

Universidade de Rio Verde – UniRV  
Faculdade de Ciências Biológicas e Química  
Curso de Ciências Biológicas - Licenciatura e Bacharelado

**Efeito do glifosato sobre traços funcionais de crescimento e biocontrole da  
rizobactéria *Bacillus subtilis***

Acadêmico: Osiel Silva Gonçalves

Orientadora: Prof. Dr. Maria de Fátima Rodrigues da Silva

Coorientadora: Prof. Dr. Paula Fabiane Martins

Projeto apresentado à Faculdade de Biologia e Química da UniRV – Universidade Rio Verde, como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Verde – Goiás

2016

# **Efeito do glifosato sobre traços funcionais de crescimento e biocontrole da rizobactéria *Bacillus subtilis***

Osiel Silva Gonçalves<sup>1</sup>

Paula Fabiane Martins<sup>2</sup>

Maria de Fátima Rodrigues da Silva<sup>3</sup>

## **Resumo**

A intensificação do uso de glifosato tem se mostrado prejudicial a vários organismos não alvos. Considerando o solo como receptor final do herbicida, a comunidade microbiana é um dos fatores críticos a ser monitorado. Dessa forma, nesse estudo reportamos o efeito do glifosato sobre a rizobactéria *Bacillus subtilis*, tendo como enfoque a toxicidade da exposição ao herbicida nas características funcionais bacteriana de crescimento e de biocontrole à fitopatógenos. O isolado de *B. subtilis* FC1 foi cultivado em seis tratamentos diferenciais quanto à composição do meio de cultura na presença e ausência do glifosato. A análise do crescimento bacteriano constituiu na comparação das curvas de crescimento bacteriano através da leitura espectrofotométrica (OD600). Após a exposição de 15 horas aos tratamentos, foi analisado o ensaio de antibiose contra o fitopatógeno *Fusarium* spp., para avaliar se o herbicida interferiu nos metabólitos antifúngicos produzido pelo isolado FC1. A adição do glifosato nos meios de cultivos apresentou efeito negativo no crescimento do FC1, confirmado através da análise da viabilidade celular a baixa taxa metabólica. Por outro lado, a exposição ao herbicida, nessas condições testadas, não afetou na característica de biocontrole ao fitopatógeno. Estes resultados abrem perspectivas de estudos complementares para melhor compreender a relação herbicida-bactéria e como estes podem interferir em algumas atividades bacteriana.

**Palavras Chaves:** Curva de Crescimento; Biodegradação; Herbicida

---

<sup>1</sup>Acadêmico de Ciências Biológicas Licenciatura e Bacharelado. Universidade de Rio Verde.

<sup>2</sup>Professora Doutora da Faculdade de Ciências Biológicas. Universidade de Rio Verde.

<sup>3</sup>Professora Doutora do Polo de Inovação Tecnológica, Instituto Federal Goiano campus Rio Verde

## Introdução

A agricultura, com o propósito de produzir alimentos para o mundo, intensificou-se em decorrência do aumento populacional, a qual vem contribuindo com a perturbação em larga escala do uso da terra, por esse tratar-se de um fator limitante no desenvolvimento agrícola. A expansão de terras agriculturáveis é reflexo da maximização de produção, portanto, a aplicação de novas tecnologias no intuito de atingir resultados superior de produção está em constante desenvolvimento (HIRAKURI e LAZZAROTTO, 2014).

A introdução de cultivares geneticamente modificados (CGM) revolucionou o setor agrícola, especialmente com CGM resistente a herbicidas. Embora, seja esperado a redução número de aplicações de herbicidas no manejo de plantas invasoras, devido a capacidade de tolerância desses cultivares, estudos tem contrariado essa expectativa. Benbrook (2012) avaliando dezesseis anos da introdução CGM no Estados Unidos demonstrou o aumento do uso de herbicidas nos cultivares que apresentaram resistência, em especial ao herbicida Roundup Ready, que apresenta o glifosato como ingrediente ativo.

O glifosato é amplamente utilizado na agricultura mundial, efetivo no controle de ervas daninhas. É um herbicida sistêmico que atua na inibição da síntese da enzima 5-enolpiruvato-shikimato-3-fosfato sintetase (EPSPS) (ARAÚJO, 2002). A intensificação de seu uso tem se mostrado prejudicial a vários organismos não alvos, mesmo apesar de sua baixa toxicidade (AMARANTE et al. 2002).

Pesquisas direcionaram o efeito do glifosato sobre as comunidades microbianas no solo. O entendimento dos efeitos adversos faz-se necessário, tendo em vista, os potenciais ecológicos e biotecnológicos (NEWMAN et al., 2015). A aplicação da comunidade microbiana do solo para mensurar a qualidade ambiental é uma importante abordagem de biomonitoramento (BRUGGEN e SEMENOV, 2000). Nesse sentido, Karam et al., (2009) citam que as características funcionais do gênero *Bacillus* são ideais como bioindicador da saúde ambiental.

