

GLYPHOSATE: INFLUÊNCIA NA BIOATIVIDADE DO SOLO E AÇÃO DE MINHOCAS SOBRE SUA DISSIPAÇÃO EM TERRA AGRÍCOLA ¹

Glyphosate: Influence on the Soil Bioactivity and Action of Earthworms on its Soil Dissipation

ANDRÉA, M.M.², PAPINI, S.³, PERES, T.B.², BAZARIN, S.³, SAVOY, V.L.T.² e MATALLO, M.B.²

RESUMO - Com a difusão do uso de agrotóxicos, torna-se necessário aprofundar os conhecimentos sobre seu comportamento no ambiente, visando diminuir os riscos à biota e a possível contaminação de água, solo e alimentos. A influência da presença de minhocas da espécie *Eisenia foetida* sobre a dissipação do herbicida glyphosate, a bioacumulação do herbicida nestes vermes e a influência do herbicida sobre a bioatividade da microbiota endógena foram avaliadas em amostra de terra agrícola tratada com solução aquosa de ¹⁴C-glyphosate. Os estudos foram conduzidos em sistemas mantidos por dois ou quatro meses em amostras de terra tratadas com três diferentes concentrações de ¹⁴C-glyphosate, contendo ou não minhocas. Após esses períodos, amostras de terra e de minhocas foram submetidas à extração e combustão, para quantificação da radioatividade por espectrometria de cintilação em líquido (ECL). Paralelamente, a atividade da microbiota foi avaliada em relação à atividade da enzima desidrogenase. Os resultados mostraram que a presença de minhocas não alterou a dissipação de glyphosate na terra independentemente do período de contato, embora elas tenham bioacumulado resíduos do herbicida, numa relação diretamente proporcional ao tempo de contato com a terra tratada. O período de quatro meses favoreceu a formação de ¹⁴C-resíduos não-extraíveis ou ligados. Já a bioatividade não sofreu qualquer alteração, nem pela presença de minhocas nem dos tratamentos ou do tempo de exposição.

Palavras-chave: bioacumulação, desidrogenase, *Eisenia foetida*.

ABSTRACT - The widespread usage of pesticides leads to the need of improving the knowledge on their environmental behaviour in order to decrease the risks to biota, as well as the water, soil, and food contamination. The influence of the earthworms *Eisenia foetida* on the dissipation of glyphosate, the herbicide bioaccumulation in the worms and the influence of the herbicide on the endogenous microbial bioactivity were evaluated in an agricultural soil sample treated with aqueous solution of ¹⁴C-glyphosate. The studies were performed in systems maintained for 2 or 4 months containing soil samples treated with three different concentrations of ¹⁴C-glyphosate and containing or not the earthworms. After these periods, soil samples and the earthworms were extracted and combusted for radiocarbon quantification by liquid scintillation counting (ECL). The microbial bioactivity was evaluated through the activity of the dehydrogenase enzyme. Results showed that earthworms did not influence the soil dissipation of glyphosate, independently of the contact period, although they bioaccumulated glyphosate residues, proportionally to the contact period. The higher period favoured the ¹⁴C-non-extractable or bound residues production. Soil bioactivity was not altered, neither by the earthworms, nor by the treatments or time after treatments.

Key words: Bioaccumulation, dehydrogenase, *Eisenia foetida*..

¹ Recebido para publicação em / / e na forma revisada em / / .

² Pesquisadores Científicos, Instituto Biológico, Caixa Postal 12.898, 04010-970 São Paulo-SP; ³ Biólogas, estagiárias do Lab. de Ecologia de Agroquímicos do Instituto Biológico.



