

ISSN 1516-8840

Novembro, 2010

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Clima Temperado
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documento 308

Metodologia para Obtenção de Fungos Degradadores do Herbicida Glifosato

*Maria Laura Turino Mattos
Maria do Carmo Ruaro Peralba
Francisco de Jesus Verneti Junior
Ieda Baade dos Santos*

Embrapa Clima Temperado
Pelotas, RS
2010

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado
BR 392 Km 78
Caixa Postal 403, CEP 96010-971- Pelotas, RS
Fone: (53) 3275-8199
Fax: (53) 3275-8219 – 3275-8221
Home Page: www.cpact.embrapa.br
e-mail: sac@cpact.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: Ariano Martins de Magalhães Júnior
Secretária - Executiva: Joseane Mary Lopes Garcia
Membros: Márcia Vizzotto, Ana Paula Schneid Afonso, Giovani Theisen, Luis Antônio Suita de Castro, Flávio Luiz Carpena Carvalho, Christiane Rodrigues Congro, Regina das Graças Vasconcelos dos Santos.
Suplentes: Isabel Helena Vernetti Azambuja e Beatriz Marti Emygdio.

Supervisão editorial: Antônio Luiz Oliveira Heberlê
Revisão de texto: Ana Luiza Barragana Viegas
Normalização bibliográfica: Graciela Olivella Oliveira
Editoração eletrônica e arte da capa: Manuela Meurer Doerr (estagiária)

1ª edição
1ª impressão (2010): 50 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei N° 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Embrapa Clima Temperado

Metodologia para obtenção de fungos degradadores do herbicida glifosato / Maria Laura Turino Mattos... [et al.] – Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010.
24 p. – (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 308).

ISSN 1516-8840

1. Herbicida. 2. Uso racional de agrotóxicos. 3. Fungos degradadores de glifosato. 4. *Oryza sativa*. I. Mattos, Maria Laura Turino. II. Série.

CDD 633.18

© Embrapa 2010

Autores

Maria Laura Turino Mattos

Eng. Agrôn., Dra., Pesquisadora da
Embrapa Clima Temperado
Pelotas, RS
maria.laura@cpact.embrapa.br

Maria do Carmo Ruaro Peralba

Química, Dra., Professora da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre, RS
mcarmo@iq.ufrgs.br

Francisco de Jesus Vernetti Junior

Eng. Agrôn., Dr., Pesquisador da
Embrapa Clima Temperado
Pelotas, RS
francisco.vernetti@cpact.embrapa.br

Ieda Baade dos Santos

Eng. Agrôn., MSc., Assistente da
Embrapa Meio Norte
Teresina, PI
ieda@cpamn.embrapa.br

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - FAPERGS, pelo auxílio financeiro.

Apresentação

A produção de alimentos sempre esteve fundamentada na exploração e aproveitamento de recursos naturais, como solo, água, clima e biodiversidade. Apenas no final do último século é que o homem atentou para a necessidade da preservação e conservação destes recursos, buscando desenvolver sistemas agrícolas sustentáveis. No caso dos sistemas de produção de grãos, em especial de arroz irrigado por inundação, em várzeas de clima subtropical, esta visão de sustentabilidade engloba, entre outros aspectos, o uso racional de agrotóxicos, precursor da minimização de custos de produção e de riscos de impacto ambiental negativo, subsidiando questões de segurança alimentar e ambiental.

A fragilidade do agroecossistema orizícola que é rico em recursos hídricos e solos hidromórficos, reporta aos estudos de comportamento ambiental de herbicidas usados em aplicações sucessivas como o glifosato, gerando preocupação com o seu impacto sobre os microrganismos do solo, responsáveis principais pela degradação de agrotóxicos no ambiente. Além disso, o germoplasma microbiano deve ser preservado, constituindo-se em patrimônio genético para bioprospecção de novos produtos e processos.

Neste trabalho apresentam-se resultados de uma metodologia para obtenção de fungos degradadores de glifosato associados à palha de arroz irrigado cultivado no sistema plantio direto, em várzea subtropical, no Rio Grande do Sul.