A espécie *Bacillus subtilis* tem o solo como habitat natural, apesar de ser isolado em inumeráveis ambientes, apresentando maior predisposição pela rizosfera de vários vegetais (FALL et al., 2004 apud EARL et al., 2008). *Bacillus subtilis* apresenta relevância em diversos processos ecológicos e biotecnológicos, tais como biocontrole de fitopatógenos, indução de resistência sistêmica (IRS), solubilização de fósforo,

produção enzimática, etc (WESTERN et al., 2004; EARL et al., 2008; LANA FILHO et al., 2010).

Embora os estudos sobre a interação bactéria-herbicidas visem compreender os processos de biodegradação, pouco é documentado os impactos desses produtos sobre as atividades funcionais desses microrganismos. Neste trabalho, a bactéria *Bacillus subtilis*, isolada da rizosfera, foi exposta ao glifosato para avaliar o impacto de sua toxicidade sobre as características funcionais bacteriana, de crescimento e controle a fitopatógenos.

## **Material e Métodos**

### **Isolamento e Identificação convencional**

As amostras de solos foram coletadas no fragmento de Cerrado (FC) localizado na Universidade de Rio Verde, Goiás. Aproximadamente 50g de solo foi removida do rizoplano do carvoeiro (*Tachigali vulgaris*). Dez gramas de cada amostra foram homogeneizadas com 90 mL de água peptonada (H<sub>2</sub>Op) e tratadas termicamente a 80°C por 12 min em banho-maria, no intuito do isolamento de bactérias formadoras de endósporos (SLEPECKY & HEMPHILL, 1992). A diluição em série em H<sub>2</sub>Op foi conduzida nas concentrações 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup>. 1 ml de cada diluição foi inoculado na superfície do Agar Nutriente (AN), e as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas. As colônias suspeitas para *B. subtilis* foram selecionadas para os testes bioquímicos seguindo a metodologia de *Bergey's Manual of determinative Bacteriology* (BUCHANAN e GIBBONS, 1975), e as culturas confirmadas foram posteriormente mantidas a 4°C em freezer.

### **Herbicida**

O sal de potássio de glifosato conhecido como Roundup Transorb R® (Contendo 480 g/l de ingrediente ativo de glifosato) foi cedido pelo Departamento de Insumos Agrícolas da Universidade de Rio Verde.

### **Condições de Cultivo**

O meio mínimo mineral (MM) base para o experimento foi constituído por: 1,5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,6 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g de NaCl, 2 g de NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2 g de

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,01 de CaCl<sub>2</sub>, 0,001 g de FeSO<sub>4</sub>, 1000 ml de água destilada, pH final 7,0 (DWORKIN E FOSTER, 1958).

### **Inóculo**

O isolado de *Bacillus subtilis* FC1 foi cultivado em 50 ml de caldo nutriente a 27°C por 36h até atingir a fase log tardia de crescimento. A fase de crescimento foi verificada por turbidimetria, por meio da absorbância, que foi verificada no espectrofotômetro em OD<sub>600</sub>, sendo padronizado 0,8 de absorbância para inóculo à 1:100

### **Análise do Crescimento Bacteriano**

O isolado de FC1 foi cultivado em 6 tratamentos: MM; MM + 1% de Dextrose (MMD); MM + 1% de Dextrose e 7,2 mg/ml de glifosato (MMDH); MM + Herbicida (MMH); Caldo Nutriente (CN); Caldo Nutriente + Herbicida (CNH). Concentração de glifosato equivalente à aplicação de campo, 7,2 mg/ml. Experimento foi conduzido em 3 repetições. A alíquota de 500 µl do inóculo foi adicionada no frasco de 125 ml contendo 50 ml dos tratamentos citados. No intuito de inicialmente analisar o efeito glifosato na curva de crescimento do isolado FC1, foi feito um *screening* com os tratamentos MM, MMH, MMD e MMDH durante 168 horas. Os isolados foram incubados em *shaker* a 100 rpm a 27°C.

O critério de avaliação adotado para análise do crescimento bacteriano constituiu na comparação das curvas de crescimento bacteriano, a qual foi monitorado nos intervalos de 7 tempos, através da leitura espectrofotométrica (OD<sub>600</sub>). Posteriormente analisado a curva com adição dos meios ricos, CN e CNH, monitorado a cada 3 horas durante 48 horas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido pelo Teste de Tukey, ambos considerando o valor de significância  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas no programa R, versão 3.2.4. (R Core Team, 2016).

