

191

Circular Técnica

Sete Lagoas, MG
Dezembro, 2013

Autores

**José Edson Fontes
Figueiredo**

Biólogo, Embrapa Milho
e Sorgo. Cx. Postal 151.
35701-970, Sete Lagoas,
MG. jose.edson@embrapa.br

Jéssica A. A. Silva
Engenheira Ambiental,
bolsista da Embrapa
Milho Sorgo. Cx. Postal
151.35701970, Sete
Lagoas, Minas Gerais,
jessicaalial@gmail.com

Décio Karam
Eng°. Agr°, Plantas
Daninhas, Embrapa Milho
e Sorgo. Cx. Postal 151.
35701-970, Sete Lagoas,
MG. decio.karam@embrapa.br

Efeito *In Vitro* de Glyphosate sobre Rizobactérias do Gênero *Bacillus* spp

O uso de herbicidas constitui uma prática comum na agricultura moderna visando reduzir as perdas de produtividade das culturas, sendo o grupo de moléculas agroquímicas mais comercializadas em todo o mundo (MENTEN et al., 2012). Somente no Brasil, 476 formulações com aproximadamente uma centena de ingredientes ativos estão registradas junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) (SCARDOELLI et al., 2011). Nas últimas décadas, o uso crescente desses produtos causou a contaminação dos solos agrícolas e dos lençóis freáticos (SEBIOMO et al., 2011) e gerou, conseqüentemente, grande interesse de diferentes setores da sociedade sobre os possíveis efeitos tóxicos dessas substâncias na microflora do solo (KONSTANTINOU et al., 2006).

Alguns estudos mostraram que os herbicidas apresentam efeito inibidor sobre o crescimento de vários organismos do solo (WARDLE, 1995). Em outro estudo, os herbicidas glyphosate e imazaquin não causaram alterações significativas no teor de C da biomassa microbiana do solo, na respiração basal do solo e no quociente metabólico, mas ocasionaram alterações na comunidade bacteriana associada ao rizoplane de soja, na forma de restrição do crescimento de determinadas bactérias e estímulo de outras (ZILLI et al., 2008). Lancaster et al. (2010) encontraram aumento na população da bactéria Gram-negativa *Burkholderia* spp. após a aplicação de glyphosate no solo. Lane (2011) observou significativa redução da biomassa total microbiana na rizosfera da soja após a aplicação do herbicida glyphosate, mas a estrutura populacional da comunidade microbiana não foi afetada. Partoazar et al. (2011) encontraram que a aplicação de glyphosate aumenta a população e a atividade microbiana do solo podendo apresentar efeitos, benéficos ou deletérios, tanto para o crescimento das plantas como para a ecologia microbiana e para a qualidade do solo.

Estudos sobre os efeitos dos herbicidas na atividade microbiana do solo de clima temperado foram conduzidos essencialmente por meio de análises diretas do solo e os resultados são conflitantes, possivelmente por causa do grande número de variáveis ambientais (MARTÍNEZ-TOLEDO et al., 1992). Por isso, torna-se necessário desenvolver métodos mais precisos para avaliar os efeitos de herbicidas nos microrganismos do solo e da rizosfera (POLEZA et al., 2008). Em solos de clima tropical, os estudos sobre o potencial de alteração das relações ecológicas dos herbicidas e suas interações ambientais são incipientes (KARAM et al., 2009).

