>

Sabe-se que a habilidade dos microrganismos do solo em degradar xenobióticos é bem estudada, no entanto ainda não está claro como os grupos atuam nesta degradação, se eles agem como linhagens puras ou em consórcio (Nicholson & Hirsch, 1998).

Este resultado difere em relação ao comportamento das de colônias fungicas do apresentado por Roslychy (1982) ao constatar que em altas doses do herbicida ( $1000 \mu\text{g. g}^{-1}$ ) os fungos tiveram aumento populacional inicialmente, logo após a aplicação, contudo após 28 dias esse aumento não foi significativo, sendo ao contrário, as bactérias mais sensíveis a dose aplicada precisando de 14 dias para alcançar a população máxima.

Como observado nos resultados descritos acima, também não foi detectado nenhum efeito negativo para a população fúngica, não havendo diferença significativa entre os tratamentos sem adição ou com adição do glifosato, podendo-se observar também que não houve diferença estatística entre o número de fungos quantificados no solo a 30 e 60 cm.

Wardle & Parkinson (1990), explica que certos compostos podem influenciar direta ou indiretamente na população fúngica, sendo assim sugere-se que dependendo do produto os fungos possuem a capacidade de assimilação e degradação destes materiais utilizando-os como fonte de nutrientes para seu crescimento.

### 4.3 Utilização do glifosato como substrato

Nesta seção foi testada a habilidade das cepas de *Fusarium* em utilizar o glifosato como substituinte a diversas fontes de nutriente (glicose, nitrogênio e fósforo).

Os resultados da utilização do glifosato como substrato em meio de cultura são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Quantificação da massa celular seca nos diferentes substratos testados ( $\text{g.l}^{-1}$ )

Substrato	Cepas 5 dias					Cepas 13 dias				
	91148	55.1	77	130	132	91148	55.1	77	130	132
Meio Completo	11,4	2,37	7,92	5,18	4,67	70,13	8,25	23,88	76,62	5,98
10% glicose	0,21	0,1	0,26	0,22	0,13	2,14	0,78	1,28	1,02	1,13
S/glicose	0,07	0,05	0,18	0,12	0,09	0,34	0,05	0,18	0,19	0,11
S/ $\text{NaNO}_3$	0,16	0,17	1	0,07	0,98	5,38	1,29	1,31	3,95	1,32
S/ $\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,11	0,17	0,16	0,71	0,22	3,4	0,57	0,39	3,4	3,81

De acordo com os resultados mostrados na tabela 7, após 5 e 13 dias observa-se que houve aumento da biomassa no decorrer do experimento. Isto sugere que o glifosato possivelmente foi utilizado como substituinte aos nutrientes testados para o crescimento dos microrganismos.

Malik *et al.*, (1989), sugere que o glifosato apresenta rápida detoxificação no solo e que o primeiro passo no metabolismo da molécula é a clivagem da ligação C-N formando o metabólito AMPA.

As cepas 91148 e 130 foram as que apresentaram maior aumento na biomassa após o 13<sup>o</sup> dia, 76,62g. l<sup>-1</sup> e 70,13 g. l<sup>-1</sup>, respectivamente no meio de cultura controle.

A adição de 10% de glicose favoreceu o crescimento de todas as cepas, sendo a cepa 91148 a que mais se desenvolveu neste meio (2,14 g. l<sup>-1</sup>) no final do ensaio.

Nenhuma cepa apresentou crescimento significativo sem a adição de glicose em relação aos outros substratos estudados, demonstrando que para os fungos testados essa fonte de carbono é essencial para o seu desenvolvimento.

A cepa 91148, mais uma vez mostrou-se melhor adaptável ao glifosato ao ser quantificado 5,38 g. l<sup>-1</sup> de massa seca no meio sem adição de nitrogênio.

A ausência de fósforo foi a que menos atingiu os isolados 91148, 130 e 132 ao apresentar 3,4 g. l<sup>-1</sup>, 3,4g. l<sup>-1</sup> e 3,81g. l<sup>-1</sup> de massa seca respectivamente.

É cada vez mais comum a identificação de microrganismos capazes de mineralizar organofosforados naturais ou xenobióticos e utilizá-los como fonte de carbono e nitrogênio, por possuírem enzimas com alta especificidade a estes compostos, porém apenas em linhagens específicas foram descritas essas enzimas, não sendo comprovados a presença destas em grupo definidos (Kononova & Nesmeyanova, 2001).

A partir dos dados apresentados na tabela 8 pode-se concluir que o glifosato não teve efeito negativo, pois não inibiu o crescimento das cepas testadas.

Ternan *et al.*, (1998) descrevem que microrganismos que degradam organofosforados podem ser divididos em dois grupos, o primeiro pode vir a utilizar o composto apenas como fonte de fósforo através da liases C-P, e o segundo tem a capacidade de usá-los como aporte de carbono, nitrogênio e fósforo.

#### 4.4 Determinação da concentração máxima inibitória

Os resultados do efeito do glifosato a diferentes concentrações sobre os fungos testados são apresentados na figura 7.

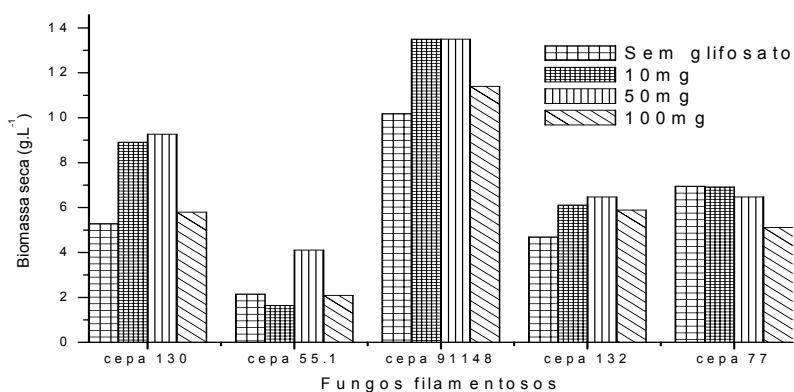


Figura 7. Biomassa seca das cepas crescidas a diferentes concentrações de glifosato após 5 dias.



Os fungos filamentosos, de acordo com os dados apresentados nos experimentos acima, não foram inibidos pelo glifosato. Nos ensaios em que foi adicionado o herbicida a 10, 50 e 100 ppm de concentração não foi constatado nenhum efeito negativo quando comparados ao meio de cultura sem glifosato.

O glifosato, ao ser testado com vários fungos ectomicorrizicos em cultura pura, *Hebeloma crustuliniforme*, *Laccaria laccata* e *Suillus tomentosum* foram inibidos a concentrações acima de 10 ppm, *Cenococcum geophilum*, *H. longicadum* e *P. tictorius* tiveram inibição em concentrações abaixo de 100 ppm (Laatikainen & Tanski, 2002).

O glifosato em concentrações de 10, 50 e 100 ppm teve estatisticamente o mesmo efeito sobre as cepas 91148, 55.1, 130, 132 e 77 quando comparou-se a biomassa seca dos experimentos onde foi adicionado o herbicida com o controle. Demonstrando que para essas cepas o glifosato não apresentou efeito inibitório no decorrer dos 5 dias, mesmo em elevada concentração.

Glifosato estimulou o crescimento micelial de *Laccaria deliciosus* em termos de biomassa e diâmetro da colônia a doses inferiores a  $1000\mu\text{g.g}^{-1}$ , acima dessa concentração esse efeito desapareceu com significativa diminuição na biomassa e diâmetro da Colônia (Diaz *et al*, 2003).

## 4.5 Biodegradação do glifosato

### 4.51 Resultados em incubadora horizontal

Microrganismos possuem uma ampla diversidade enzimática e são capazes de metabolizar uma grande variedade de compostos orgânicos. Dentre eles, os fungos exibem um extenso, porém pouco estudado potencial degradativo (Wackett & Ellis, 1999).

Os resultados da biodegradação do glifosato em agitador pelas cepas testadas estão apresentados na Figura 8.