Waldyr Stumpf Junior
Chefe Geral
Embrapa Clima Temperado

Sumário

Introdução.....	11
Microrganismos e agrotóxicos.....	11
Sistema plantio direto: degradação do glifosfato.....	12
Amostragem da palha, isolamento da seleção de fungos .	13
Cultivo dos fungos e preparo das placas com glifosfato...	15
Identificação dos fungos	16
Resultados e discussão	17
Considerações finais	21
Referências	22

Microrganismos e agrotóxicos

Maria Laura Turino Mattos

Maria do Carmo Ruaro Peralba

Francisco de Jesus Verneti Junior

Ieda Baade dos Santos

Introdução

Muitos fatores afetam a ecologia do solo, como herbicidas e outros agrotóxicos usados na agricultura. Quando os herbicidas são aplicados em sistemas agrícolas, existe a possibilidade de que suas moléculas químicas exerçam efeitos negativos sobre a microflora do solo. Desta forma, podem influenciar processos como o fluxo de energia e a ciclagem de nutrientes, alterando a fertilidade do solo (ROSA; STORANI, 1987). Outros efeitos podem incluir mudanças nos componentes da biota do solo (bactérias, fungos, actinomicetos, algas e fauna), bem como nas características morfológicas e fisiológicas das populações de cada grupo.

Os microrganismos são capazes de degradar uma grande variedade de compostos, desde simples polissacarídeos, aminoácidos, proteínas, lipídeos, aos materiais mais complexos, como resíduos de plantas, ceras e borrachas (látex), bem como compostos químicos sintetizados pelo homem (TORSTENSSON, 1980), como agrotóxicos.

Dos organismos do solo, os fungos são os organotróficos primariamente responsáveis pela decomposição de resíduos orgânicos

(celulose, hemicelulose, lignina, quitina...) (PAUL; CLARK, 1989). Em termos de processos e biomassa, os fungos são também os organismos dominantes no solo. Em muitos solos, a biomassa dos fungos pode exceder a de outros organismos juntos (excluindo as raízes de plantas) por um fator de 10:1 (THORN, 2000), embora os fungos sejam numericamente de menor prevalência em muitos solos (PEPPER et al., 1996).

Os fungos filamentosos são os envolvidos na degradação de substratos orgânicos e, por sua vez, no comportamento e mitigação de poluição. Com uma diversidade de sistemas enzimáticos, são importantes biodegradadores de agrotóxicos. No solo, a população de fungos, medida pela contagem em placas, está na ordem de 10^6 g⁻¹ de solo (PEPPER et al., 1996).

Sistema plantio direto: degradação do glifosfato

Com a implantação do sistema plantio direto em lavouras de arroz irrigado no RS, o glifosato passou a ser muito usado nas dessecações de plantas de coberturas cultivadas e de vegetação nativa, e no controle de plantas invasoras.

Glifosato (N-(fosfonometil)glicina) é um herbicida sistêmico, de ação total, para aplicação em pós-emergência, derivado da glicina, apresentando persistência média no solo nas doses recomendadas: 30 a 90 dias, dependendo do teor de matéria orgânica e da atividade microbiana (RODRIGUES; ALMEIDA, 1995). Glifosato é degradado por microrganismos em solos, entretanto, vários metabólicos têm sido identificados (SANTOS; FLORES, 1995). Caso estes metabólicos não sejam degradados, irão persistir no solo, tornando-se, desse modo, recalcitrantes no ambiente.

Em GLEYSSOLO HÁPLICO Eutrófico, cultivado com arroz irrigado, no

Rio Grande do Sul (RS), glifosato permaneceu como resíduo ligado (MATTOS et al., 2002). Deste solo, Mattos et al. (2001 a, b) isolaram três espécies de *Pseudomonas* capazes de degradar o glifosato e seu metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA). Os autores concluíram que neste solo existem populações bacterianas indígenas degradadoras de glifosato.

Em monitoramento realizado por Mattos et al. (2002), em águas de lavouras de arroz irrigado, no município de Jaguarão, RS, foi detectado o ácido aminometilfosfônico (AMPA), principal metabólito da degradação do glifosato, em águas de canais de irrigação, até 120 dias após a aplicação deste herbicida em lavouras. Níveis de glifosato foram detectados abaixo do limite máximo permitido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos ($700 \mu\text{g L}^{-1}$).