### **Viabilidade Celular após exposição aos tratamentos**

Após 48 horas de exposição aos tratamentos, 100 µL das soluções foram diluídas em series em solução salina 0,85% seguido de plaqueamento em Ágar Nutriente e incubados a 30°C durante 24 horas. Através da contagem de UFC/mL (Unidades formadoras de colônias) a viabilidade celular foi estimada.

### **Antibiose após exposição de *Bacillus subtilis* ao glifosato**

O isolado *B. subtilis* FC1 foi cultivado em erlenmeyer de 4 L contendo 1,3 L de CN a 27°C sob agitação 150 rpm até atingirem a fase log tardia (O.D. = 0,8). O inóculo foi centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos para coleta das células e em seguida lavada com solução salina 0,85%. As células foram solubilizadas em solução salina e divididas em alíquotas para o inóculo dos tratamentos MMD, MMDH, CN e CNH.

FC1 foi exposta aos tratamentos durante 15 horas. Após o final desse período os tratamentos foram centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos para coleta das células e em seguida lavadas 3 vezes em solução salina, para remoção residual do herbicida. As células de cada tratamento foram suspensas em solução salina, em seguida transferida para placa de Petri estéril, e, posteriormente adicionou-se cerca de 30 ml do meio Batata Dextrose Ágar (BDA) fundido, entre 45 ~ 50°C, com agitação suave para homogeneização. Após solidificação do BDA, um disco micelial 5 mm de diâmetro do fitopatógeno *Fusarium* spp. foi inoculado no centro da placa e em seguida encubado a 26°C durante duas semanas. O experimento foi conduzido com 3 repetições em delineamento inteiramente casualizado.

## **Resultados e Discussão**

### **Isolamento e Identificação convencional**

O *screening* térmico apresentou-se eficiente na seleção de bactérias pertencente ao gênero *Bacillus*, o qual ainda reduziu as unidades formadoras de colônias e não observou-se crescimento superior a diluição  $10^{-3}$ .

<b>Propriedades</b>	<b>FC1</b>
Morfologia	Bacilos
Coloração de Gram	+
Amilase	+
VM / VP	-/+
Citrato	+
Crescimento 6,5% NaCl	+
Crescimento 50° C	+
Esporulação	+
Catalase	+

(+) positivo (-) negativo

As características morfológicas e estruturais para o gênero *Bacillus*, foram constatadas no isolado FC1, o qual foi confirmado por testes bioquímicos para a espécie *B. subtilis*. Os testes bioquímicos demonstraram a produção de amilase, catalase, acetoína a partir da fermentação da glicose, utilização do citrato como única fonte de carbono e tolerância de crescimento em alta temperatura e concentração salina (Tabela 2).

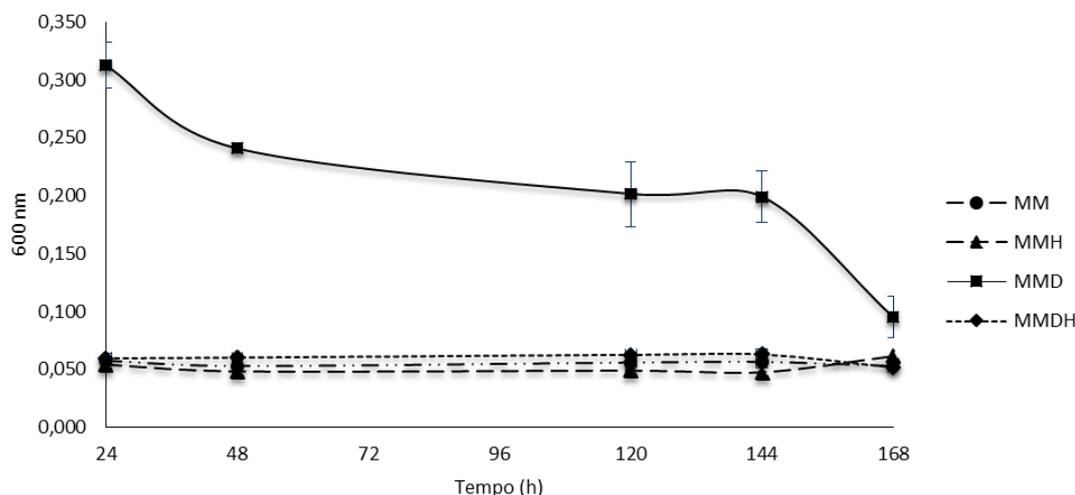
O *screening* térmico tem um importante papel no processo de triagem das bactérias em ambientes naturais, principalmente aquelas que possuem a capacidade de formar esporos resistentes, o que contribui para o desenvolvimento de processos biotecnológicos da diversidade microbiana (RAIOL et al., 2014; CAVALCANTE et al., 2014). Melo (1999) sugere a associação de metodologias, que combinam o pré tratamento, como aquecimento das amostras de solo e meios seletivos, visando principalmente o isolamento de bactérias formadoras de esporos como agentes de biocontrole da rizosfera. O *screening* térmico, portanto, corrobora para a seleção de colônias morfológicamente para o gênero *Bacillus*, além de reduzir custos e tempo na seleção de bactérias para testes bioquímicos.