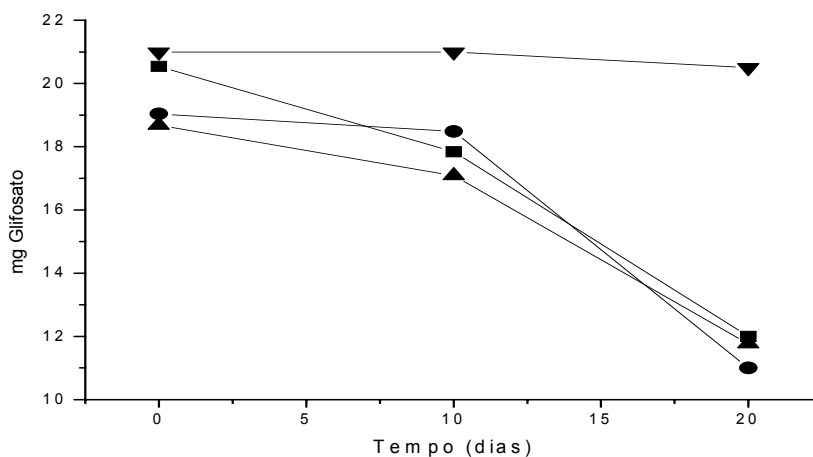


Figura 8. Biodegradação do glifosato em agitador horizontal pelas cepas 91148 (■), 55.1 (●), consórcio (▲) e controle (▼).

Através do gráfico acima se pode observar que não houve redução do glifosato no ensaio realizado com o controle, demonstrando que a degradação abiótica foi pouco significativa para diminuição do herbicida nos

experimentos. Constatando-se, que a presença dos microrganismos é importante na degradação deste xenobiótico.

Todos os fungos estudados foram capazes de metabolizar o composto na ausência de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , havendo redução significativa na quantidade de glifosato ao término do ensaio.

Apesar do fosfato inorgânico ser a fonte preferida de fósforo para o crescimento, muitos microrganismos são capazes de metabolizar organofosforados em condições limitantes de fosfato (Ternan & MacMullan, 2000).

Estatisticamente, não houve diferença significativa entre os experimentos, sendo observado que as cepas crescidas puras apresentaram resultados similares as cepas em consórcio em relação à quantidade de herbicida degradado no final dos ensaios, podendo-se constatar neste caso que a formação de consórcio com as espécies utilizadas não propiciaram uma melhor mineralização do composto.

Em todos os experimentos, não foi observada a formação do metabólito AMPA. Os experimentos realizados por Kishore & Jacob (1987), o glifosato metabolizado por *Pseudomonas sp* foi clivado diretamente a glicina, não havendo a formação do AMPA.

A clivagem da ligação C-P é o passo inicial na mineralização completa de diversos organofosforados. Matys *et al* (2004) comparou a atividade das liases C-P em diferentes estágios de crescimento em *E. coli* e mostrou que a fase de desenvolvimento exponencial é o mais favorável a atividade desta enzima.

Comparando-se o percentual de redução de glifosato durante o experimento nota-se que onde a concentração de glifosato correspondia a 20,54 mg.l<sup>-1</sup>, 19,04 mg.l<sup>-1</sup>, 18,68 mg.l<sup>-1</sup> inicialmente; houve redução para 17,84 mg.l<sup>-1</sup>, 18,48 mg.l<sup>-1</sup>, 17,08 mg.l<sup>-1</sup> após o 10<sup>o</sup> dia; e finalmente sendo quantificado 12 mg.l<sup>-1</sup>, 11 mg.l, 11,76 mg.l<sup>-1</sup> no final do ensaio para as cepas 91148, 55.1 e 91/55.1 (consórcio) respectivamente de acordo com a figura 9, comprovando a capacidade de biodegradação dos isolados .

A taxa de biodegradação pode variar dependendo do microrganismo selecionado. Matys *et al* (2001) descreveram que linhagens de *E. coli* crescidas na presença de metilfosforado (um análogo do glifosato) como fonte de fósforo precisaram de um longo período de latência até iniciar a degradação.

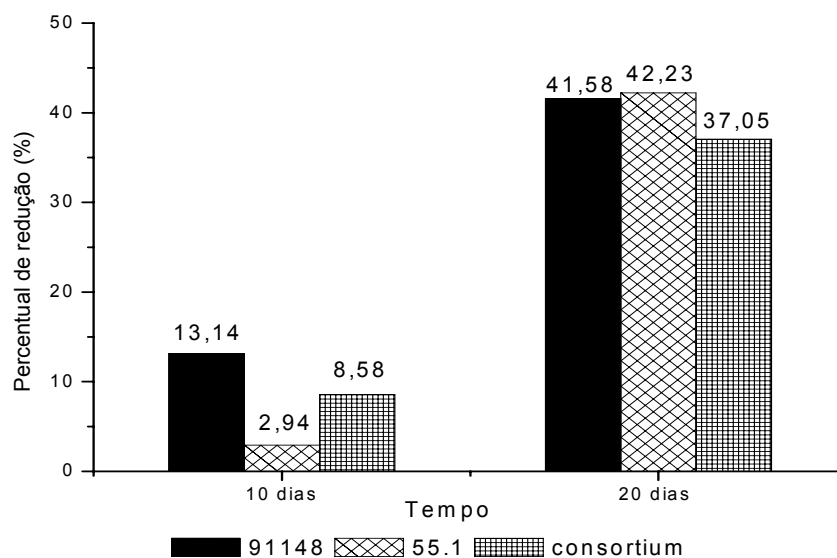


Figura 9 Percentual de redução do glifosato entre as diferentes cepas após 10 e 20 dias.

De acordo com a figura 9, observa-se que inicialmente a biodegradação foi mais lenta, tornando-se mais ativa após os 10 primeiros dias

de experimento, podendo ser observado taxas de degradação do composto superiores a 40% pelas cepas estudadas.

Estes resultados não correspondem aos apresentados por Malik *et al* (1989) e Souza (1994) que citam a rápida mineralização do glifosato pela microbiota do solo.

Klimek-ochab *et al*, (2003) ao estudar diversos isolados, observou que *Penicillium oxilicum* foi capaz de crescer em meio CZ modificado na presença de organofosforados como fonte de fosfato, sendo constatada a remoção do composto a partir do quarto dia após a inoculação.

Embora o metabolismo bacteriano de organofosforados seja bem estudado, muito pouco é conhecido a respeito da habilidade dos fungos em utilizar essas substâncias (Klimek-ochab *et al*, 2003).

#### **4.5.2 Em bioreator**

A mineralização de moléculas orgânicas no ambiente é quase exclusivamente resultado da atividade microbiana, poucos mecanismos abióticos na natureza podem converter totalmente compostos orgânicos complexos em produtos inorgânicos. Os fungos podem degradar e mineralizar a maioria dos produtos agrícolas e industriais que apresentem esqueleto de carbono devido ao grande número de enzimas oxidativas (Tekere *et al*, 2002).

Foi constatada degradação em todos os experimentos, pela redução do composto no final do experimento comparado à concentração inicial (Figura 10).

Observa-se que não houve redução no experimento controle, resultado este que concorda com o apresentado no ensaio em agitador em que a biodegradação do herbicida glifosato é favorecida pela presença microrganismos.

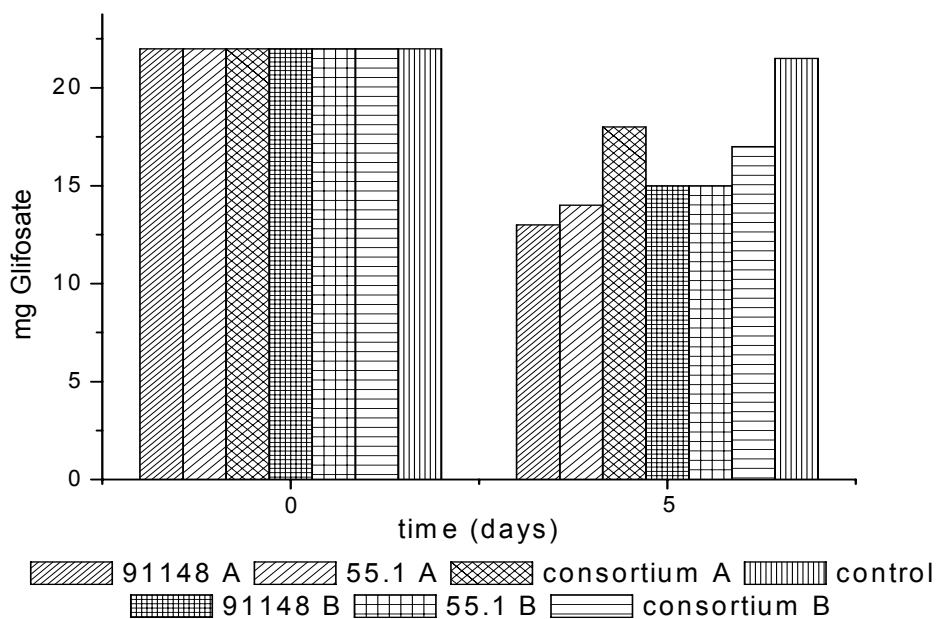


Figura 10. Biodegradação do glifosato em cultura pura e consócio em biorreator a diferentes condições de aeração no tempo 0 e após 5 dias A-300rpm 2vvm; B -600rpm 4vvm.