A presença do herbicida glifosato na microbacia hidrográfica do arroio Passo do Pilão, com áreas de cultivo em semeadura direta, foi investigada por Silva et al. (2003) em amostras de água coletadas em 15 pontos deste arroio, nos períodos de 30 e 60 dia após a aplicação do herbicida. As concentrações detectadas foram menores que 500 e $700 \mu\text{g L}^{-1}$, limites máximos permitidos para o glifosato em água para consumo humano pela legislação brasileira e pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, respectivamente.

Amostragem da palha, isolamento da seleção de fungos

Para este trabalho, a área experimental constituiu-se de duas parcelas de arroz irrigado em semeadura direta, cultivadas com ervilhaca e centeio no inverno, sendo dessecadas com glifosato, no pré-plantio do arroz da safra agrícola de 1997/1998. A coleta da palha de arroz, em triplicata, foi feita em setembro de 1997. Cada amostra foi composta de cinco subamostras. Após a coleta, as amostras foram colocadas em sacos de polietileno e acondicionadas em caixa de

isopor para o transporte ao laboratório, onde foram armazenadas sob refrigeração a + 40 C. Para cada amostra de palha de arroz procedeu-se ao isolamento de fungos diretamente do tecido, desinfestando o material em uma solução de álcool a 50%, durante um minuto. Após, o material foi colocado em uma solução de hipoclorito de sódio a 1% por um minuto. O excesso de hipoclorito de sódio foi retirado com água destilada esterilizada.

De cada amostra de palha desinfestada, foram semeadas quatro placas de Petri, contendo o meio de cultura Agar Dextrose Batata (ADB) e Martin's Rosa Bengala (MRB) (PARKINSON et al., 1971). As placas foram incubadas a 28°C em presença de luz, com um fotoperíodo de 12 horas, por um período de oito dias, quando se procedeu a avaliação do crescimento micelial.

Diferentes meios [Extrato de Tomate (Meio Y8), Extrato de Malte 2% (MA2)] testes foram usados para determinar se os fungos apresentavam respostas similares às diferentes fontes de carbono. Após o crescimento em placas contendo meio MA2, cada fungo foi observado sob estereoscópio e microscópio ótico, para identificação genérica. Em seguida, foram repicados em meio ADB pH 6,0 ($\pm 0,02$), para a identificação em nível específico do grupo. As placas foram incubadas a 28°C em uma estufa BOD em presença de luz, com um fotoperíodo de 12 horas. A avaliação do crescimento micelial foi realizada após oito dias de incubação.

Por meio de preparação de lâminas microscópicas, e posterior observação em microscópio ótico, foi feita a caracterização dos fungos isolados, baseada nas características descritas por Barnett e Hunter (1972).

Cultivo dos fungos e preparo das placas com glifosfato

Os quatro fungos selecionados para o estudo foram repicados, para placas de Petri, em quadruplicata, contendo ADB e incubados por até cinco dias a 28° C. Após este período, foram retirados discos circulares (6,0 mm de diâmetro) da periferia do meio colonizado com o micélio do fungo. Estes discos foram colocados, individualmente, no centro de placas (9,0 cm de diâmetro), com meio de sais minerais (KAUFMAN; KEARNEY, 1965) [pH 5,0, 6,0 e 7,0 ($\pm 0,2$)] suplementado com 0, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mg L⁻¹ de uma formulação comercial contendo 480 g L⁻¹ de glifosato (SMG). As placas contendo o herbicida foram incubadas por seis dias a 28° C. O efeito do herbicida sobre o crescimento dos fungos testados foi avaliado nos quinto e sexto dias de incubação, pela medição do crescimento radial das colônias fúngicas (Figura 1). Os dados foram submetidos a análises de variância e comparações das médias foram feitas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