INTRODUÇÃO

A agricultura moderna utiliza herbicidas, entre outros agrotóxicos, visando o controle ou eliminação de competidores, fitopredadores e fitoparasitas, que de uma forma ou de outra comprometem o desenvolvimento dos produtos agrícolas de interesse econômico. O conhecimento do comportamento desses compostos no ecossistema é importante para minorar os impactos causados no ambiente e o possível aparecimento de resíduos indesejáveis nas culturas (Perocco et al., 1995). No solo, resíduos de agrotóxicos podem ser transformados em outros compostos e também transportados para outras áreas por organismos edáficos (Curl et al., 1987; Topp et al., 1997; Viswanathan, 1994). Entre os componentes da microbiota edáfica, as minhocas constituem um dos organismos mais indicados para avaliar esses processos, pois, devido ao seu nicho ecológico, estes animais interagem intimamente com os compostos presentes no solo (Viswanathan, 1994; Zang et al., 2000).

Além disso, como os agrotóxicos são compostos biologicamente ativos, sua persistência no solo pode afetar a viabilidade da microbiota, estimulando ou inibindo seu crescimento. Essas alterações podem comprometer processos de ciclagem de materiais no ambiente edáfico e o crescimento de vegetais (Nielsen & Winding, 2002). O efeito da ação de agrotóxicos sobre a bioatividade do solo pode ser avaliado a partir de estimativas de atividade de determinadas enzimas microbianas: menores atividades enzimáticas após aplicação de agrotóxicos indicam inibição da bioatividade e representam o impacto causado por esses compostos (Nielsen & Winding, 2002). Dentre as diversas enzimas presentes no solo, a medida da atividade da desidrogenase (DHA) é bastante utilizada, pois reflete a atividade oxidativa total da microbiota do solo (Dick & Tabatabai, 1993).

Entre os herbicidas, o glyphosate tem sido amplamente utilizado, não só na agricultura como também em florestas (Busse et al., 2001). Ele atua por inibição da atividade da enzima 3-enol-piruvilsicamato-5-fosfatase, resultando na diminuição da quantidade de aminoácidos aromáticos essenciais para crescimento e sobrevivência de plantas, estando também presente em muitos microrganismos (Haney et al., 2000;

Busse et al., 2001). Sua meia-vida no solo varia desde de menos de uma semana até alguns meses, dependendo dos teores de argila e matéria orgânica e do nível de atividade microbiana (Richardson & Gangolli, 1994).

Para que a utilização de glyphosate seja segura do ponto de vista de manutenção das condições ambientais adequadas, ela deve ser precedida de estudos que possibilitem maior conhecimento de seu comportamento em solos brasileiros, além da avaliação de suas interações com os organismos edáficos. Este trabalho estudou a atuação de minhocas *Eisenia foetida* sobre a dissipação de glyphosate aplicado diretamente em amostras de terra e a ocorrência de bioacumulação, em condições de laboratório. Avaliou-se também a ação do herbicida sobre a atividade microbiana a partir de medidas da atividade da enzima desidrogenase.

MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Ecologia de Agroquímicos do Instituto Biológico (São Paulo-SP), com amostra de terra coletada da profundidade de 0 a 15 cm do perfil de solo do Centro Experimental do Instituto Biológico, Campinas (SP), de área sem histórico de exposição a agrotóxicos. A terra foi seca à temperatura ambiente por 24 horas e peneirada em 2,0 mm de malha. De acordo com o Laboratório LAGRO (Campinas, SP), trata-se de solo areno-barrento, cujas principais características físicas e químicas são: 65% de areia, 15% de silte, 20% de argila, 31 g dm⁻³ de matéria orgânica e pH (CaCl₂) de 5,4. A capacidade máxima de retenção de água (CMRA) foi determinada conforme Frighetto & Valarini (2000).

As minhocas da espécie *Eisenia foetida* usadas nos experimentos foram selecionadas nas caixas de criação do Laboratório de Ecologia de Agroquímicos, utilizando como critérios a maturidade sexual completa e o peso entre 300 e 600 mg.