Mesmo com a degradação do herbicida não foi detectada a formação do AMPA nas análises feitas em HPLC, o que provavelmente indica que outros tipos de metabólitos são formados na metabolização do herbicida com ausência de fósforo pelas cepas testadas.

Forlani *et al* (1999) ao testar 163 linhagens de bactéria, encontraram 26 isolados capazes de metabolizar o herbicida a sarcosina e fosfato inorgânico, não sendo formado AMPA.

A degradação em biorreator mostrou-se muito mais eficiente que aquela apresentada em agitador, onde foi observada nos ensaios com a cepa 91148 reduções de até 41% após 5 dias, mostrando que sob condições controladas de pH, temperatura e aeração os microrganismos têm a tendência de melhor expressar seu potencial metabólico.

Não houve diferença estatística entre os tratamentos, a degradação conduzida pelos fungos em consórcio não foi superior àquela analisada em cultivo puro em biorreator, podendo-se deduzir que a formação de consórcio por estes microrganismos não resulta em maior diminuição do herbicida.

Nos estudos realizados em biorreator com lodo ativado, o consórcio microbiano não mostrou alta atividade degradativa durante a 1<sup>o</sup> semana de incubação, contudo a partir do 24<sup>o</sup> dia, houve aumento na atividade e mais de 800 mg.l<sup>-1</sup> de glifosato foi degradado em apenas 4 dias (Heitkamp & Ademis, 1992).

A diferença nas condições de aeração não influenciou na degradação, para as cepas analisadas, o aumento na agitação ou na quantidade de oxigênio no sistema não mostrou diferença significativa nos resultados finais, experimentos em que foi utilizado oxigênio a 4vvm e 600rpm de agitação não foram mais eficientes que os realizados a 2vvm e 300rpm como ilustrados na Figura 10. Pode-se inferir neste caso que a aeração não foi o fator primordial no metabolismo do glifosato pelos microrganismos.

Clemente *et al*, (2001) notou que a atividade entre diferentes linhagens fúngicas na transformação de hidrocarbonetos aromáticos e outros poluentes é bastante variável, provavelmente devido ao aparato enzimático e

diferença no crescimento e resposta enzimática aos diferentes meios de

Ct

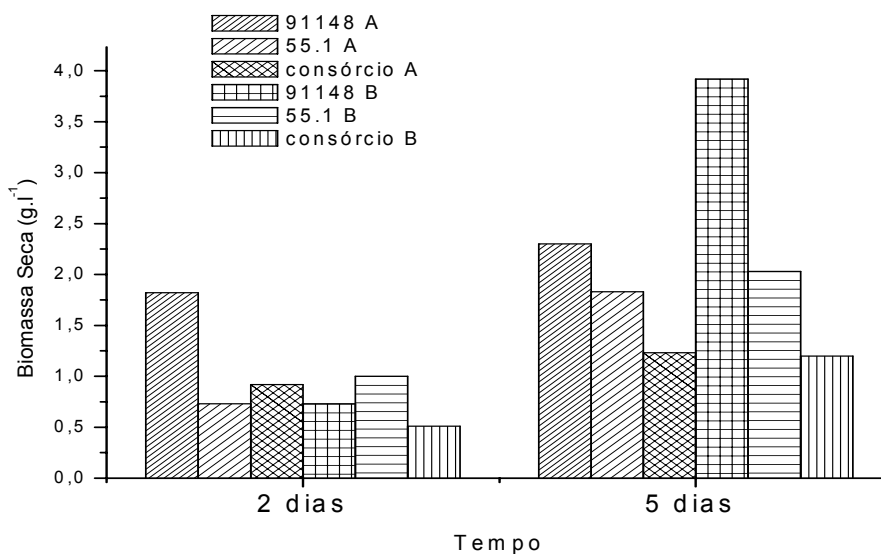


Figura 11. Biomassa seca das cepas crescidas em biorreator a diferentes condições de aeração no 2<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dia A-300rpm 2vvm; B-600rpm 4vvm.

De acordo com a Figura 11, em todos os experimentos realizados foi constatado o aumento da biomassa no decorrer do ensaio, mostrando que a ausência de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  foi suprida pela presença do glifosato permitindo o crescimento das cepas.

Krzýsko-Lupicka & Orlik, (1997) estudou a habilidade de 26 linhagens fúngicas na utilização de diversos organofosforados, o meio CZ deficiente em fosfato permitiu o crescimento significativo de todos os isolados.

A diferença na taxa de aeração não influenciou no aumento ou diminuição da biomassa, pois estatisticamente não houve diferença entre os tratamentos, mostrando que para as cepas estudadas a variação na aeração não foi decisiva no seu crescimento.



#### 4.6 Análises Cromatográficas

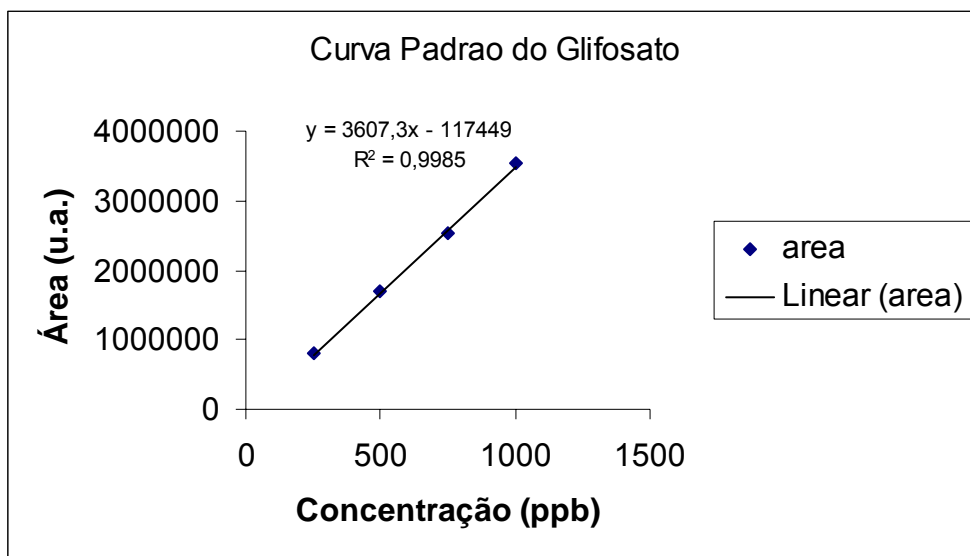


Figura 12 Curva padrão do glifosato.

Na figura 12 está apresentado o gráfico da curva padrão do glifosato utilizado para calcular a concentração do herbicida nos experimentos.

A taxa de recuperação do glifosato em meio de cultura foi de 47%, recuperação considerada boa segundo a metodologia utilizada (Glyphosate, 2000).

De acordo com os resultados mostrados nos experimentos, a metodologia utilizada para análise do glifosato é eficaz, sendo detectada a presença do composto mesmo a concentrações muito baixas como 10 ppb.

Foi utilizada a equação  $y = 3607,3x - 1174,49$  para calcular a quantidade de glifosato injetada no sistema.

## 5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no trabalho prático, concluiu-se que:

- A presença do glifosato no solo não apresentou efeito negativo sobre a microbiota.
- O número de bactérias quantificadas foram maiores que os fungos no solo.
- Os microrganismos foram capazes de utilizar o herbicida como substrato. O glifosato não apresentou efeito inibitório no crescimento das cepas testadas, mesmo a altas concentrações.
- A biodegradação foi observada por todas as cepas testadas, e a utilização de consórcio microbiano não apresentou melhores resultados em relação às culturas puras.
- Em biorreator a biodegradação aconteceu de forma mais eficiente.
- A variação nas condições de aeração não influenciou no metabolismo do herbicida nos ensaios de biodegradação em bioreator.

- Não foi observada a formação do metabólito AMPA em nenhum dos experimentos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEF, K. **Soil respiration. Methods in applied soil microbiology and biochemistry.** London: Academic Press, 1995. p. 214-216.

ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology.** 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1977.

AMARANTE, O.P; SANTOS, T.C. Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato: breve revisão. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p 20-428, 2002.

AMARANTE, O.P; SANTOS, T.C. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.

ANDERSON, J.P.E. Pesticides effects on non-target soil microrganisms. In: **Pesticides microbiology.** New york: Academic Press, 1972. p. 611-628.

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

ARZOCCO AF. **Química Ambiental.** São Paulo: Guanabara, 2000.

BALTHAZOR, T.M; HALLAS, L.E. Glyphosate studies in two soils. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 51, p. 432-434, 1986.

BEIGEL, C; CHANNAY, M.P. Degradation of formulated and unformulated fungicide in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdan, v. 31, n. 4, 1999.

CARRILO, G.D; HONRUBIA, M. Differentail responses of ectomycorrhizhal fungi to pesticides in pure culture. **Cryptogamie Mycologie**, Paris, v. 24, n. 3, p. 199-211, 2003.

CASTRO, A.S. **Avaliação Pontual da degradação e transporte do herbicida glifosato no solo da bacia do arroio donato- pejuçara (RS)**. 87p Dissertação (mestrado recursos hídricos e saneamento ambiental - IPH) Porto alegre- UFRGS, 2003.

CHEAR, U.B; KIRKWOOD, R.C; LUM, K.Y. Degradation of four commonly used pesticides in malaysian agricultural soils. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 1217-1223, 1998.

CLEMENTE, A.R; ANAZAWA, T.A; DURRANT, L.R. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n.4, 2001.

DÍAZ, G; CARRILO, C; HONRUBIA, M. Differential responses of ectomycorrhizal fungi to pesticides in pure culture. **Cryptogamie Mycologie**, Paris, v. 24, n. 3, p. 199-211, 2003.

DORES, E.F; De-LAMONICA-FREIRE, A.F. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas: vias de contaminação e dinâmica dos pesticidas no ambiente aquático. **Pesticidas**, Curitiba, v. 9, p. 1-15, 1999.

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

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

GLYPHOSATE analysis. **Bulletin Bio rad laboratories**, Hercules, 2000, n. 1591, p.1-4.

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

HEITKAMP, M.A; ADAMS, W.J. Glyphosate degradation by immobilized bacteria: laboratory studies showing feasibility for glyphosate removal from waste water. **Canadian Journal of Microbiology**, Vancouver, v. 38, p. 921-928, 1992.

JAHNEL, M.C; CARDOSO, E.J.B.N; DIAS, C.T.S. Determinação do número mais provável de microrganismos do solo pelo método de plaqueamento por gotas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 23, p. 553-559, 1999. KISHORE, G.M; JACOB, G.S. Degradation of glyphosate by *Pseudomonas* sp. PG2982 via a sarcosine intermediate. **The Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 262, n. 25, p. 12164-12168, 1987.

KIM, Y; AHN, J; MOON, S; LEE, J. Biodegradation and detoxification of organophosphate insecticide, malathion by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Pisi* cutinase. **Chemosphere**, London, v. 60, p. 1349-1355, 2005.

KLIMEK-OCHAB, M; LEJCZAK, B; FORLANI, G. A metal-independent hydrolase from *Penicillium oxalicum* strain able to use phosphonoacetic acid as the only phosphorous source. **FEMS Microbiology Letters**, London, v. 222, p. 205-209, 2003.

KONONOVA, S.V; NESMEYANOVA, M.A. Phosphonates and their degradation by microorganisms. **Biochemistry**, Moscow, v. 67, n. 2, p.: 184-195, 2001.

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

KUDZIN, Z.H; GRALK, D.K; LUCZAK, J. Novel approach for simultaneous analyses of glyphosate and its metabolites. **Journal of Chromatography A**, London, v. 947, p. 129-141, 2002.

LAATIKAINEN, T; TANSKI, H.H. Mycorrhizal growth in pure culture in the presence of pesticides. **Microbiological Research**, London, v. 157, p. 127-137, 2002.

LANKAS, G.R. A lifetime feeding study of glyphosate in rats. New Jersey: Inc East Millstone, 1981.p. 12-21. **Unpublished Report, bio/dynamics**

LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**. São Paulo: Manolo, 1999.

LEE, S; HEPBURN, T.W; SWARTZ, W.H; AMMON, H.L; MARIANO, O.S; MARIANO, D.D. Stereo chemical probe for the mechanism of P-C bond cleavage catalyzed by the *Bacillus cereus* phosphonoacetaldehyde hydrolase. **Journal American Chemical Society**, New York, v. 114, p. 7346-7354, 1992.

MALIK, J; BARRY, G; KISHORE, G.M. The herbicide glyphosate. **Biofactors**, London, v. 2, p. 17-25, 1989.

MALLAT, E; BARCELÓ, D. Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polimeric ion-exchange solid phase extraction columns followed by ion chromatography post derivatization with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, London, v. 823, p. 129-136, 1998.

MATYS, S.V; KUZMINA, N.M; LAURINAVICHIOUS, K.S; NESMEYANOVA, M.A. Effect of environmental factors on degradation of the C-P bond of methylphosphonate by *Escherichia coli* cells. **Process Biochemistry**, London, v. 39, p. 1063-1071, 2004.

MATYS, S.V; LAURINAVICHIOUS, K.S; KRUPYANKO, V.I; NESMEYANOVA, M.A. Optimization of degradation of methylphosphonate – analogue of toxic pollutants with direct C-P bond by *Escherichia coli*. **Process Biochemistry**, London, v. 36, p. 821-827, 2001.

MONTEIRO, R.T.R. Biodegradação de pesticidas em solos brasileiros. **Biodegradação**, Emprapa Meio ambiente Piracicaba, v. 47, p. 34-47, 2001.

NICHOLSON, P.S; HIRSCH, P.R. The effects of pesticides on the diversity of culturable soil bacteria. **Journal Applied Microbiology**, London, v. 84, p. 551-558, 1998.

NUNES, G.S; RIBEIRO, M.L. Pesticidas: uso, legislação e controle. **Pesticidas**, Curitiba, v. 9, p. 31-44, 1999.

OBOJSKA, A; LECJZAK, B. Degradation of glyphosate by streptomycetes isolates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 51, p. 872-876, 1999.

PEASE, WS. MORELLO-FROSCHE RA, KYLE AD. **Preventing Pesticide Related Illness in California Agriculture**. Berkeley: University of California, CA, 1993.

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

SANINO, F; GIANFREDA, L. Pesticide influence on soil enzymatic activities. **Chemosphere**, London, v. 45, p. 417-425, 2001.

SCHUETTE, J. Environmental fate of glyphosate. **Environmental Monitoring & Pest Management**, California, v. 1, p. 1-13, 1998.

SMITH, N.J; MARTIN, R.C; CROISE, R.G. Levels of the herbicide glyphosate in well water. **Environmental Contamination Toxicology**, Washington, v. 57, p. 759-765, 1996.

SOMASSUNDARAM, L. Influence of pesticides metabolites on the development of soil microorganisms: Washington: American Chemical Society, 1990.

SOUZA, A.P; FERREIRA, F.A; SILVA, A.A. Respiração microbiana do solo sob doses de glifosato e imazapir. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 17, n. 2, p. 245-262, 1994.

SPADOTTO, C.A. Classificação do impacto ambiental. Comitê do Meio Ambiente. Viçosa: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas. 2002.

STOUT, L.D; RUECKER, F.A. Chronic study of glyphosate administered in feed to labino rats. Saint Louis, 1990. **Unpublished Report Monsanto Environmental Health Laboratory**

STROF, W; KUB'S, K; KAFARSKI, P. The ability of soil-borne fungi to degradate organophosphonate carbon to phosphorous bonds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 48, p. 549-552, 1997.

TERNAN, N.G; McMULLAN, G; QUINN, P. Review: organohosphonates: occurrence, synthesis and biodegradation by microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Amsterdam, v. 14, p. 635-647, 1998.

TERNAN, N.G; McMULLAN, G. The utilization of 4-aminobutylphosphonate as sole nitrogen source by a strain of *Kluveromyces fragilis*. **FEMS Microbiology Letters**, London, v. 184, p. 237-240, 2000.

TEKERE, M; INCUBE, I; READ, J.S; ZVAUYA, R. Biodegradation of the organochlorine pesticide, lindane by a sub-tropical white rot fungus in batch and packed bed bioreactor systems. **Environmental Technology**, London, v. 23, p. 199-206, 2002.