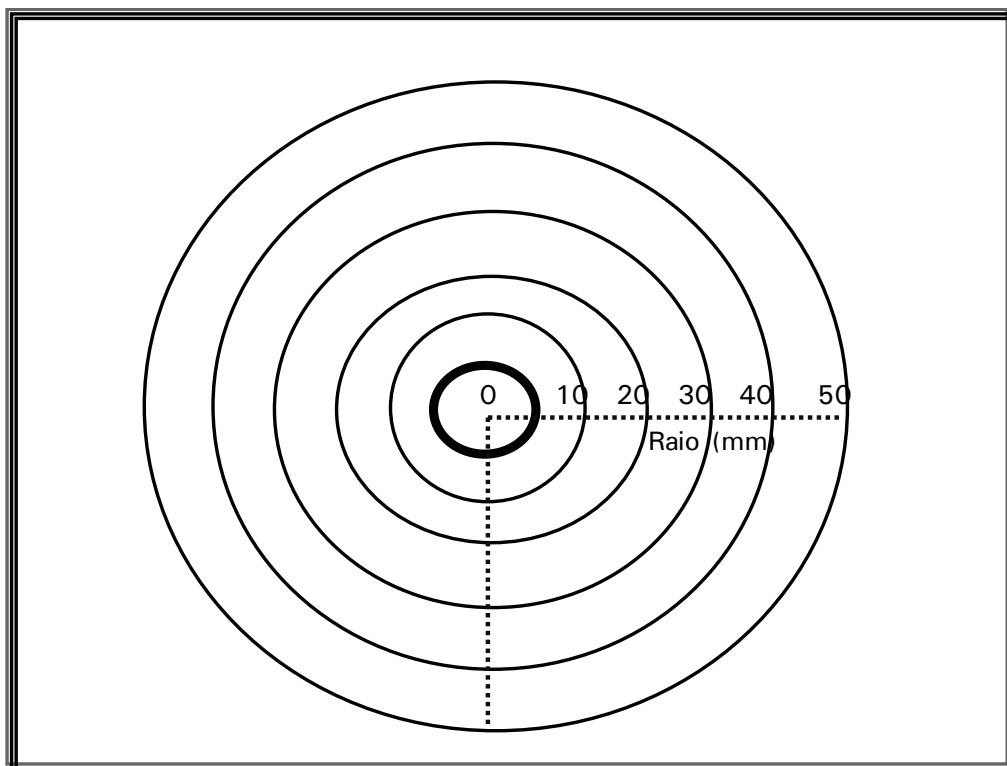


Figura: Maria Laura Turino Mattos

Figura 1. Método para medição do crescimento radial de fungos durante o período de incubação. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