Os estudos foram conduzidos em dois lotes (A e B), correspondendo a dois e quatro meses (Tabela 1). Os lotes foram subdivididos em seis grupos de tratamentos, nos quais cada grupo foi formado por três sistemas, constituídos de cristalizadores de vidro com capacidade para 2,0 L, terra reumedecida a 40% da CMRA,



10 minhocas da espécie *Eisenia foetida* e esferas de vidro na proporção de 1:2 de terra, a fim de facilitar a aeração do substrato e o deslocamento dos animais. Os grupos IA e IB continham terra reumedecida sem aplicação de glyphosate e sem minhocas, sendo utilizados como controle da atividade microbiana nas condições do experimento. Nos sistemas dos grupos IIA e IIB, minhocas foram mantidas em terra reumedecida não tratada com glyphosate, para controle da viabilidade dos animais nas condições experimentais. Os grupos IIIA e IIIB representaram o controle da degradação do herbicida na ausência de minhocas e continham terra reumedecida tratada com solução aquosa de ^{14}C -glyphosate a 1,6 μg de ingrediente ativo (i.a.) e 0,10 kBq g^{-1} de terra por mistura de glyphosate (certificado pelo Laboratório de Química Ambiental do Instituto Biológico como 480 g L^{-1} de sal de isopropilamina de N-fosfometil glicina) e [N-(^{14}C -fosfometil)-glicina] da “Amersham International”, com 2,70 GBq mmol^{-1} (Tabela 1). Minhocas foram colocadas nos sistemas dos grupos IVA, IVB, VA, VB, VIA e VIB, cuja terra foi tratada com solução aquosa de ^{14}C -glyphosate a 1,6 (IV), 16 (V) ou 32 (VI) μg i.a. e 0,10 kBq g^{-1} de terra (Tabela 1).

Após os diferentes períodos de exposição, os sistemas foram desmontados, separando-se

Tabela 1 - Condições dos estudos de degradação e bioacumulação de ^{14}C -glyphosate em minhocas *Eisenia foetida*

Lote	Grupo	Terra	Esfera de vidro	Tratamento com ^{14}C -glyphosate	Minhoca
		(g)		(μg e kBq g^{-1} de terra)	
A (2 meses)	IA	300	150	-	-
	IIA	300	150	-	+
	IIIA	300	150	1,6 e 0,10	-
	IVA	300	150	1,6 e 0,10	+
	VA	300	150	16,0 e 0,10	+
	VIA	300	150	32,0 e 0,10	+
B (4 meses)	IB	600	300	-	-
	IIB	600	300	-	+
	IIIB	600	300	1,6 e 0,10	-
	IVB	600	300	1,6 e 0,10	+
	VB	600	300	16,0 e 0,10	+
	VIB	600	300	32,0 e 0,10	+

+ presença - ausência .



as minhocas e a terra. Os animais foram lavados em água destilada, mantidos por 24 horas em frascos contendo papel-filtro umedecido, trocado a cada 12 horas, para limpeza do conteúdo intestinal (Briggs & Lord, 1983). A seguir, foram sedados por exposição ao frio ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante aproximadamente 20 minutos e cortados em pedaços de cerca de 1 cm (Papini & Andréa, 2001).

Triplicatas de 3,0 g de terra dos sistemas e dos segmentos dos vermes foram extraídas separadamente com 15 mL de ácido fosfórico 0,35 mol L^{-1} , utilizando-se 800 W de energia de microondas (Panasonic 1600W) em cinco ciclos de 30 segundos, conforme Andréa et al. (2001). Alíquotas de 1,0 mL dos extratos foram analisadas por espectrometria de cintilação em líquido (ECL) após adição de líquido cintilador para soluções aquosas (Mesquita & Rüegg, 1984), para quantificação do radiocarbono extraído. Testes de recuperação desta metodologia em terra resultaram em 84,7% \pm 10,8% da radioatividade inicialmente presente (CV% = 12,75).