WACKETT, P.L; ELLIS, L.B.M. Predicting Biodegradation. **Environmental Microbiology**, Boston, v. 1, p. 119-124, 1999.

WARDLE, D.A; PARKINSON, D. Influence of the herbicide glyphosate on soil microbial community structure. **Plant and Soil**, Amsterdam, v. 122, n. 1, p.29-37, 1990.

WARDLE, D.A; PARKINSON, D. The influence of the herbicide glyphosate on interspecific interactions between four soil fungal species. **Mycological Research**, London, v. 96, n. 3, p. 180-186, 1992.

WILLIAMS, G.M; KROES, R; MUNRO, I.C. Safety evaluation and risk assesement of the herbicide round up and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, London, v. 31, p. 117-165, 2000.

WHITE, A.K; METCALF, W.W. Two C-P Lyase operons in *Pseudomonas stutzeri* and their roles in the oxidation of phosphonates, phosphite, and hypophosphite. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 186, n. 14, p. 4730-4739, 2004.

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



## 7. ANEXOS

Nesta seção estão apresentadas as análises estatísticas utilizadas nos dados experimentais.

### 1 Oneway

Descriptives CO2								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
<b>1</b>	6	28,33	10,46	4,27	17,35	39,31	15	45
<b>2</b>	6	54,17	21,52	8,78	31,59	76,75	25	86
<b>3</b>	6	42,00	17,38	7,09	23,76	60,24	22	71
<b>4</b>	6	79,83	33,86	13,82	44,30	115,37	32	125
<b>5</b>	6	87,67	36,57	14,93	49,29	126,04	38	143
<b>6</b>	6	100,67	35,52	14,50	63,39	137,94	46	146
<b>Total</b>	36	65,44	36,67	6,11	53,04	77,85	15	146

Test of Homogeneity of Variances CO2			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,550	5	30	,204

ANOVA CO2					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>Between Groups</b>	23973,222	5	4794,644	6,227	,000
<b>Within Groups</b>	23097,667	30	769,922		
<b>Total</b>	47070,889	35			

## 2 Post Hoc Tests

Multiple Comparisons Dependent Variable: CO2 Tukey HSD						
		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
(I) TRAT	(J) TRAT				Lower Bound	Upper Bound
1	1					
	2	-25,83	16,02	,597	-74,56	22,89
	3	-13,67	16,02	,955	-62,39	35,06
	4	-51,50(*)	16,02	,034	-100,23	-2,77
	5	-59,33(*)	16,02	,010	-108,06	-10,61
	6	-72,33(*)	16,02	,001	-121,06	-23,61
2	1	25,83	16,02	,597	-22,89	74,56
	2					
	3	12,17	16,02	,972	-36,56	60,89
	4	-25,67	16,02	,604	-74,39	23,06

	5	-33,50	16,02	,319	-82,23	15,23
	6	-46,50	16,02	,068	-95,23	2,23
3	1	13,67	16,02	,955	-35,06	62,39
	2	-12,17	16,02	,972	-60,89	36,56
	3					
	4	-37,83	16,02	,202	-86,56	10,89
	5	-45,67	16,02	,076	-94,39	3,06
	6	-58,67(*)	16,02	,011	-107,39	-9,94
4	1	51,50(*)	16,02	,034	2,77	100,23
	2	25,67	16,02	,604	-23,06	74,39
	3	37,83	16,02	,202	-10,89	86,56
	4					
	5	-7,83	16,02	,996	-56,56	40,89
	6	-20,83	16,02	,782	-69,56	27,89
5	1	59,33(*)	16,02	,010	10,61	108,06
	2	33,50	16,02	,319	-15,23	82,23
	3	45,67	16,02	,076	-3,06	94,39
	4	7,83	16,02	,996	-40,89	56,56
	5					
	6	-13,00	16,02	,963	-61,73	35,73
6	1	72,33(*)	16,02	,001	23,61	121,06
	2	46,50	16,02	,068	-2,23	95,23
	3	58,67(*)	16,02	,011	9,94	107,39
	4	20,83	16,02	,782	-27,89	69,56
	5	13,00	16,02	,963	-35,73	61,73
	6					
* The mean difference is significant at the .05 level.						

### 3 Homogeneous Subsets

CO2 Tukey HSD				
Subset for alpha = .05				
TRAT	N	1	2	3
1	6	28,33		
3	6	42,00	42,00	
2	6	54,17	54,17	54,17
4	6		79,83	79,83
5	6		87,67	87,67
6	6			100,67
<b>Sig.</b>		,597	,076	,068
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.				
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.				

### 4 Oneway

Notes		
<b>Output Created</b>	27-JAN-2006 10:00:00	
<b>Comments</b>		
<b>Input</b>	<b>Data</b>	
	<b>Filter</b>	<none>
	<b>Weight</b>	<none>
	<b>Split File</b>	<none>
	<b>N of Rows in Working Data File</b>	12
<b>Missing Value Handling</b>	<b>Definition of Missing</b>	User-defined missing values are treated as missing.
	<b>Cases Used</b>	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.

<b>Syntax</b>		ONEWAY glif BY fungo /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC = TUKEY ALPHA(.05).
<b>Resources</b>	<b>Elapsed Time</b>	
<b>Resources</b>	<b>Elapsed Time</b>	0:00:00,11

Descriptives GLIF								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
<b>1</b>	2	17,50	6,36	4,50	-39,68	74,68	13	22
<b>2</b>	2	18,50	4,95	3,50	-25,97	62,97	15	22
<b>3</b>	2	18,00	5,66	4,00	-32,82	68,82	14	22
<b>4</b>	2	18,50	4,95	3,50	-25,97	62,97	15	22
<b>5</b>	2	20,00	2,83	2,00	-5,41	45,41	18	22
<b>6</b>	2	19,50	3,54	2,50	-12,27	51,27	17	22
<b>Total</b>	12	18,67	3,70	1,07	16,32	21,02	13	22

Test of Homogeneity of Variances GLIF			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1816174439247381,000	5	6	,000



					Lower Bound	Upper Bound		
<b>1</b>	3	17,00	4,58	2,65	5,62	28,38	12	21
<b>2</b>	3	16,00	4,36	2,52	5,17	26,83	11	19
<b>3</b>	3	16,00	3,61	2,08	7,04	24,96	12	19
<b>Total</b>	9	16,33	3,67	1,22	13,51	19,16	11	21

**Test of Homogeneity of Variances**  
GLIF

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,148	2	6	,865

**ANOVA**  
GLIF

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>Between Groups</b>	2,000	2	1,000	,057	,945
<b>Within Groups</b>	106,000	6	17,667		
<b>Total</b>	108,000	8			

## 6 Oneway

<b>Notes</b>		
<b>Output Created</b>	27-JAN-2006 10:06:38	
<b>Comments</b>		
<b>Input</b>	<b>Data</b>	
	<b>Filter</b>	<none>
	<b>Weight</b>	<none>
	<b>Split File</b>	<none>
	<b>N of Rows in Working Data File</b>	12

<b>Missing Value Handling</b>	<b>Definition of Missing</b>	User-defined missing values are treated as missing.
	<b>Cases Used</b>	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
<b>Syntax</b>		ONEWAY massa BY fungo /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC = TUKEY ALPHA(.05).
<b>Resources</b>	<b>Elapsed Time</b>	
<b>Resources</b>	<b>Elapsed Time</b>	0:00:00,10

<b>Descriptives</b> MASSA								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
<b>1</b>	2	2,00	,00	,00	2,00	2,00	2	2
<b>2</b>	2	2,50	2,12	1,50	-16,56	21,56	1	4
<b>3</b>	2	1,50	,71	,50	-4,85	7,85	1	2
<b>4</b>	2	1,50	,71	,50	-4,85	7,85	1	2
<b>5</b>	2	1,00	,00	,00	1,00	1,00	1	1
<b>6</b>	2	1,00	,00	,00	1,00	1,00	1	1
<b>Total</b>	12	1,58	,90	,26	1,01	2,16	1	4

<b>ANOVA</b> MASSA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>Between Groups</b>	3,417	5	,683	,745	,618
<b>Within Groups</b>	5,500	6	,917		
<b>Total</b>	8,917	11			