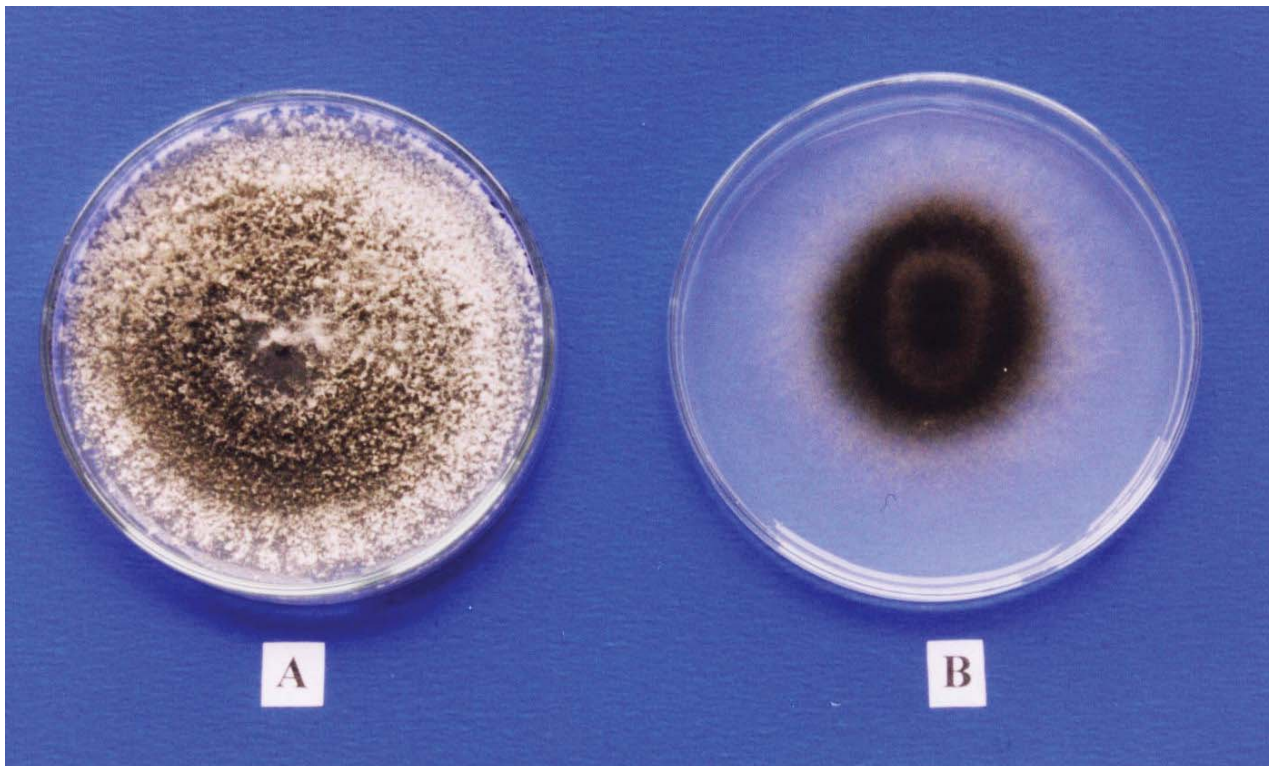
Identificação dos fungos

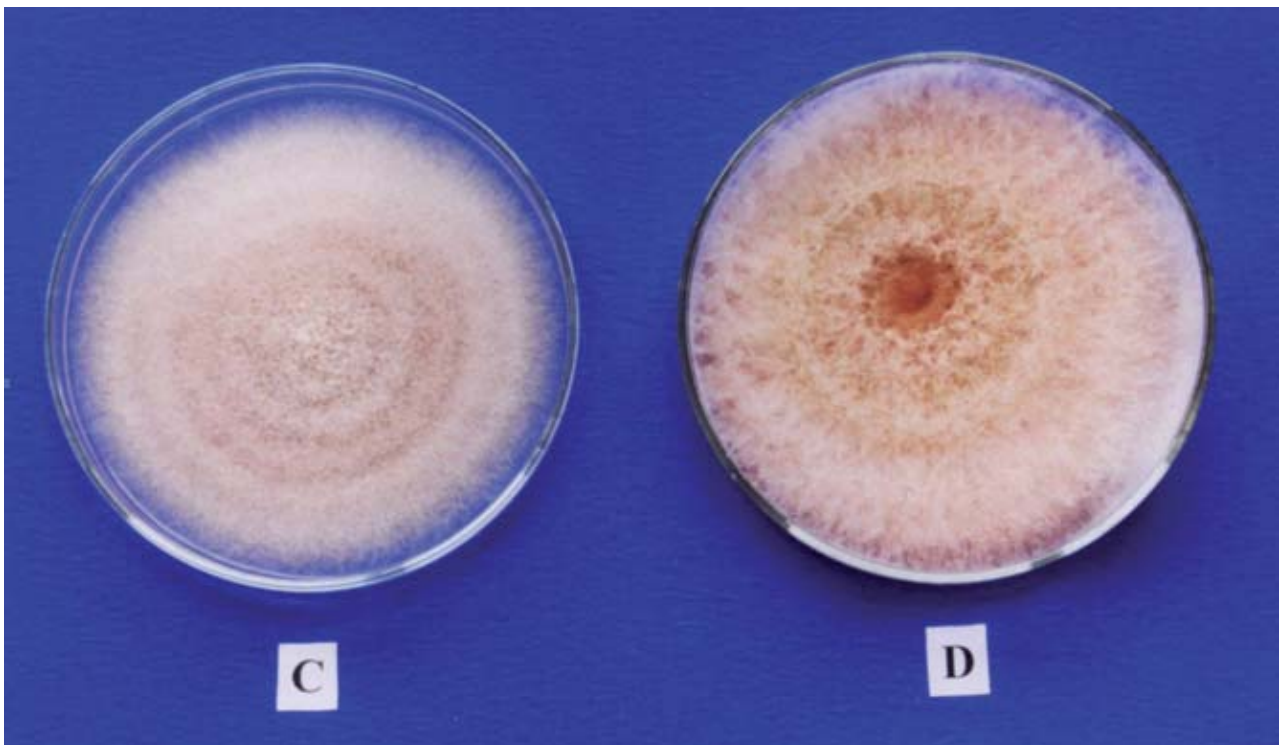
A identificação dos fungos foi baseada na análise filogenética de sequências parciais de DNA ribossomal 16S (DNAr 16S), pela Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello", SP, Brasil. Os acessos estão preservados pela técnica solo e freezer (-18° C), na Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais (CCMM) da Embrapa Clima Temperado (CCMMECT).