As amostras dos segmentos animais e de terra extraídas e secas à temperatura ambiente foram submetidas à combustão em “Biological Oxidizer” (Harvey OX-600), e a radioatividade presente foi quantificada por ECL, para determinação da quantidade de ^{14}C -resíduos não-extraíveis presentes na terra e nos organismos (Andréa et al., 1997).

A influência de glyphosate sobre a microbiota foi estudada a partir da atividade da enzima desidrogenase, usando-se basicamente a metodologia de Schuster & Schröder (1990). Triplicatas de 3,0 g de amostras de terra de cada sistema foram analisadas imediatamente após a coleta e também dois e quatro meses depois dos tratamentos com glyphosate. Soluções de glicose, cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) e tampão “tris-buffer” com pH entre 7,6 e 7,8 foram adicionadas às amostras de terra. As misturas foram incubadas por 24 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$ e então centrifugadas. O formazan produzido a partir da redução do TTC pela desidrogenase presente nas amostras de terra foi extraído com (2 x) 10 mL de acetona, por agitação mecânica. Após nova centrifugação, quantificou-se o formazan formado por espectrofotometria a 485 nm (Hitachi U-1100).

A radioatividade detectada nas amostras de terra e nos tecidos dos animais e determinada, respectivamente, por extração e combustão foi convertida em porcentagem em relação à quantidade de radiocarbono inicialmente presente, para avaliação da dissipação do glyphosate na presença e na ausência de minhocas após dois ou quatro meses.

O fator de bioacumulação (FB) foi determinado a partir da relação entre as quantidades de $[^{14}\text{C}] \text{ g}^{-1}$ de tecido animal e $[^{14}\text{C}] \text{ g}^{-1}$ de terra (Stephenson et al., 1997).

Todos os valores obtidos foram analisados estatisticamente quanto à sua variabilidade utilizando-se a média e o desvio-padrão, através do teste *t* e do teste de correlação de Spearman.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas três concentrações estudadas, a quantidade de radiocarbono extraível do solo foi maior do que a de radiocarbono ligado aos dois meses de exposição, mas essas quantidades inverteram-se aos quatro meses de exposição (Figura 1). Assim, dois meses após os tratamentos, aproximadamente 40% do radiocarbono foi recuperado do solo sob a forma extraível e 20% a partir da combustão da terra (Figura 1); depois de quatro meses, detectou-se 20% como ^{14}C -extraível e 40% como

^{14}C -resíduos ligados (Figura 1). Independentemente da presença de minhocas, a quantidade de ^{14}C -resíduos extraíveis foi maior nas amostras de terra mantidas por dois meses do que naquelas mantidas por quatro meses, isto é, aproximadamente 40 e 20%, respectivamente. O maior tempo de permanência do composto na terra favoreceu a formação de ^{14}C -resíduos ligados, pois em todas as concentrações estudadas a formação de resíduos ligados à terra foi significativamente maior após quatro meses de exposição (Figura 1). A crescente produção de ^{14}C -resíduos ligados a partir do ^{14}C -glyphosate e a baixa recuperação do radiocarbono total parecem indicar que, conforme detectaram Feng & Thompson (1990), pode ter ocorrido rápida degradação do glyphosate a CO_2 e/ou outros compostos voláteis que escaparam para a atmosfera, seguida de processo de ligação mais estável na terra.

A dissipação do glyphosate nas três concentrações estudadas (1,6, 16 e 32 $\mu\text{g g}^{-1}$ de terra) não foi alterada pela presença de minhocas durante dois ou quatro meses, pois não se detectaram diferenças estatisticamente significantes na recuperação total do radiocarbono a partir da extração e combustão das amostras de terra nos sistemas com e sem minhocas (Figura 1). Em todos os tratamentos, apenas cerca de 55% do radiocarbono foi recuperado da terra.