Microrganismos bioindicadores se desenvolvem junto à rizosfera de plantas superiores (ALTEMBURG et al., 2010; BORBA; AMORIM, 2007). Dentre esses, destacam-se especialmente as bactérias, por causa da

sua abundância, diversidade e capacidade de sobreviver em regiões sob as mais variadas condições ambientais. O grupo de bactérias Firmicutes apresenta relevância por estar envolvido em processos diversos, como biodegradação de contaminantes, biodisponibilização de nutrientes, fixação biológica de nitrogênio, e por serem utilizados em vários processos biotecnológicos (ZULU; VARISANGA, 2012). **Várias dessas funções possibilitam o uso dessas bactérias em estudos de diagnóstico da qualidade ambiental e em recuperação de áreas sob impacto ambiental adverso (KARAM et al., 2009).**

Vários estudos têm demonstrado que bactérias patogênicas gram-positivas, tais como *Salmonella enteritidis*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum*, são altamente resistentes ao glyphosate. Contudo, a maioria das bactérias intestinais benéficas aos organismos, tais como *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus badius*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus* spp. e *Campylobacter* spp., são moderadamente ou altamente suscetíveis ao glyphosate. Dessa forma, a redução de bactérias benéficas na microbiota gastrointestinal, pela ingestão de glyphosate, causa distúrbios no equilíbrio da comunidade bacteriana intestinal em aves domésticas. Além disso, a toxicidade do glyphosate para as bactérias do gênero *Enterococcus* spp., que é prevalente na flora intestinal de aves, pode aumentar a predisposição para infecções e está associada ao aumento de doenças causadas por *C. botulinum* por causa da supressão do efeito antagonista de *Enterococcus* spp. contra as bactérias do gênero *clostridia* (SHEHATA, et al., 2013).

Figueiredo e Karam avaliaram o efeito *in vitro* do herbicida glyphosate [N-(phosphonomethyl)-glycine] sobre o crescimento de rizobactérias. Em um desses estudos (FIGUEIREDO et al., 2010), foram utilizadas 5 espécies de bactérias

pertencentes ao gênero *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. anthracis*, *B. megaterium* e *B. thuringiensis*, previamente isoladas da rizosfera da planta ornamental sempre-viva (*Syngonanthus elegans* var. *elegans*), **nativa no Parque Nacional da Sempre-Viva (Município de Diamantina, Minas Gerais, Brasil).**

Os isolados foram cultivados em 1,5 mL de meio do tipo LB líquido (BERTANI, 1951), incubados a 28 °C e agitados a 180 rpm (rotações por minuto) durante 12 h. O crescimento microbiano foi monitorado por leitura espectrofotométrica (OD_{600}). As culturas multiplicadas foram usadas em 3 tratamentos, em triplicata, contendo o herbicida glyphosate nas doses de 4 ppm e 8 ppm, além do controle, sem a adição do herbicida ao meio de cultura. O herbicida foi esterilizado com Millex Syringe filter de 33 mm (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) diretamente no meio de cultura líquido LB. Alíquotas de 100 µL de cada espécie bacteriana previamente crescidas até atingirem a $OD_{600} = 0,25 - 0,3$ foram inoculadas em 300 mL de meio LB, com e sem herbicida e incubadas a 28 °C em estufa agitadora, a 180 rpm, no escuro. O crescimento bacteriano foi monitorado em intervalos de tempo de 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 16 h e 20 h, por meio de leitura espectrofotométrica (OD_{600}). O critério de avaliação consistiu da comparação das curvas de crescimento bacteriano, na presença e na ausência do herbicida glyphosate. Os dados referentes ao crescimento bacteriano foram plotados em função do tempo e das medições da OD_{600} (Figura 1) e foram submetidos a análise de variância pelo teste F a 5% de probabilidade (Systat 13, Systat Software, Inc., 2009). O efeito de doses foi comparado pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade e o crescimento no período foi ajustado por meio de curva sigmoidal logística de três parâmetros utilizando-se o programa SigmaPlot 12.0 (Systat Software, Inc).

Pela análise de variância observou-se ausência de efeito significativo para a interação período x concentração, por isto a derivação da análise foi para os fatores individuais. Na Figura 1, nota-se o crescimento diferenciado entre as cinco espécies do gênero *Bacillus* estudadas. Na Figura 2, observa-se o efeito negativo das concentrações de glyphosate no crescimento de *B. anthracis*, *B. megaterium* e *B. thuringiensis* com reduções na ordem de 2,74%, 4,18% e 5,44%, respectivamente, quando em ambiente com concentração de 8 ppm do herbicida. As diferentes doses do herbicida não apresentaram efeitos sobre o crescimento das espécies *B. licheniformis* e *B. subtilis*.