## 7 Oneway

Notes		
<b>Output Created</b>	27-JAN-2006 10:17:00	
<b>Comments</b>		
<b>Input</b>	<b>Data</b>	
	<b>Filter</b>	<none>
	<b>Weight</b>	<none>
	<b>Split File</b>	<none>
	<b>N of Rows in Working Data File</b>	12
<b>Missing Value Handling</b>	<b>Definition of Missing</b>	User-defined missing values are treated as missing.
	<b>Cases Used</b>	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
<b>Syntax</b>	ONEWAY bac BY trat /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC = TUKEY ALPHA(.05).	
<b>Resources</b>	<b>Elapsed Time</b>	
<b>Resources</b>	<b>Elapsed Time</b>	0:00:00,88

Descriptives BAC								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
<b>1</b>	2	2,50	,71	,50	-3,85	8,85	2	3
<b>2</b>	2	2,00	1,41	1,00	-10,71	14,71	1	3

<b>3</b>	2	1,50	,71	,50	-4,85	7,85	1	2
<b>4</b>	2	1,50	,71	,50	-4,85	7,85	1	2
<b>5</b>	2	1,50	,71	,50	-4,85	7,85	1	2
<b>6</b>	2	3,00	1,41	1,00	-9,71	15,71	2	4
<b>Total</b>	12	2,00	,95	,28	1,39	2,61	1	4

<b>Test of Homogeneity of Variances</b> BAC			
<b>Levene Statistic</b>	<b>df1</b>	<b>df2</b>	<b>Sig.</b>
7783436318020910,000	5	6	,000

<b>ANOVA</b> BAC					
	<b>Sum of Squares</b>	<b>df</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
<b>Between Groups</b>	4,000	5	,800	,800	,588
<b>Within Groups</b>	6,000	6	1,000		
<b>Total</b>	10,000	11			

## 8 Oneway

<b>Notes</b>		
<b>Output Created</b>		27-JAN-2006 10:17:13
<b>Comments</b>		
<b>Input</b>	<b>Data</b>	
	<b>Filter</b>	<none>
	<b>Weight</b>	<none>
	<b>Split File</b>	<none>
	<b>N of Rows in Working Data File</b>	
<b>Missing Value Handling</b>	<b>Definition of Missing</b>	User-defined missing values are treated as missing.

	<b>Cases Used</b>	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
<b>Syntax</b>		ONEWAY fungo BY trat /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC = TUKEY ALPHA(.05).
<b>Resources</b>	<b>Elapsed Time</b>	
<b>Resources</b>	<b>Elapsed Time</b>	0:00:00,05

Descriptives FUNGO								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	2	1,00	,00	,00	1,00	1,00	1	1
2	2	,00	,00	,00	,00	,00	0	0
3	2	,50	,71	,50	-5,85	6,85	0	1
4	2	,50	,71	,50	-5,85	6,85	0	1
5	2	1,00	,00	,00	1,00	1,00	1	1
6	2	1,00	,00	,00	1,00	1,00	1	1
<b>Total</b>	12	,67	,49	,14	,35	,98	0	1

Test of Homogeneity of Variances(a)	
<b>Dummy category</b>	
a Test of homogeneity of variances cannot be performed for FUNGO because the sum of caseweights is less than the number of groups.	

ANOVA FUNGO					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,667	5	,333	2,000	,212
Within Groups	1,000	6	,167		
Total	2,667	11			

## 9 Oneway

Notes		
<b>Output Created</b>	27-JAN-2006 13:31:38	
<b>Comments</b>		
<b>Input</b>	<b>Data</b>	
	<b>Filter</b>	<none>
	<b>Weight</b>	<none>
	<b>Split File</b>	<none>
	<b>N of Rows in Working Data File</b>	42
<b>Missing Value Handling</b>	<b>Definition of Missing</b>	User-defined missing values are treated as missing.
	<b>Cases Used</b>	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
<b>Syntax</b>	ONEWAY co2 BY trat /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC = TUKEY ALPHA(.05).	
<b>Resources</b>	<b>Elapsed Time</b>	
<b>Resources</b>	<b>Elapsed Time</b>	0:00:00,66

Descriptives CO2								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	6	60,17	29,02	11,85	29,71	90,62	20	99
2	6	71,83	48,29	19,71	21,16	122,51	17	145
3	6	83,17	49,44	20,18	31,28	135,05	23	162
4	6	88,33	41,34	16,88	44,95	131,72	26	141
5	6	104,00	35,92	14,66	66,31	141,69	58	160
6	6	221,17	136,30	55,65	78,13	364,21	37	395
7	6	63,17	45,96	18,76	14,94	111,40	12	134
<b>Total</b>	42	98,83	79,57	12,28	74,04	123,63	12	395

Test of Homogeneity of Variances CO2			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5,204	6	35	,001

ANOVA CO2					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>Between Groups</b>	113064,333	6	18844,056	4,501	,002
<b>Within Groups</b>	146541,500	35	4186,900		
<b>Total</b>	259605,833	41			

## 10 Post Hoc Tests

Multiple Comparisons Dependent Variable: CO2 Tukey HSD						
		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
(I) TRAT	(J) TRAT				Lower Bound	Upper Bound
1	1					
	2	-11,67	37,36	1,000	-128,45	105,11
	3	-23,00	37,36	,996	-139,78	93,78
	4	-28,17	37,36	,988	-144,95	88,61
	5	-43,83	37,36	,899	-160,61	72,95
	6	-161,00(*)	37,36	,002	-277,78	-44,22
	7	-3,00	37,36	1,000	-119,78	113,78
2	1	11,67	37,36	1,000	-105,11	128,45
	2					
	3	-11,33	37,36	1,000	-128,11	105,45
	4	-16,50	37,36	,999	-133,28	100,28
	5	-32,17	37,36	,976	-148,95	84,61
	6	-149,33(*)	37,36	,005	-266,11	-32,55
	7	8,67	37,36	1,000	-108,11	125,45
3	1	23,00	37,36	,996	-93,78	139,78
	2	11,33	37,36	1,000	-105,45	128,11
	3					
	4	-5,17	37,36	1,000	-121,95	111,61
	5	-20,83	37,36	,998	-137,61	95,95
	6	-138,00(*)	37,36	,012	-254,78	-21,22
	7	20,00	37,36	,998	-96,78	136,78
4	1	28,17	37,36	,988	-88,61	144,95

	2	16,50	37,36	,999	-100,28	133,28
	3	5,17	37,36	1,000	-111,61	121,95
	4					
	5	-15,67	37,36	1,000	-132,45	101,11
	6	-132,83(*)	37,36	,017	-249,61	-16,05
	7	25,17	37,36	,993	-91,61	141,95
	5	1	43,83	37,36	,899	-72,95
2		32,17	37,36	,976	-84,61	148,95
3		20,83	37,36	,998	-95,95	137,61
4		15,67	37,36	1,000	-101,11	132,45
5						
6		-117,17(*)	37,36	,049	-233,95	-,39
7		40,83	37,36	,926	-75,95	157,61
6	1	161,00(*)	37,36	,002	44,22	277,78
	2	149,33(*)	37,36	,005	32,55	266,11
	3	138,00(*)	37,36	,012	21,22	254,78
	4	132,83(*)	37,36	,017	16,05	249,61
	5	117,17(*)	37,36	,049	,39	233,95
	6					
	7	158,00(*)	37,36	,003	41,22	274,78
7	1	3,00	37,36	1,000	-113,78	119,78
	2	-8,67	37,36	1,000	-125,45	108,11
	3	-20,00	37,36	,998	-136,78	96,78
	4	-25,17	37,36	,993	-141,95	91,61
	5	-40,83	37,36	,926	-157,61	75,95
	6	-158,00(*)	37,36	,003	-274,78	-41,22
	7					
* The mean difference is significant at the .05 level.						

## 11 Homogeneous Subsets

CO2 Tukey HSD			
Subset for alpha = .05			
TRAT	N	1	2
1	6	60,17	
7	6	63,17	
2	6	71,83	
3	6	83,17	
4	6	88,33	
5	6	104,00	
6	6		221,17
<b>Sig.</b>		,899	1,000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.			
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000.			

## 12 Oneway

Notes		
<b>Output Created</b>	27-JAN-2006 13:38:19	
<b>Comments</b>		
<b>Input</b>	<b>Data</b>	
	<b>Filter</b>	<none>
	<b>Weight</b>	<none>
	<b>Split File</b>	<none>
	<b>N of Rows in Working Data File</b>	8
<b>Missing Value Handling</b>	<b>Definition of Missing</b>	User-defined missing values are treated as missing.