Por sua vez, os métodos bioquímicos são uma das ferramentas para análise da biodiversidade de microrganismos cultiváveis, através das propriedades metabólicas, como a utilização de diferentes fontes de carbonos, nitrogênio e energia, necessários como fatores de crescimento. Essa técnica ainda estabelece a distinção de grupos filogenéticos quanto ao metabolismo dos diferentes tipos de carbono e energia (FAKRUDDIN E MANNAN, 2013). Amin et al., (2015) seguindo a metodologia proposta pelo *Bergey's manual of determinative Bacteriology*, a mesma aqui empregada, identificou pelas características morfológicas e bioquímicas, trinta isolados de *Bacillus* spp. classificados em quatro espécies incluindo *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis* e *B. pumilus*.

Nota-se também a integração de diferentes técnicas para a identificação bacteriana, nesses estudos os métodos bioquímicos convencionais são utilizados para caracterização inicial dos isolados e posteriormente a confirmação através análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) e sequenciamento do 16S rRNA (PARVATHI et al., 2009; WULFF et al., 2002).

## Efeito do glifosato na curva de crescimento do isolado *Bacillus subtilis* FC1

A adição do glifosato nos meios de cultivos afetou negativamente o crescimento do FC1, onde a maior taxa de absorvância foi de 0,060 (OD 600 nm). Pela análise de variância (ANOVA) o tratamento MMD, controle negativo, apresentou

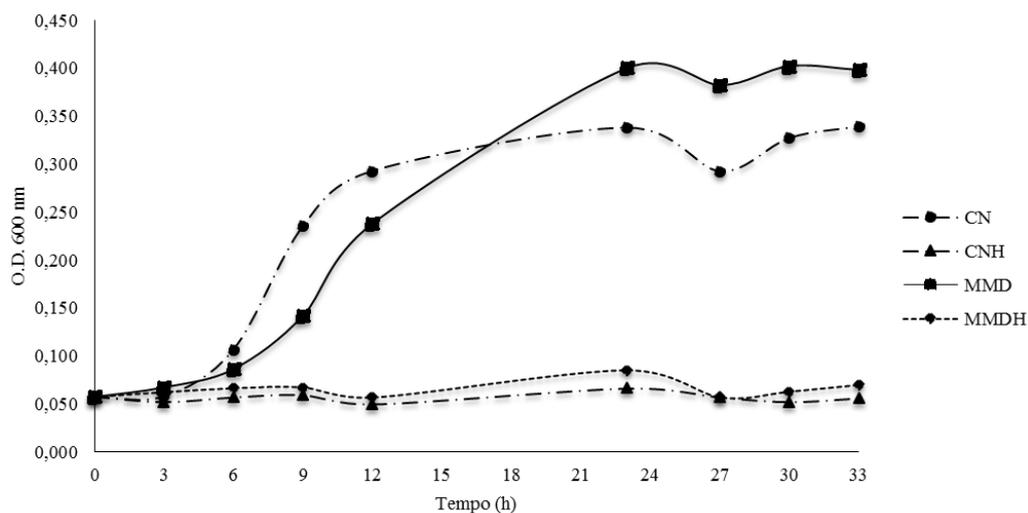


diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pela maior taxa de crescimento (Figura 1).

**Figura 1.** Curva screening do crescimento diferencial entre os tratamentos.

O *screening* de crescimento mostrou valores de absorvância durante a fase declínio celular, o qual ocorreu entre 24 a 48 horas. Por outro lado, o meio mínimo representa um substrato simples, sendo apenas composto por sais e minerais, o qual não fornece energia suficiente para a propagação celular (MARTINS, 2012). Como mostrado na figura 1, o tratamento MM apresentou baixa taxa de divisão celular. Diante deste fato, foi adicionado os tratamentos em meio rico, (CN) e (CNH), visando confirmar se a baixa taxa de crescimento na presença do herbicida estava associada ao substrato.