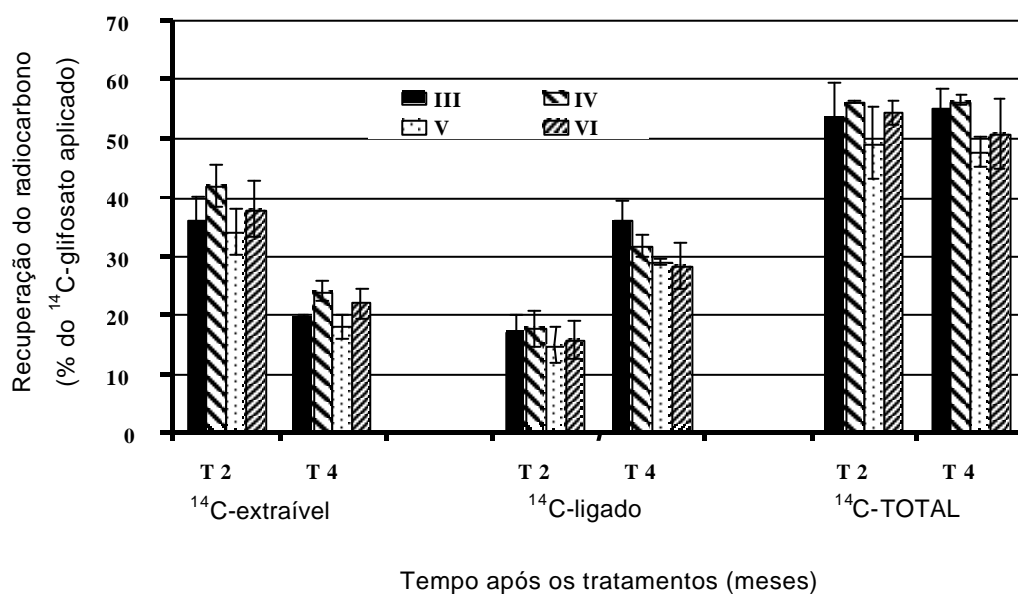


Figura 1 - Recuperação do radiocarbono de terra tratada com ^{14}C -glyphosate, dois ou quatro meses após os tratamentos com diferentes doses. [1,6 (grupos IVA e IVB), 16 (grupos VA e VB) e 32 (grupos VIA e VIB) $\mu\text{g g}^{-1}$].

Embora a presença de minhocas não tenha alterado a dissipação do glyphosate, ocorreu bioacumulação nos animais; os fatores de bioacumulação (FB) variaram de 1,1 a 2,1, porém as diferenças não foram significativas entre os tempos estudados, isto é, aos dois ou quatro meses, exceto após o tratamento com 1,6 $\mu\text{g i.a. g}^{-1}$ de terra (sistemas IVA e IVB, Tabela 2). Entretanto, o valor de FB aumentou significativamente de dois para quatro meses após tratamento com 1,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ de terra (sistemas do grupos IVA e IVB). Nos sistemas do grupo IVA, o FB encontrado foi de $1,12 \pm 0,21$ e, nos sistemas do grupo IVB este valor correspondeu a $1,98 \pm 0,53$ (Tabela 2). Nos demais tratamentos, grupos VA e VB (16 $\mu\text{g g}^{-1}$ de terra) e grupos VIA e VIB (32 $\mu\text{g g}^{-1}$ de terra), as diferenças de FB entre dois e quatro meses de exposição não foram significativas (Tabela 2).

Os resultados parecem indicar que o tempo de exposição é mais importante na bioacumulação do que a concentração do composto aplicada inicialmente na terra, uma vez que o aumento nos valores de FB foi mais acentuado de dois para quatro meses do que dos grupos IVA e IVB (tratamento com 1,6 e 32 $\mu\text{g g}^{-1}$ de terra) para os grupos VIA e VIB (tratamento com 32 $\mu\text{g g}^{-1}$ de terra).