	<b>Cases Used</b>	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
<b>Syntax</b>		ONEWAY massa55 BY meios /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS .
<b>Resources</b>	<b>Elapsed Time</b>	
<b>Resources</b>	<b>Elapsed Time</b>	0:00:00,71

Descriptives MASSA55								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
<b>1</b>	2	2,00	,00	,00	2,00	2,00	2	2
<b>2</b>	2	2,00	,00	,00	2,00	2,00	2	2
<b>3</b>	2	4,00	,00	,00	4,00	4,00	4	4
<b>4</b>	2	11,50	13,44	9,50	-109,21	132,21	2	21
<b>Total</b>	8	4,88	6,58	2,33	-,62	10,37	2	21

ANOVA MASSA55					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>Between Groups</b>	122,375	3	40,792	,904	,514
<b>Within Groups</b>	180,500	4	45,125		
<b>Total</b>	302,875	7			

## 13 Oneway

Notes	
<b>Output Created</b>	27-JAN-2006 13:39:20

<b>Comments</b>		
<b>Input</b>	<b>Data</b>	
	<b>Filter</b>	<none>
	<b>Weight</b>	<none>
	<b>Split File</b>	<none>
	<b>N of Rows in Working Data File</b>	8
<b>Missing Value Handling</b>	<b>Definition of Missing</b>	User-defined missing values are treated as missing.
	<b>Cases Used</b>	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
<b>Syntax</b>	ONEWAY massa91 BY meios /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC = TUKEY ALPHA(.05).	
<b>Resources</b>	<b>Elapsed Time</b>	
<b>Resources</b>	<b>Elapsed Time</b>	0:00:00,11

<b>Descriptives</b> MASSA91								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
<b>1</b>	2	10,00	,00	,00	10,00	10,00	10	10
<b>2</b>	2	13,50	,71	,50	7,15	19,85	13	14
<b>3</b>	2	13,50	,71	,50	7,15	19,85	13	14
<b>4</b>	2	11,50	,71	,50	5,15	17,85	11	12
<b>Total</b>	8	12,13	1,64	,58	10,75	13,50	10	14

<b>ANOVA</b>
--------------

MASSA91					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
<b>Between Groups</b>	17,375	3	5,792	15,444	,012
<b>Within Groups</b>	1,500	4	,375		
<b>Total</b>	18,875	7			

## 14 Post Hoc Tests

Multiple Comparisons Dependent Variable: MASSA91 Tukey HSD						
(I) MEIOS	(J) MEIOS	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
<b>1</b>	1					
	2	-3,50(*)	,61	,016	-5,99	-1,01
	3	-3,50(*)	,61	,016	-5,99	-1,01
	4	-1,50	,61	,209	-3,99	,99
<b>2</b>	1	3,50(*)	,61	,016	1,01	5,99
	2					
	3	,00	,61	1,000	-2,49	2,49
	4	2,00	,61	,098	-,49	4,49
<b>3</b>	1	3,50(*)	,61	,016	1,01	5,99
	2	,00	,61	1,000	-2,49	2,49
	3					
	4	2,00	,61	,098	-,49	4,49
<b>4</b>	1	1,50	,61	,209	-,99	3,99
	2	-2,00	,61	,098	-4,49	,49
	3	-2,00	,61	,098	-4,49	,49

	4					
* The mean difference is significant at the .05 level.						

## 15 Oneway

Notes		
<b>Output Created</b>	27-JAN-2006 13:53:41	
<b>Comments</b>		
<b>Input</b>	<b>Data</b>	
	<b>Filter</b>	<none>
	<b>Weight</b>	<none>
	<b>Split File</b>	<none>
	<b>N of Rows in Working Data File</b>	10
<b>Missing Value Handling</b>	<b>Definition of Missing</b>	User-defined missing values are treated as missing.
	<b>Cases Used</b>	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
<b>Syntax</b>	ONEWAY mcomp gli10 sc sn sp BY fungo /STATISTICS DESCRIPTIVES HOMOGENEITY /MISSING ANALYSIS /POSTHOC = TUKEY ALPHA(.05).	
<b>Resources</b>	<b>Elapsed Time</b>	
<b>Resources</b>	<b>Elapsed Time</b>	0:00:00,76

Descriptives									
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
<b>MCOMP</b>	<b>1</b>	2	35,0650	,5162	,3650	30,4272	39,7028	34,70	35,43

	2	2	4,1250	3,536E-02	2,500E-02	3,8073	4,4427	4,10	4,15
	3	2	11,9400	,1273	9,000E-02	10,7964	13,0836	11,85	12,03
	4	2	38,3100	1,414E-02	1,000E-02	38,1829	38,4371	38,30	38,32
	5	2	2,9900	5,657E-02	4,000E-02	2,4818	3,4982	2,95	3,03
	<b>Total</b>	10	18,4860	16,0362	5,0711	7,0144	29,9576	2,95	38,32
<b>GLI10</b>	1	2	1,0700	8,485E-02	6,000E-02	,3076	1,8324	1,01	1,13
	2	2	,3900	7,071E-02	5,000E-02	-,2453	1,0253	,34	,44
	3	2	,6400	,0000	,0000	,6400	,6400	,64	,64
	4	2	,5100	4,243E-02	3,000E-02	,1288	,8912	,48	,54
	5	2	2,2600	,0000	,0000	2,2600	2,2600	2,26	2,26
	<b>Total</b>	10	,9740	,7208	,2279	,4584	1,4896	,34	2,26
<b>SC</b>	1	2	1,0700	,1131	8,000E-02	5,350E-02	2,0865	,99	1,15
	2	2	2,500E-02	7,071E-03	5,000E-03	3,8531E-02	8,853E-02	,02	,03
	3	2	9,000E-02	1,414E-02	1,000E-02	3,7062E-02	,2171	,08	,10
	4	2	9,500E-02	7,071E-03	5,000E-03	3,147E-02	,1585	,09	,10
	5	2	,5750	7,778E-02	5,500E-02	-,1238	1,2738	,52	,63
	<b>Total</b>	10	,3710	,4255	,1345	6,663E-02	,6754	,02	1,15
<b>SN</b>	1	2	2,6900	5,657E-02	4,000E-02	2,1818	3,1982	2,65	2,73
	2	2	,6450	7,071E-03	5,000E-03	,5815	,7085	,64	,65
	3	2	,6550	3,536E-02	2,500E-02	,3373	,9727	,63	,68

	4	2	1,9750	7,071E-03	5,000E-03	1,9115	2,0385	1,97	1,98
	5	2	,6600	5,657E-02	4,000E-02	,1518	1,1682	,62	,70
	<b>Total</b>	10	1,3250	,8998	,2845	,6813	1,9687	,62	2,73
<b>SP</b>	1	2	1,7000	,2121	,1500	-,2059	3,6059	1,55	1,85
	2	2	,2850	7,071E-03	5,000E-03	,2215	,3485	,28	,29
	3	2	,1950	6,364E-02	4,500E-02	-,3768	,7668	,15	,24
	4	2	1,7000	,1980	,1400	7,8869E-02	3,4789	1,56	1,84
	5	2	1,9050	7,071E-03	5,000E-03	1,8415	1,9685	1,90	1,91
	<b>Total</b>	10	1,1570	,7999	,2529	,5848	1,7292	,15	1,91

<b>ANOVA</b>						
		<b>Sum of Squares</b>	<b>df</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
<b>MCOMP</b>	<b>Between Groups</b>	2314,137	4	578,534	10068,471	,000
	<b>Within Groups</b>	,287	5	5,746E-02		
	<b>Total</b>	2314,425	9			
<b>GLI10</b>	<b>Between Groups</b>	4,662	4	1,165	416,236	,000
	<b>Within Groups</b>	1,400E-02	5	2,800E-03		
	<b>Total</b>	4,676	9			
<b>SC</b>	<b>Between Groups</b>	1,610	4	,403	105,101	,000
	<b>Within Groups</b>	1,915E-02	5	3,830E-03		
	<b>Total</b>	1,629	9			
<b>SN</b>	<b>Between Groups</b>	7,279	4	1,820	1173,952	,000
	<b>Within Groups</b>	7,750E-03	5	1,550E-03		
	<b>Total</b>	7,286	9			
<b>SP</b>	<b>Between Groups</b>	5,670	4	1,418	80,222	,000
	<b>Within Groups</b>	8,835E-02	5	1,767E-02		