Alguns autores têm sugerido que o glyphosate pode causar danos à ecologia bacteriana do solo e, conseqüentemente, provocar deficiência de micronutrientes para as plantas (DICK et al., 2010; FENG et al., 2005; HANEY et al., 2000; KING et al., 2001; PÉREZ et al., 2007; ROSA et al., 2010; TIRONI et al., 2009). Estudos sobre efeitos do glyphosate na biomassa e na atividade microbiana no solo, realizados por Haney et al. (2000) e Araújo et al. (2003), mostraram que o glyphosate foi rapidamente degradado por microrganismos, e que mesmo em doses muito elevadas, este herbicida não afetou a atividade microbiana.

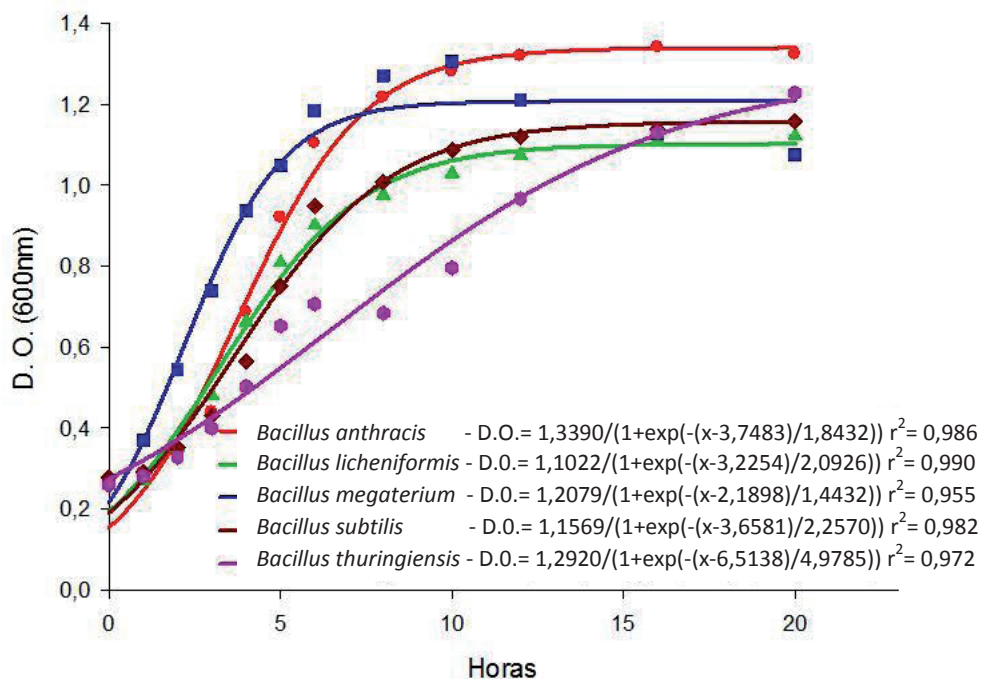


Figura 1. Curvas de crescimento de cinco espécies do gênero *Bacillus* em meio líquido, na ausência do herbicida glyphosate. D.O. = densidade óptica (D.O. = 600nm) medida por espectrofotômetro.