Resultados e discussão

Na determinação do meio de recuperação mais apropriado para o isolamento dos fungos da palha do arroz, o maior crescimento micelial dos fungos ocorreu no meio Agar Dextrose Batata (ADB), em relação ao meio Martin's Rosa Bengala (MRB). No meio ADB, os fungos foram selecionados de acordo com o crescimento micelial e características morfológicas. Quatro fungos predominantes foram escolhidos para o estudo de utilização de glifosato em formulação comercial.

As avaliações efetuadas pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello" identificaram os fungos por taxonomia molecular como: *Nigrospora sphaerica* (FA), *Cochliobolus heterostrophus* (FB), *Fusarium anthophilum* (FC) e *Micelia sterilia* (FD) (Figura 2).





Fotos: Maria Laura Turino Mattos

Figura 2. Fungos degradadores do herbicida glifosate: *Nigrospora sphaerica* (A), *Cochliobolus heterostrophus* (B), *Fusarium anthophilum* (C) e *Micelia sterilia* (D). Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

Em ADB pH 6,0 ($\pm 0,02$), *Nigrospora sphaerica* e *Micelia sterilia* necessitaram de até cinco dias para cobrir o meio da placa (9,0 cm), enquanto que para o *Fusarium anthophilum* foram necessários sete dias. *Cochliobolus heterostrophus* mostrou um crescimento mais lento, não tendo coberto a placa em até sete dias de incubação (Tabela 1).

Observou-se crescimento das colônias dos quatro fungos isolados da palha de arroz, em meio SMG, com pH 5,0, 6,0 e 7,0 ($\pm 0,02$) contendo 50, 60, 70, 80, 90 e 100 mg L⁻¹ de glifosato. No entanto, observaram-se menores crescimentos radiais para todos os fungos nas placas com o herbicida, quando comparado com o observado nas placas com o meio ADB (Tabela 1). O glifosato, em formulação comercial, não foi uma fonte de carbono de fácil assimilação pelos fungos como foi a dextrose.

Em todas as concentrações do SMG, *Nigrospora sphaerica* (A), *Cochliobolus heterostrophus* (B), *Fusarium anthophilum* (C) e *Micelia sterilia* (D), não completaram o crescimento em cinco dias de incubação para todos os valores de pH testados. Em pH 6,0 ($\pm 0,2$), nos quinto e sexto dias de incubação, os fungos B, C e D apresentaram maiores crescimentos para todas as concentrações. Porém, o crescimento do fungo C foi menor significativamente a partir de 60 mg L⁻¹ (Tabela 1).

Observaram-se efeitos inibitórios de todas as concentrações do glifosato sobre o crescimento de *Nigrospora sphaerica* (A), no quinto e sexto dia de incubação, em pH 5,0 e 6,0, em relação aos demais fungos.

Houve recuperação do crescimento de *Micelia sterilia*, em SMG pH 6,0 ($\pm 0,2$), na concentração de 100 mg L⁻¹, sendo isso um indicativo da utilização do glifosato como fonte de carbono, e da capacidade de tolerar concentrações mais elevadas de glifosato, após fase de adaptação metabólica ao novo composto. Esse comportamento pode ser devido à diversidade de sistemas enzimáticos que os fungos apresentam, qualificando-os em processos de biodegradação de agrotóxicos.