	<b>Total</b>	5,758	9			
--	--------------	-------	---	--	--	--

## 16 Post Hoc Tests

Multiple Comparisons Tukey HSD							
Dependent Variable	(I) FUNGO	(J) FUNGO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
MCOMP	1	1					
		2	30,9400(*)	,2397	,000	29,9784	31,9016
		3	23,1250(*)	,2397	,000	22,1634	24,0866
		4	-3,2450(*)	,2397	,000	-4,2066	-2,2834
		5	32,0750(*)	,2397	,000	31,1134	33,0366
	2	1	-30,9400(*)	,2397	,000	-31,9016	-29,9784
		2					
		3	-7,8150(*)	,2397	,000	-8,7766	-6,8534
		4	-34,1850(*)	,2397	,000	-35,1466	-33,2234
		5	1,1350(*)	,2397	,026	,1734	2,0966
	3	1	-23,1250(*)	,2397	,000	-24,0866	-22,1634
		2	7,8150(*)	,2397	,000	6,8534	8,7766
		3					
		4	-26,3700(*)	,2397	,000	-27,3316	-25,4084
		5	8,9500(*)	,2397	,000	7,9884	9,9116
	4	1	3,2450(*)	,2397	,000	2,2834	4,2066
		2	34,1850(*)	,2397	,000	33,2234	35,1466
		3	26,3700(*)	,2397	,000	25,4084	27,3316
		4					
		5	35,3200(*)	,2397	,000	34,3584	36,2816

	5	1	-32,0750(*)	,2397	,000	-33,0366	-31,1134
		2	-1,1350(*)	,2397	,026	-2,0966	-,1734
		3	-8,9500(*)	,2397	,000	-9,9116	-7,9884
		4	-35,3200(*)	,2397	,000	-36,2816	-34,3584
		5					
GLI10	1	1					
		2	,6800(*)	5,292E-02	,000	,4677	,8923
		3	,4300(*)	5,292E-02	,002	,2177	,6423
		4	,5600(*)	5,292E-02	,001	,3477	,7723
		5	-1,1900(*)	5,292E-02	,000	-1,4023	-,9777
	2	1	-,6800(*)	5,292E-02	,000	-,8923	-,4677
		2					
		3	-,2500(*)	5,292E-02	,026	-,4623	3,7729E-02
		4	-,1200	5,292E-02	,290	-,3323	9,227E-02
		5	-1,8700(*)	5,292E-02	,000	-2,0823	-1,6577
	3	1	-,4300(*)	5,292E-02	,002	-,6423	-,2177
		2	,2500(*)	5,292E-02	,026	3,773E-02	,4623
		3					
		4	,1300	5,292E-02	,238	8,2271E-02	-,3423
		5	-1,6200(*)	5,292E-02	,000	-1,8323	-1,4077
	4	1	-,5600(*)	5,292E-02	,001	-,7723	-,3477



		2	,1200	5,292E-02	,290	-	9,2271E-02	,3323
		3	-,1300	5,292E-02	,238	-,3423		8,227E-02
		4						
		5	-1,7500(*)	5,292E-02	,000	-1,9623		-1,5377
	5	1	1,1900(*)	5,292E-02	,000	,9777		1,4023
		2	1,8700(*)	5,292E-02	,000	1,6577		2,0823
		3	1,6200(*)	5,292E-02	,000	1,4077		1,8323
		4	1,7500(*)	5,292E-02	,000	1,5377		1,9623
		5						
SC	1	1						
		2	1,0450(*)	6,189E-02	,000	,7967		1,2933
		3	,9800(*)	6,189E-02	,000	,7317		1,2283
		4	,9750(*)	6,189E-02	,000	,7267		1,2233
		5	,4950(*)	6,189E-02	,003	,2467		,7433
	2	1	-1,0450(*)	6,189E-02	,000	-1,2933		-,7967
		2						
		3	-6,5000E-02	6,189E-02	,824	-,3133		,1833
		4	-7,0000E-02	6,189E-02	,787	-,3183		,1783
		5	-,5500(*)	6,189E-02	,002	-,7983		-,3017
	3	1	-,9800(*)	6,189E-02	,000	-1,2283		-,7317

		2	6,500E-02	6,189E-02	,824	-,1833	,3133
		3					
		4	-5,000E-03	6,189E-02	1,000	-,2533	,2433
		5	-,4850(*)	6,189E-02	,003	-,7333	-,2367
	4	1	-,9750(*)	6,189E-02	,000	-1,2233	-,7267
		2	7,000E-02	6,189E-02	,787	-,1783	,3183
		3	5,000E-03	6,189E-02	1,000	-,2433	,2533
		4					
		5	-,4800(*)	6,189E-02	,003	-,7283	-,2317
	5	1	-,4950(*)	6,189E-02	,003	-,7433	-,2467
		2	,5500(*)	6,189E-02	,002	,3017	,7983
		3	,4850(*)	6,189E-02	,003	,2367	,7333
		4	,4800(*)	6,189E-02	,003	,2317	,7283
		5					
SN	1	1					
		2	2,0450(*)	3,937E-02	,000	1,8871	2,2029
		3	2,0350(*)	3,937E-02	,000	1,8771	2,1929
		4	,7150(*)	3,937E-02	,000	,5571	,8729
		5	2,0300(*)	3,937E-02	,000	1,8721	2,1879
	2	1	-2,0450(*)	3,937E-02	,000	-2,2029	-1,8871
		2					

		3	-1,0000E-02	3,937E-02	,999	-,1679	,1479
		4	-1,3300(*)	3,937E-02	,000	-1,4879	-1,1721
		5	-1,5000E-02	3,937E-02	,994	-,1729	,1429
	3	1	-2,0350(*)	3,937E-02	,000	-2,1929	-1,8771
		2	1,000E-02	3,937E-02	,999	-,1479	,1679
		3					
		4	-1,3200(*)	3,937E-02	,000	-1,4779	-1,1621
		5	-5,0000E-03	3,937E-02	1,000	-,1629	,1529
	4	1	-,7150(*)	3,937E-02	,000	-,8729	-,5571
		2	1,3300(*)	3,937E-02	,000	1,1721	1,4879
		3	1,3200(*)	3,937E-02	,000	1,1621	1,4779
		4					
		5	1,3150(*)	3,937E-02	,000	1,1571	1,4729
	5	1	-2,0300(*)	3,937E-02	,000	-2,1879	-1,8721
		2	1,500E-02	3,937E-02	,994	-,1429	,1729
		3	5,000E-03	3,937E-02	1,000	-,1529	,1629
		4	-1,3150(*)	3,937E-02	,000	-1,4729	-1,1571
		5					
SP	1	1					
		2	1,4150(*)	,1329	,001	,8818	1,9482
		3	1,5050(*)	,1329	,001	,9718	2,0382
		4	,0000	,1329	1,000	-,5332	,5332

		<b>5</b>	- ,2050	,1329	,582	-,7382	,3282
	<b>2</b>	<b>1</b>	-1,4150(*)	,1329	,001	-1,9482	-,8818
		<b>2</b>					
		<b>3</b>	9,000E-02	,1329	,953	-,4432	,6232
		<b>4</b>	-1,4150(*)	,1329	,001	-1,9482	-,8818
		<b>5</b>	-1,6200(*)	,1329	,000	-2,1532	-1,0868
		<b>3</b>	<b>1</b>	-1,5050(*)	,1329	,001	-2,0382
	<b>2</b>		-9,0000E-02	,1329	,953	-,6232	,4432
	<b>3</b>						
	<b>4</b>		-1,5050(*)	,1329	,001	-2,0382	-,9718
	<b>5</b>		-1,7100(*)	,1329	,000	-2,2432	-1,1768
	<b>4</b>	<b>1</b>	,0000	,1329	1,000	-,5332	,5332
		<b>2</b>	1,4150(*)	,1329	,001	,8818	1,9482
		<b>3</b>	1,5050(*)	,1329	,001	,9718	2,0382
		<b>4</b>					
		<b>5</b>	-,2050	,1329	,582	-,7382	,3282
	<b>5</b>	<b>1</b>	,2050	,1329	,582	-,3282	,7382
		<b>2</b>	1,6200(*)	,1329	,000	1,0868	2,1532
		<b>3</b>	1,7100(*)	,1329	,000	1,1768	2,2432
		<b>4</b>	,2050	,1329	,582	-,3282	,7382
		<b>5</b>					

\* The mean difference is significant at the .05 level.