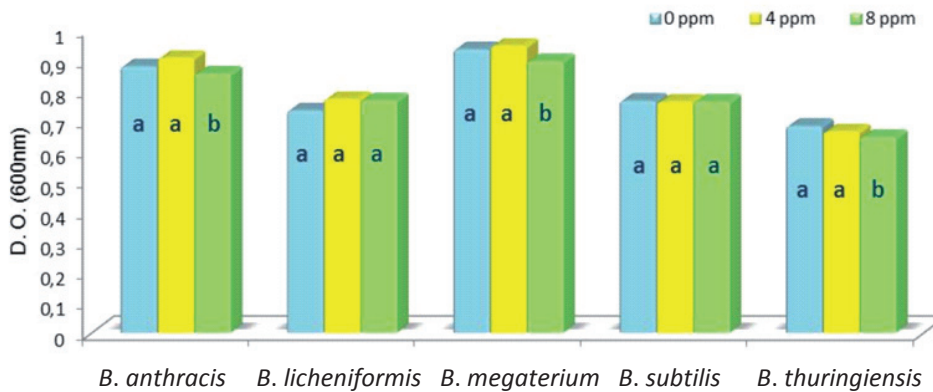


Figura 2. Gráfico do crescimento de cinco espécies do gênero *Bacillus*, medido pela densidade óptica (D.O.), em meio de cultura líquido com 0, 4 e 8 ppm de glyphosate. D.O. = densidade óptica (D.O. = 600nm) medida por leitura espectrofotométrica. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, para cada isolado, pelo teste Duncan ($p < 0,05$).

Weaver et al. (2007) relataram que o efeito do glyphosate na comunidade microbiana do solo é muito pequeno e apenas transiente. Diferentes grupos de bactérias metabolizam o glyphosate por meio de uma via alternativa que cliva as ligações carbono-fosfato da molécula (DICK; QUINN, 1995; SANTOS et al., 2005) e muitos microrganismos utilizam o glyphosate como fonte de fósforo quando este elemento químico está ausente no meio (LIU et al., 1995; PIPKE et al., 1987). Vários trabalhos demonstraram o papel positivo desempenhado por diferentes espécies de *Bacillus* na decomposição de glyphosate (WALLNOFER, 1969; WALLNOFER; BADER, 1970).

No estudo realizado por Figueiredo et al. (2010), o herbicida apresentou efeito negativo, *in vitro*, sobre o crescimento de três das cinco espécies de rizobactérias do gênero *Bacillus* avaliadas (*B. anthracis*, *B. megaterium* e *B. thuringiensis*) e nenhum efeito, negativo ou positivo, sobre o crescimento de duas espécies *B. subtilis* e *B. licheniformis*. Esses resultados indicaram haver diferenças interespecíficas no gênero *Bacillus* com relação à habilidade de metabolizar o herbicida.

Agradecimentos

À Embrapa, CNPq e FAPEMIG.

Referências

- ALTEMBURG, S. N.; LUZZARDI, R.; LOVATTO, P. B. The important role of biodiversity in organic soil quality in agricultural production systems: an approach for microbiology edaphic as bioindicators. **Caderno de Pesquisa: Série Biologia**, Santa Cruz do Sul, v. 22, n. 2, p. 18-36, 2010.
- ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R.; ABARKELI, R. B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. **Chemosphere**, Oxford, v. 52, p. 799-804, 2003.
- BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 62, p. 293-300, 1951.
- BORBA, M. F.; AMORIM, S. M. Fungos micorrízicos arbusculares em sempre-vivas: subsídio para cultivo e replantio em áreas degradadas. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n. 2, p. 20-27, 2007.
- DICK, R. E.; QUINN, J. P. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation.

Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 43, n. 3, p. 545-550, 1995.

DICK, R. E.; LORENZ, N.; WOJNO, M.; LANE, M. Microbial dynamics in soils under long-term glyphosate tolerant cropping systems. In: WORLD CONGRESS OF SOIL SCIENCE, 19., 2010, Brisbane. **Soil solutions for a changing world**. Brisbane: International Union of Soil Science: ASSSI, 2010. 1 CD-ROM.

FENG, P. C. C.; BAILEY, G. J.; CLINTON, W. P.; BUNKERS, G. J.; ALIBHAI, M. F.; PAULITZ, T. C.; KIDWELL, K. K. Glyphosate inhibits rust diseases in glyphosate-resistant wheat and soybean. **Proceedings of Natural Academic Science**, v. 102, n. 8, p. 17290-17295, 2005.