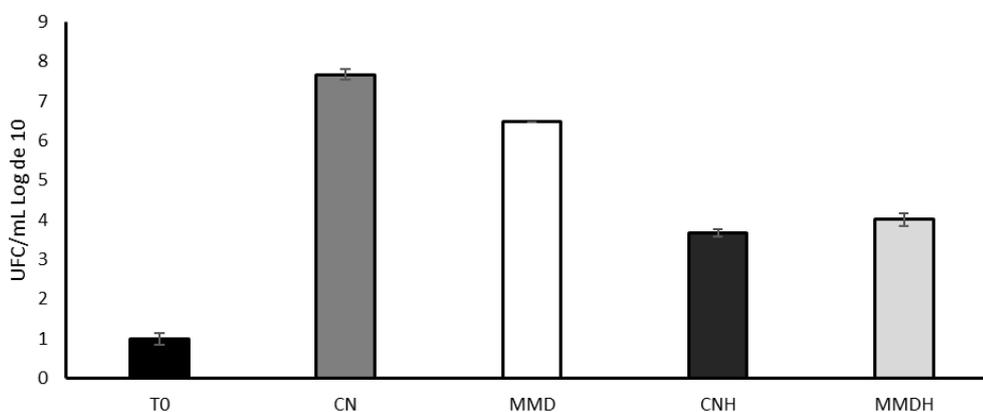
O FC1 apresentou maior taxa de crescimento nos tratamentos MMD e CN, considerados como controle, sem diferença estatística. Estes apresentaram diferença



significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos tratamentos MMDH e CNH, indicando que para o FC1 mesmo em meio rico, a presença do glifosato afetou sua taxa de crescimento (Figura 2).

A viabilidade celular, analisada através das UFC/mL, constatou-se maior valores para os tratamentos CN e MMD, quando comparado com os tratamentos na presença do glifosato CNH e MMDH, no qual corrobora com curva de crescimento. Sendo que todos os tratamentos foram maiores que o inóculo inicial (Figura 3). O que indica que embora o glifosato tenha induzido a redução no incremento do isolado FC1, o herbicida tenha sustentado, mesmo em velocidade lenta, o metabolismo celular. Essa capacidade de tolerância pode estar associada à utilização do glifosato como fonte de car

bon  
o,  
fós  
for  
o  
ou  
nitr  
ogê  
nio

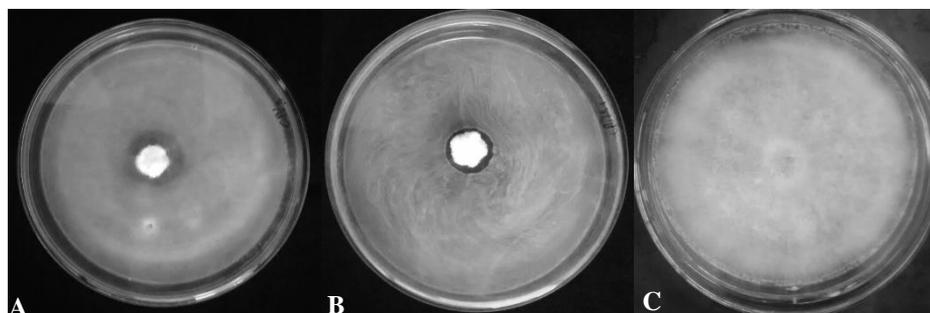


(BENSLAMA & BOULAHROUF, 2013).

**Figura 3.** Viabilidade celular log<sub>10</sub> de UFC/mL do isolado FC1; Inóculo inicial nos tratamentos (T0)

**Efeito do glifosato na característica funcional bacteriana de controle à fitopatógenos**

O isolado FC1 inibiu 98% do crescimento micelial do *Fusarium* spp., o qual não divergiu entre os tratamentos na presença e ausência do herbicida. Entretanto, foi detectado a formação de halos entre disco micelial do *Fusarium* spp. e o FC1 (Figura 4).



**Figura 4.** Presença de halo entre disco micelial e isolado FC1. A) Tratamento CN; B) Tratamento MMDH; C) *Fusarium* spp. na ausência do FC1

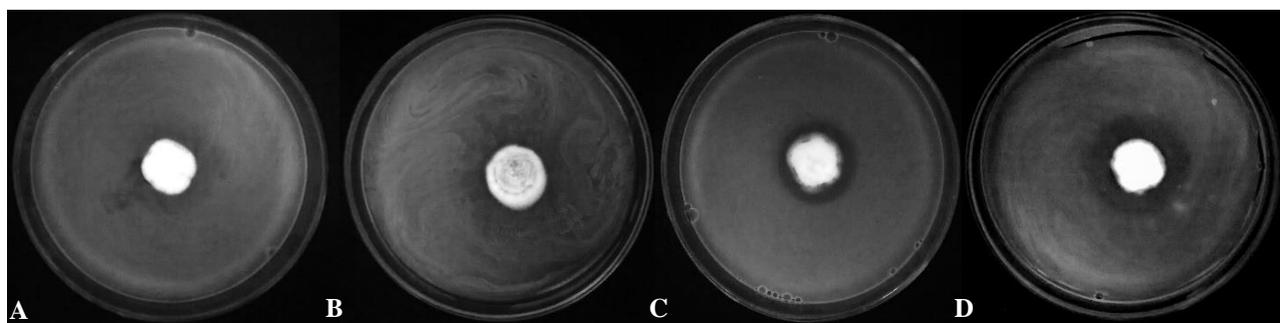
As formações de halos ocorreram tanto na presença quanto na ausência do herbicida, esses variaram quanto a intensidade durante o período de incubação (Tabela 2).