A suplementação de glifosato como fonte de carbono em meio de sais minerais determinou crescimento diferenciado para todos os organismos, revelando a complexidade das interações entre os microrganismos e os agrotóxicos. Nesse sentido, Ferreira et al. (2010) observaram que, *in vitro*, os agrotóxicos fenitrotiona, carbofurano, glifosato e azoxistrobina provocaram efeitos prejudiciais ao isolado CG 891 de *Metarhizium anisopliae*, agente de controle biológico de *Tibraca limbativentris*.

Tabela 1. Crescimento radial de fungos (cm) em meio de sais minerais suplementado com o herbicida glifosato [pH 5,0, 6,0 e 7,0 ($\pm 0,02$)], no quinto e sexto dia de incubação. Médias de quatro repetições. C.V.(%) < 10. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. 2010.

		Tempo de incubação de 5 dias											
		FUNGO ** – A			FUNGO – B			FUNGO – C			FUNGO – D		
Glifosato mg L ⁻¹		pH5	pH6	pH7	pH5	pH6	pH7	pH5	pH6	pH7	pH5	pH6	pH7
50		a*	a	c	a	a	a	a	a	a	a	a	a
		1,38	2,13	1,73	3,98	7,68	2,42	2,31	5,80	3,15	2,73	5,37	3,60
60		a	ab	a	bc	c	ab	a	b	a	c	ab	a
		1,34	1,78	2,42	2,82	5,42	2,32	2,45	5,00	3,01	2,17	3,87	3,03
70		b	b	b	b	c	c	a	b	a	c	b	a
		1,07	1,85	2,22	3,22	5,30	1,91	2,06	5,20	3,62	2,16	3,65	3,57
80		c	ab	bc	bc	b	c	a	b	a	bc	b	a
		0,95	1,75	1,87	2,75	6,30	1,76	2,36	5,10	2,68	2,4	3,25	3,25
90		bc	b	c	cd	b	a	a	b	a	b	ab	b
		1,05	1,65	1,80	2,32	6,20	2,43	2,37	5,07	2,98	2,43	3,62	2,03
100		c	b	c	d	bc	ab	a	b	a	b	ab	b
		1,00	1,32	1,53	2,03	5,87	2,28	2,32	5,15	2,68	2,42	4,32	2,23
		Tempo de incubação de 6 dias											
		FUNGO – A			FUNGO – B			FUNGO – C			FUNGO – D		
Glifosato mg L ⁻¹		pH5	pH6	pH7	pH5	pH6	pH7	pH5	pH6	pH7	pH5	pH6	pH7
50		a	a	b	a	a	a	ab	a	a	a	a	a
		1,88	2,55	2,16	5,06	9,0	3,25	3,26	7,17	4,55	3,41	6,65	4,81
60		a	b	a	b	b	b	a	b	a	c	ab	ab
		1,86	1,92	2,86	3,56	6,95	2,72	3,43	6,0	4,28	2,66	4,82	3,91
70		b	ab	a	ab	b	bc	b	b	a	bc	b	a
		1,48	2,07	2,70	4,11	6,62	2,28	2,88	6,37	4,76	2,75	4,70	4,72
80		c	ab	b	bc	b	c	ab	b	a	bc	b	ab
		1,12	2,05	2,20	3,18	7,3	2,05	3,28	6,25	3,47	2,88	4,30	4,01
90		bc	ab	b	c	b	bc	ab	b	a	b	b	c
		1,33	1,88	2,15	2,47	7,17	2,48	3,21	6,13	4,11	2,96	4,52	2,68
100		c	b	b	c	b	bc	ab	b	a	bc	ab	bc
		1,15	1,68	1,93	2,46	6,85	2,33	3,06	6,16	3,62	2,93	5,35	3,13

*Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5%.

**Fungos (A) *Nigrospora sphaerica*, (B) *Cochliobolus heterostrophus*, (C) *Fusarium anthophilum* e (D) Micelia sterilia.