Além disso, o glyphosate parece não atuar nos processos biológicos oxidativos da terra, pois não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes na atividade da desidrogenase, tanto em relação ao tratamento com o herbicida ou à presença de minhocas,

Tabela 2 - Fator de bioacumulação (FB) de glyphosate em minhocas (^{14}C nas minhocas / ^{14}C na terra)

Grupo	Minhoca (MBq g^{-1})	Solo (MBq g^{-1})	FB (média \pm desvio-padrão)
IVA	49,99 \pm 5,50 ^a	44,82 \pm 4,02 ^a	1,12 \pm 0,21 ^a
IVB	115,72 \pm 22,88 ^b	59,05 \pm 5,28 ^b	1,98 \pm 0,53 ^b
VA	47,92 \pm 4,74 ^a	35,44 \pm 3,35 ^a	1,32 \pm 0,24 ^a
VB	94,84 \pm 12,32 ^b	45,71 \pm 1,33 ^a	2,07 \pm 0,25 ^a
VIA	55,27 \pm 6,03 ^a	42,95 \pm 2,31 ^a	1,29 \pm 0,19 ^a
VIB	103,94 \pm 29,53 ^b	50,87 \pm 3,60 ^a	2,02 \pm 0,47 ^a

Médias seguidas de mesma letra, dentro de cada dose, não diferem entre si pelo teste t a 5% de probabilidade. A: 2 meses; B: 4 meses; IV: terra + 1,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ + minhoca; V: terra + 16 $\mu\text{g g}^{-1}$ + minhoca; VI: terra + 32 $\mu\text{g g}^{-1}$ + minhoca.



quanto em relação ao tempo após esses tratamentos (Tabela 3). Também foi observado que o aumento da concentração presente não influenciou a bioatividade na terra, visto que não houve diferença significativa na atividade da desidrogenase determinada a partir da produção de formazan (Tabela 3). Somente os resultados do tratamento com 32 $\mu\text{g g}^{-1}$ de terra após quatro meses (grupo VIB) diferiram do controle aos quatro meses (grupo IB). Entretanto, isso pode ter sido reflexo da grande variação entre as replicatas, provavelmente por causa do tamanho da subamostra destes testes em relação à quantidade total de amostra de terra dos sistemas.

Tabela 3 - Atividade da enzima desidrogenase nas amostras de terra tratadas com diferentes concentrações de ^{14}C -glyphosate, determinada a partir da concentração de formazan (média \pm desvio-padrão)

Grupo	Produção de formazan ($\mu\text{g g}^{-1}$ de terra)		
	Antes dos tratamentos	Lote A (2 meses)	Lote B (4 meses)
Terra recém-coletada	132,88 \pm 2,50 ^a	-	-
I	-	112,49 \pm 37,16 ^a	62,76 \pm 9,17 ^a
II	-	57,00 \pm 11,83 ^a	83,07 \pm 31,15 ^a
III	-	75,16 \pm 23,69 ^a	207,10 \pm 130,51 ^a
IV	-	52,12 \pm 27,06 ^a	90,90 \pm 22,96 ^a
V	-	62,76 \pm 34,63 ^a	34,69 \pm 3,31 ^a
VI	-	88,82 \pm 26,15 ^a	29,70 \pm 2,52 ^b

Médias seguidas de mesma letra, dentro de cada dose, não diferem entre si pelo teste t a 5% de probabilidade. I: controle; II: terra + minhoca; III: terra + 1,6 $\mu\text{g g}^{-1}$; IV: terra + 1,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ + minhoca; V: terra + 16 $\mu\text{g g}^{-1}$ + minhoca; VI: terra + 32 $\mu\text{g g}^{-1}$ + minhoca.

Dessa forma, verificou-se que a dissipação de glyphosate não foi influenciada pela atuação de minhocas e que o herbicida não alterou os processos oxidativos da terra com as características da aqui estudada. No entanto, as minhocas bioacumularam o herbicida em quantidades maiores quanto maior o tempo de permanência na terra tratada nas três concentrações estudadas, embora não se tenha detectado a existência de correlação direta entre o fator de bioacumulação e o tempo de exposição.