Tratamentos	1º Semana de incubação	2º Semana de incubação
MMD	+/-	+
MMDH	+	-
CN	+/-	+
CNH	+	-

(-) sem formação de halo; (+) halo acentuado; (+/-) halo moderado

**Tabela 2.** Presença de halos nos tratamentos após a exposição ao glifosato

Após duas semanas de incubação foi evidenciado o crescimento micelial tardio do fitopatógeno *Fusarium* spp., o qual sobrepôs os halos nos tratamentos MMDH e CNH, e nos tratamentos MMD e CN, foi observado uma zona clara em volta do micélio (Figura 6).



**Figura 5.** Antibiose após duas semanas de incubação evidenciando a inversão dos halos. A) MMDH; B) CNH; C) MMD; D) CN

Foi revelado que o herbicida nos tratamentos MMH, MMDH e CNH afetou negativamente no crescimento do FC1. O que concorda com Busse et al., (2000), que verificaram a toxicidade direta e indireta do glifosato na população microbiana em estudos *in vitro* e a campo, e ainda associaram esse efeito à inibição da enzima 5-enolpiruvato-shikimato-3-fosfato sintetase.

Por outro lado, o glifosato é um organofosforado constituído por ligações carbono-fósforo que permite sua fácil degradação por um grupo seletivo de microrganismos. Nesse aspecto, há vários estudos relacionados às estratégias de isolamento de bactérias em ambientes contaminados pelo herbicida (FAN et al., 2012; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2005; MONEKE et al., 2010). Apesar de diversos estudos quanto ao isolamento de bactérias capazes de degradar o glifosato, é notado uma baixa documentação relacionada a espécie *B. subtilis*.

Marie-Esther et al., (2015), relataram pela primeira vez o isolamento de *B. subtilis* em solo agrícola de arroz com histórico de aplicação continuada do glifosato, e ao contrário dos nossos resultados, o isolado foi capaz de utilizar o herbicida como fonte de fósforo. Os autores sugeriram que a eficiência da biodegradação está associada à adaptação dirigida por uma mutação genética, na qual o isolado utiliza o glifosato para sua propagação celular. Nossos resultados corroboram com a discussão dos autores, que a pré exposição ao poluente ativam enzimas específicas que reconhecem o substrato e atuam na hidrólise do herbicida (SINGH, 2009).

Os conceitos de seleção r e k, desenvolvidos por MacArthur e Wilson (1967), se aplicam nas condições de cultivo empregados nesse estudo. Na seleção r que está relacionada aos tratamentos CN e MMD, os quais apresentaram abundância de substrato, logo o FC1 teve um rápido crescimento e foi menos eficiente na utilização de substratos complexos, como o herbicida nos tratamentos CNH e MMDH, utilizando apenas os substratos simples e prontamente disponíveis, como a glicose. Entretanto, a seleção k, representa o tratamento MM, onde há pouco substrato e geralmente moderada taxa de crescimento. Os organismos estrategistas k, quando selecionados, são mais eficientes e capazes de utilizar substratos complexos, o que não foi notado para o isolado FC1 no tratamento MMH.

A presença do glifosato não alterou na síntese dos metabólitos antifúngicos do FC1, por conseguinte, a bactéria foi eficiente na inibição de 98% do crescimento micelial do *Fusarium* spp., sem divergência significativa nos tratamentos.

A baixa taxa metabólica do FC1, pode ser mecanismo visando a menor vulnerabilidade ao estresse provocado herbicida, e amenizar os efeitos negativos da perturbação (MARTINS, 2012). Por outro lado, a síntese de metabólicos secundários não são essenciais na propagação celular, sendo relacionados a uma vantagem evolutiva às adversidades ambientais (BARRIOS-GONZALES, 2003). Isso reflete na produção dos metabólitos antifúngicos mesmo com a baixa taxa metabólica. Outro fator pode estar relacionado à regulação de síntese dos metabólitos pela disponibilidade da fonte de carbono no meio de cultura BDA, o que indica adaptação da bactéria à nova condição do meio (RUIZ et al., 2010).