Considerações finais

A metodologia desenvolvida é eficiente para obtenção de fungos degradadores do herbicida glifosato em solos cultivados com arroz irrigado por inundação.

- Os fungos *Nigrospora sphaerica*, *Cochliobolus heterostrophus*, *Fusarium anthophilum* e *Micelia sterilia* têm diferentes sensibilidades ao herbicida glifosato;
- *Micelia sterilia* possui capacidade de adaptação a concentrações mais elevadas de glifosato.
- *Cochliobolus heterostrophus* e *Fusarium anthophilum* apresentam maior potencial para degradar o glifosato e biorremediar solos contaminados por este herbicida.

Referências

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1972. 241p.

FERREIRA, F. T. R.; FERREIRA, A.; PRANDO, H. F.; TCACENCO, F. A.; GRÜTZMACHER, A. D.; MARTINS, J. F. da S. Seletividade de agrotóxicos utilizados na cultura do arroz irrigado ao fungo *Metarhizium anisopliae*, agente de controle microbiano de *Tibraca limbativentris*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 4, p. 745 -751, 2010.

KAUFMAN, D. D.; KEARNEY, P. C. Microbial degradation of isopropyl N-3-chlorophenyl-carbamate and 2-chloroethyl N-3-chlorophenylcarbamate. **Applied Microbiology**, Washington, v. 13, p. 443-446, 1965.

MATTOS, M. L. T.; PERALBA, M. C. R.; CAMPOS, B. C.; THOMAS, R. W. S. P.; FREIRE, J. J.; DIAS, S. L. P.; OLIVEIRA, E. C.; SANTOS, F. O.; SANTOS, S. C. A. Análise quanti e qualitativa da biodegradação do herbicida glifosato em solo e água de lavouras de arroz irrigado e soja do planalto médio e litoral do Rio Grande do Sul. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 12, p. 145-154, 2002.

MATTOS, M. L. T., PERALBA, M. C. R., CASTRO, L. A. S., SANTOS, F. O. Biodegradation of glyfosate by indigenous microorganisms

isolated in paddy rice soil. In: LATIN AMERICAN BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION SYMPOSIUM, 4., 2001, Buenos Aires. **Anais...** Buenos Aires: CITEFA, 2001a. p. 56.

MATTOS, M. L. T.; MACHADO, M. I.; SANTOS, F. O.; MARTINS, F. S.; SANTOS, S. C. A. Microrganismos do solo envolvidos na degradação dos herbicidas clomazone e glifosato, em lavouras de arroz irrigado, no Rio Grande do Sul. In: WORKSHOP SOBRE BIODEGRADAÇÃO, 2., 2001, Campinas. **Resumos...** Campinas: EMBRAPA-CNPMA, 2001b. p.361-364.

PARKINSON, D. T.; GRAY, R. G.; WILLIAMS, S. T. **Methods for studying the ecology of soil microorganisms.** Melbourne: Blackwell Scientific, 1971. 465p.

PAUL, E. A.; CLARK, F. E. Soil as a habitat for organisms and their reactions. In: PAUL, E. A.; CLARK, F. E. (Ed.). **Soil Microbiology and Biochemistry.** San Diego: Academic Press, 1989. 275p.

PEPPER, I. L.; GERBA, C. P.; BRUSSEAU, M. L. (Ed). **Pollution science.** London: Academic Press, 1996. 397 p.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas.** 3 ed. Londrina, 1995. p.696.

ROSAS, S. M.; STORANI, M. M. C. The actions of pesticides on microorganisms 1. Parathion. Toxicity Asses, v. 2, p. 293-303, 1987.

SANTOS, A.; FLORES, M. Effects of glyphosate on nitrogen fixation of free-living heterotrophic bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 20, p. 349-352, 1995.

THORN, R. G. Soil fungi. In: SUMMER, M. E. (Ed.). **Handbook of soil science**. Boca Raton, Florida: CRC PRESS, 2000. p. 22-23.

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

TORSTENSSON, L. Role of microorganisms in decomposition. In: HANCE, R.J. (Ed.). **Interactions between herbicides and the soil**. London: Academic Press, 1980. 349p.