LITERATURA CITADA

ANDRÉA, M. M. et al. Effect of temperature on dissipation of [^{14}C]-atrazine in a Brazilian soil. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 32, p. 95-100, 1997.

- ANDRÉA, M. M.; PAPINI, S.; NAKAGAWA, L. E. Optimizing microwave-assisted solvent extraction (MASE) of pesticides from soil. **J. Environ. Sci. Health**, v. B36, p. 87-93, 2001.
- BRIGGS, G. G.; LORD, K. A. The distribution of aldicarb and its metabolites between *Lumbricus terrestris*, water and soil. **Pest. Sci.**, v. 14, p. 412-416, 1983.
- BUSSE, M. D. et al. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. **Soil Biol. Biochem.**, v. 33, p. 1777-1789, 2001.
- CURL, E. A. et al. The conjugation and accumulation of metabolites of cypermethrin by earthworms. **Pest. Sci.**, v. 20, p. 207-222, 1987.
- DICK, W. A.; TABATABAI, M. A. Significance and potencial use of soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management. In: MITTING Jr., F. B. (Ed.) **Soil microbial ecology**. New York: Marcel Dekker, 1993. p.95-127.
- FENG, J. C.; THOMPSON, D. G. Fate of glyphosate in a Canadian forest watershed. 2. Persistence in foliage and soils. **J. Agric. Food Chem.**, v. 38, p. 1118-1125, 1990.
- FRIGHETTO, R. T. S.; VALARINI, P. J. Indicadores biológicos e bioquímicos da qualidade do solo. **Manual Técnico**. Jaguariúna: EMBRAPA. 2000. p. 37-40.
- HANEY, R. L. et al. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. **Weed Sci.**, v. 48, p. 89-93, 2000.
- MESQUITA, T. B.; RÜEGG, E. F. Influência de agentes tenso-ativos na detecção da radiação beta. **Ci. Cultura**, v. 36, p. 446-450, 1984.
- NIELSEN, M. N.; WINDING, A. **Microorganisms as indicators of soil health**. 2002. Denmark: National Environmental Research Institute, 2002. p. 47-49. (Technical Report, 388).
- PAPINI, S.; ANDRÉA, M. M. Dissipação de simazina em solo por ação de minhocas (*Eisenia foetida*). **R. Bras. Ci. Solo**, v. 25, p. 593-599, 2001.
- PEROCCO, A. M. et al. The influence of peat amendment and turf density on downward migration of metalaxyl fungicide in creeping bentgrass sand lysimeters. **Chemosphere**, v. 33, p. 2335-2340, 1995.
- RICHARDSON, M. L.; GANGOLLI, S. **The dictionary of substances and their effects**. England: Royal Society of Chemistry, 1994. p. 715-717.
- STEPHENSON, G. L. et al. Exposure of the earthworm *Lumbricus terrestris* to diazinon and the relative risk to passerine birds. **Soil Biol. Biochem.**, v. 29, p. 717-720, 1997.
- SCHUSTER, E.; SCHRÖDER, D. Side-effects of sequentially-applied pesticides on non-target soil microorganisms: field experiments. **Soil Biol. Biochem.**, v. 22, n. 3, p. 367-373, 1990.
- TOPP, E.; VALLAEYS, T.; SOULAS, G. Pesticides: microbial degradation and effects on microorganisms. In: van ELSAS, J. D.; TREVORS, J. T.; WELLINGTON, E. M. H. (Eds.) **Modern soil microbiology**. New York: Marcel Dekker. 1997. p. 547-575.
- VISWANATHAN, R. Earthworms and assessment of ecological impact of soil xenobiotics. **Chemosphere**, v. 28, p. 413-420, 1994.
- ZANG, Y. et al. Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm *Eisenia foetida*. **Environ. Poll.**, v. 108, p. 271-278, 2000.