Embora, o glifosato não tenha afetado na funcionalidade bacteriana de biocontrole, um importante aspecto foi revelado com a formação de halos entre o disco micelial do *Fusarium* spp. e o isolado FC1. Este resultado nos tratamentos CNH e MMDH, pode estar relacionado a concentração residual do herbicida, o qual manifestou a ação fungicida sobre o fitopatógeno. Posteriormente, a sobreposição do micélio no halo, pode ser em decorrência da redução do herbicida no meio. Esse resultado pode ser corroborado por Rosa et al., (2010) que verificaram *in vitro*, a ação de herbicidas sobre o comportamento de crescimento de oito fitopatógenos, e concluíram a interferência destes produtos sobre os microrganismos, os quais reduziram no crescimento de todos os fitopatógenos. Sanogo et al., (2000) obtiveram resultados similares estudando a relação do manejo agrícola, *e.g.* uso de herbicidas, e o efeito sobre a síndrome da morte súbita, causada por *Fusarium solani f. sp. Glycine*. Os autores evidenciaram a redução da taxa de germinação, esporulação e crescimento micelial provocado pelos herbicidas glifosato e lactofen.

## **Conclusões**

O uso indiscriminado de herbicidas no cenário agrícola atual tem contaminado diversos ambientes naturais e afetado organismos não alvos. Como a disposição final destes produtos geralmente é o solo, a comunidade microbiana é importante aspecto a ser monitorado. Dessa forma, nesse estudo reportamos o efeito do glifosato sobre a rizobactéria *Bacillus subtilis*, tendo como enfoque a toxicidade da exposição ao herbicida nas características funcionais bacteriana de crescimento e de biocontrole à fitopatógenos.

O glifosato afetou negativamente a taxa de crescimento da bactéria. A análise da viabilidade celular confirmou uma baixa taxa metabólica, que sugere uma resposta adaptativa de forma amenizar estresse provocado pelo herbicida.

Por outro lado, o glifosato não afetou a característica de biocontrole ao fitopatógeno, que estar relacionado a regulação de síntese dos metabólitos pela disponibilidade da fonte de carbono no meio de cultura BDA, o que indica adaptação da bactéria à nova condição do meio.

Estas informações abrem perspectivas de estudos complementares para melhor compreender a relação herbicida-bactéria e como estes podem interferir em algumas atividades bacteriana.

## **Referências**

AMARANTE JUNIOR OP, SANTOS TCR, BRITO NM, RIBEIRO ML. Glyphosate: Properties, toxicity, use and legislation. *Quím Nova* 2002; 25: 589-93.

AMIN, M., RAKHISI, Z., AHMADY, A.Z., Isolation and Identification of Bacillus Species from Soil and Evaluation of Their Antibacterial Properties. *Avicenna J Clin Microb Infec.* 2015; 2(1):1-4.

ARAÚJO, A.S.F. Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solo. 2002. 72f. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, SP.

BARRIOS-GONZALES, J., 2003. Microbial secondary metabolites production and strain improvement. *Indian J. Biotechnol.* 2, 322–333.

BENBROOK, C. M., 2012. Impacts of genetically engineered crops on pesticide use in the U.S. – the first sixteen years. *Environmental science Europe.* 24, 24 doi: 10.1186/2190-4715-24-24.

BENSLAMA O, BOULAHROUF A (2013) Isolation and characterization of glyphosate-degrading bacteria from different soils of Algeria. African Journal of Microbiology research 7(49): 5587-5595.

BUCHANAN, R. I.; GIBBONS, N. G. Bargey's manual of determinative bacteriology. 8. ed. Baltimore: The Williams & Wilkens, 1975. 1268 p.

BUSSE, M.D., RATCLIFF A.W., SHESTAK, C. J, ROBERT F, POWERS RF (2000) Non-Target Effects of Glyphosate on Soil Microbes. Pacific Southwest Research Station, USDA Forest Service, Redding, CA. California Weed Science Society 52: 146.

CAVALCANTE et al., 2013. Diversity of bacterial spores from Brazilian Cerrado's soil strains by transmission electron microscopy. In: International Multidisciplinary Microscopy Congress INTERM 2013, 2013, Antalya, Turkey. Proceedings of International Multidisciplinary Microscopy Congress' INTERM 2013, 2013.

DWORKIN M, FOSTER JW (1958). Experiments with some Microorganisms which utilized ethane and Hydrogen. J. Bacteriol., 75: 592-603.

EARL, ASHLEE M., RICHARD LOSICK, and ROBERTO KOLTER. "Ecology and Genomics of *Bacillus Subtilis*." Trends in microbiology 16.6 (2008): 269. PMC. Web. 20 Dec. 2015.