FIGUEIREDO, J. E. F.; SILVA, J. A. A.; LANZA, F. E.; COSTA, G. M. C.; RAMOS, T. C. D. A.; KARAM, D. Efeito in vitro de glyphoste sobre *Bacillus* spp. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28.; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE LAGARTA DO CARTUCHO, 4., 2010, Goiânia. **Potencialidades, desafios e sustentabilidade**: resumos expandidos. Goiânia: ABMS, 2010. 1 CD-ROM.

HANEY, R. L.; SENSEMANB, S. A.; HONSB, F. M.; ZUBERERB, D. A. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass full access. **Weed Science**, Champaign, v. 48, n. 1, p. 89-93, 2000.

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

KING, C. A.; PURCELL, L. C.; VORIES, E. D. Plant growth and nitrogenase activity of glyphosate-tolerant soybean in response to foliar glyphosate applications. **Agronomy Journal**, Madison, v. 93, n. 2, p. 176-186, 2001.

KONSTANTINOOU, I. K.; HELA, D. G.; TRIANTAFYLLOS, A. A. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. **Environmental Pollution**, Essex, v. 141, p. 555-570, 2006.

LANCASTER, S. H.; HOLLISTER, E. B.; SENSEMAN, S. A.; GENTRY, T. J. Effects of repeated glyphosate applications on soil microbial community composition and the mineralization of glyphosate. **Pest Management Science**, Sussex, v. 66, n. 1, p. 59-64, 2010.

LANE, M. **The effect of glyphosate on soil microbial communities**. 2011. 88 p. Dissertação (Mestrado) - The Ohio State University, Ohio.

LIU, L.; PUNJA, Z. K.; RAHE, J. E. Effect of *Phytium spp.* and glyphosate on phytoalexin production and exudation by bean (*Phaseolus vulgaris* L.) roots grown in different media. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, The Hague, v. 47, n. 6, p. 391-405, 1995.

MARTÍNEZ-TOLEDO, M. V.; SALMERON, V.; GONZALEZ-LOPEZ, J. Effect of the insecticides methylpyrimifos and chlorpyrifos on soil microflora in an agricultural loam. **Plant and Soil**, The Hague, v. 147, n. 1, p. 25-30, 1992.

MENTEN, J. O. M.; SAMPAIO, I. A.; MOREIRA, H.; FLORES, D.; MENTEN, M. **O setor de defensivos agrícolas no Brasil**: Sindag: dados de mercado. Disponível em:

<<http://www.sindag.com.br/upload/OSetordeDefensivosagricolasnoBrasil.doc>> . Acesso em: 16 jun. 2012.

PARTOAZAR, M.; HOODAJ, M.; TAHMOURESPOUR, A. The effect of glyphosate application on soil microbial activities in agricultural land. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 83, p. 19419-19424, 2011.