FAKRUDDIN, M.D., MANNAN, K.S.B. Methods for analyzing diversity of microbial communities in natural environments. Ceylon J Sci. 2013; 42(1):19-33.

FALL R, et al. A simple method to isolate biofilm-forming *Bacillus subtilis* and related species from plant roots. Systematic and applied microbiology 2004;27:372–379. [PubMed: 15214643] apud EARL, ASHLEE M., RICHARD LOSICK, and ROBERTO KOLTER. "Ecology and Genomics of *Bacillus Subtilis*." Trends in microbiology 16.6 (2008): 269. PMC. Web. 20 Dec. 2015.

FAN J, YANG G, ZHAO H, SHI G, GENG Y, HOU T, TAO K (2012) Isolation, identification and characterization of a glyphosate-degrading bacterium, *Bacillus cereus* CB4, from soil. J Gen Appl Microbiol 58:263–271

HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro. Londrina: EMBRAPA-Soja, 2014. 70 p. (Documentos, 349).

KARAM, D.; SILVA, J. A. A.; FOLONI, L. L. Potencial de contaminação ambiental de herbicidas utilizados na cultura do milho. R. Bras. Milho e Sorgo, v. 8, n. 3, p. 247-262, 2009.

KUKLINSKY-SOBRAL, J., W.L. ARAUJO, R. MENDES, A.A. PIZZIRANI-KLEINER, and J.L. AZEVEDO. 2005. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. *Plant Soil* 273:91–99.

LANA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, Chapadinha, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.

MARIE-ESTHER, D. U. et al. Isolation, Characterization and Biodegradation Assay of Glyphosate Utilizing Bacteria from Exposed Rice Farm. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, Nigeria, v. 5, n. 5, p. 96-109, mar. 2015.

MacARTHUR, R.; E. WILSON. 1967. *The theory of island biogeography*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.

MARTINS, PAULA FABIANE. Aspectos da regulação metabólica bacteriana em resposta a herbicidas: um enfoque ao sistema antioxidante. 2012. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012. doi:10.11606/T.11.2012.tde-30052012-103433. Acesso em: 2016-11-24.

MELO, I.S. 1999. Isolamento de Agentes de biocontrole da rizosfera. In: Melo, I.S., Azevedo, J.L. (eds.) *Controle Biológico*. v.3, ed. Embrapa, pp.15-55.

MONEKE, A.N., OKPALA, G.N., ANYANWU, C.U., 2010. Biodegradation of glyphosate herbicide in vitro using bacterial isolates from four rice fields. *Afr. J. Biotechnol.* 9, 4067–4074

NEWMAN, M.M., HOILETT, N., LORENZ, N., DICK, R.P., LILESD, M. R., (2015). Glyphosate effects on soil rhizosphere-associated bacterial communities. *Science of The Total Environment*. V.543, part A; Pg. 155–160.

RAIOL et al., 2014. Draft Genome Sequence of FT9, a Novel *Bacillus cereus* Strain Isolated from a Brazilian Thermal Spring. *Genome Announcements*, v. 2, p. e01027-14-e01027-14, 2014.

ROSA, DANIEL DIAS, BASSETO, MARCO ANTONIO, CAVARIANI, CLAUDIO, & FURTADO, EDSON LUIZ. (2010). Efeito de herbicidas sobre agentes fitopatogênicos. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 32(3), 379-383. <https://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v32i3.3728>.

RUIZ, B., A. CHÁVEZ, A. FORERO, Y. GARCÍA-HUANTE, A. ROMERO, M. SÁNCHEZ, D. ROCHA, B. SÁNCHEZ, R. RODRÍGUEZ-SANOJA, S. SÁNCHEZ AND E. LANGLEY, 2010. Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Critical Rev. Microbiol.*, 36: 146–167.

R CORE TEAM (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

SANOGO, S., X.B. YANG, AND H. SCHERM. 2000. Effects of herbicides on *Fusarium solani* f. sp. *glycines* and development of sudden death syndrome in glyphosate-tolerant soybean. *Phytopathology* 90:57–66.

SINGH, B. K., (2009). Organophosphorus-degrading bacteria: ecology and industrial applications. *Nat Rev Microbiol* 7:156–164

SLEPECKY, R. & HEMPHILL, E. (1992). The genus *Bacillus* – nonmedical. In *The Prokaryotes*, 2nd edn, pp. 1663–1696. Edited by A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer. New York: Springer.

WESTERS L., WESTERS H., QUAX W. J. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochim. Biophys. Acta* 2004;1694:299-310.

WULFF et al., (2002). Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathology* 51:574–584