- PÉREZ, G. L.; TORREMORELL, A.; MUGNI, H.; RODRÍGUEZ, P.; VERA, M. S.; NASCIMENTO, M.; ALLENDE, L.; BUSTINGORRY, J.; ESCARAY, R.; FERRARO, M.; IZAGUIRRE, I.; PIZARRO, H.; BONETTO, C.; MORRIS, D. P.; ZAGARESE, H. Effects of the herbicide roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. **Ecological Applications**, Tempe, v. 17, n. 8, p. 2310-2322, 2007.
- PIPKE, R.; SCHULZ, A.; AMRHEIN, N. Uptake of glyphosate by an *Arthrobacter* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, p. 974-978, 1987.
- POLEZA, F.; SOUZA, R. C.; STRAMOSK, C. A.; RORIG, L. R.; RESGALLA J. R. C. Avaliação da toxicidade aguda para o organismo-teste *vibrio fischeri* dos principais herbicidas e inseticidas aplicados na lavoura de arroz irrigado dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 18, p. 107-114, 2008.
- ROSA, D. D.; BASSETO, M. A.; CAVARIANI, C.; FURTADO, E. L. Efeito de herbicidas sobre agentes fitopatogênicos. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 3, p. 379-383, 2010.
- SCARDOELLI, M. G.; BURIOÇA, A. A.; OLIVEIRA, M. L. F.; WAIDMAN, M. A. P. Intoxicações por agrotóxicos notificadas na 11ª Regional de Saúde do Estado do Paraná. **Ciência Cuidado e Saúde**, v. 10, n. 3, p. 549-555, 2011.
- SANTOS, J. B.; FERREIRA, E. A.; KASUYA, M. C. M.; SILVA, A. A.; PROCÓPIO, S. D. O. Tolerance of Bradyrhizobium strains to Glyphosate formulations. **Crop Protection**, Guildford, v. 24, n. 6, p. 543-547, 2005.
- SEBIOMO, A.; OGUNDERO, V. W.; BANKOLE, S. A. Effect of four herbicides on microbial population, soil organic matter and dehydrogenase activity. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 770-778, 2011.
- SHEHATA, A. A.; SCHRÖD, W.; ALDIN, A.A.; HAFEZ, H. M.; KRÜGER, M. The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota in vitro. **Current Microbiology**, New York, v. 66, n. 4, p. 350-358, 2013.
- TIRONI, S. P.; BELO, A. F.; FIALHO, C. M. T.; GALON, L.; FERREIRA, E. A.; SILVA, A. A.; COSTA, M. D.; BARBOSA, M. H. P. Effect of herbicides on soil microbial activity. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v. 27, p. 995-1004, 2009.
- WALLNOFER, P. The decomposition of urea herbicides by *Bacillus sphaericus* isolated from soil. **Weed Research**, Oxford, v. 9, p. 333-339, 1969.
- WALLNOFER, P. R.; BADER, J. Degradation of urea herbicides by cell-free extracts of *Bacillus sphaericus*. **Applied Microbiology**, Washington, v. 19, n. 5, p. 714-717, 1970.
- WARDLE, D. A. Impacts of disturbance on detritus food webs in agro-ecosystems of contrasting tillage and weed management practices. **Advances in Ecological Research**, London, v. 26, p. 105-182, 1995.
- WEAVER, M. A.; KRUTZ, L. J.; ZABLOTOWICZ, R. M.; REDDY, K. N. Effects of glyphosate on soil microbial communities and its mineralization in a Mississippi soil. **Management Science**, Providence, v. 63, p. 388-393, 2007.
- ZILLI, J. E.; BOTELHO, G. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Efeito de glyphosate e imazaquin na comunidade bacteriana do rizoplano de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e em características microbiológicas do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 32, n. 2, p. 633-642, 2008.

ZULU, J. N.; VARISANGA, M. D.

Microbiology and mycology. African Virtual University. Disponível em: <<http://www.out.ac.tz/avu/images/Biology/Microbiology20and/20Mycology/.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2012.

**Circular
Técnica, 191**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Endereço: Rod. MG 424 km 45 Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027 1100
Fax: (31) 3027 1188
E-mail: cnpms.sac@embrapa.br
1ª edição
1ª impressão (2013): on line

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



**Comitê de
publicações**

Presidente: Presidente: Sidney Netto Parentoni.
Secretário-Executivo: *Elena Charlotte Landau.*
Membros: *Dagma Dionísia da Silva, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro, Monica Matoso Campanha, Maria Marta Pastina, Rosângela Lacerda de Castro e Antonio Claudio da Silva Barros.*

Expediente

Revisão de texto: *Antonio Claudio da Silva Barros.*
Normalização bibliográfica: *Rosângela Lacerda de Castro.*
Tratamento das ilustrações: *Tânia Mara A. Barbosa.*
Editoração eletrônica: *Tânia Mara A. Barbosa.*