



EFEITO IN VITRO DE GLYPHOSATE SOBRE RIZOBACTÉRIAS DO GÊNERO *Bacillus* spp.

JOSÉ EDSON FONTES FIGUEIREDO (Embrapa Milho Sorgo, MG, Brasil, jeff@cnpms.embrapa.br), JÉSSICA ALINE ALVES SILVA (Engenheira Ambiental, bolsista da Embrapa Milho Sorgo, jessicaalial@gmail.com), FABRÍCIO EUSTÁQUIO LANZA (Doutorando, Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, MG, falanza@bol.com.br), GABRIELLA MÁXIMO CLAUDINO COSTA (Acadêmica da UNIFEMM, bolsistas da Embrapa Milho e Sorgo, galbismaximo@gmail.com), TALITA COELI DANGELIS de APARECIDA RAMOS (Acadêmica da UNIFEMM, bolsistas da Embrapa Milho e Sorgo, talita.tchely@hotmail.com), DÉCIO KARAM (Embrapa Milho Sorgo, MG, Brasil, karam@cnpms.embrapa.br)

RESUMO - O uso crescente de herbicidas para reduzir as perdas na produção agrícola tem sido questionado em função da possível contaminação ambiental e efeitos negativos sobre a microbiota do solo. Microrganismos são componentes naturais do solo e desempenham papel crucial na ciclagem de nutrientes e na fertilidade dos solos. Os efeitos dos herbicidas sobre a atividade microbiana têm sido estudado essencialmente em análises diretas do solo mas os resultados são conflitantes devido ao grande número de variáveis. Este estudo avaliou o efeito, in vitro, do herbicida glyphosate sobre o crescimento de cinco espécies de bactérias do genero *Bacillus* (Firmicutes) previamente isoladas da rizosfera da planta Sempre-viva (*Syngonanthus elegans* var. *elegans*). Foram utilizadas duas doses de glyphosate (N-(phosphonomethyl)glycine): 4,0 ppm e 8,0 ppm. As bactérias foram cultivadas em meio LB líquido com três repetições para cada dose do herbicida e para o controle. Foram realizadas leituras da densidade óptica (OD₆₀₀) em intervalos variando de zero a 20 horas. As análises estatísticas revelaram haver diferenças significativas entre os tratamentos em três espécies de *Bacillus* estudadas indicando que o glyphosate apresenta efeito inibidor do crescimento bacteriano.

Palavras-chave: herbicida, crescimento bacteriano, *Syngonanthus elegans*

INTRODUÇÃO

O uso de herbicidas constitui uma prática comum na agricultura moderna visando reduzir as perdas de produtividade das culturas. De fato, os herbicidas constituem o grupo de moléculas agroquímicas mais comercializadas em todo o mundo (MENTEN *et al.*, 2010). Somente no Brasil, 476 formulações com aproximadamente uma centena de ingredientes ativos estão registradas junto ao MAPA (SCARDOELLI *et al.*, 2012). Nas últimas décadas, o uso crescente desses produtos químicos na agricultura gerou contaminação dos solos agrícolas e dos lençóis freáticos (SEBIOMO *et al.*, 2011) e gerou, conseqüentemente, grande interesse de diferentes setores da sociedade com relação aos possíveis efeitos tóxicos dessas substâncias sobre a microflora do solo (KONSTANTINO *et al.*, 2006). Estudo realizado por Wardle (1995) mostrou que os herbicidas apresentam efeito inibidor sobre o crescimento de vários organismos que compõem a fauna do solo.

Estudos sobre os efeitos dos herbicidas sobre a atividade microbiana do solo de clima temperado foram conduzidos essencialmente por meio de análises diretas do solo e os resultados são conflitantes, possivelmente devido ao 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 sobre 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).

Vasta gama de microrganismos considerados como bioindicadores se desenvolve junto à rizosfera de plantas superiores (BORBA & AMORIM, 2007; ALTEMBURG *et al.*, 2010), tais como a sempre-viva (*Syngonanthus elegans* var. *elegans*). Dentre esses, destacam-se as bactérias, devido à sua abundância, diversidade e capacidade de subsistir em regiões sob as mais variadas condições ambientais. O grupo 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).

O presente estudo teve por objetivo, avaliar o efeito, *in vitro*, do herbicida glyphosate sobre o crescimento de rizobactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* (Filo Firmicutes) isoladas da rizosfera da planta ornamental Sempre viva, *Syngonanthus elegans* var. *elegans*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica Molecular da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais, entre os anos de 2009/2011. Foram utilizadas 5 espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* isoladas da rizosfera da planta ornamental Sempre-viva (*Syngonanthus elegans* var. *elegans*), nativa no Parque Nacional da Sempre-Viva, Localizado no município de Diamantina, Minas Gerais, Brasil. O isolamento das bactérias foi realizado no ano de 1997 e são mantidas em coleção da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. 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). 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 4ppm e 8 ppm, além do controle, sem a adição do herbicida ao meio de cultura. O herbicida foi filtrado diretamente no meio de cultura líquido LB. Alíquotas de 100 μ L 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 180rpm, no escuro. O crescimento bacteriano foi monitorado em intervalos de tempo de 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 8h, 10h, 12h, 16h e 20h, por meio de leitura espectrofotométrica (OD_{600}). O critério avaliação consistiu da comparação das curvas de crescimento bacteriano, na presença e na ausência do herbicida glyphosate.

Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 12 x 3 em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, com 12 períodos de leitura (0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 16 e 20 horas) e três doses do herbicida glyphosate (0; 4 e 8 ppm). Os dados foram submetidos a análise de variância pelo teste F a 5% de probabilidade (Systat 13, Systat Software, Inc) . O efeito de doses foi comparado pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade e o crescimento no período foi ajustado através de curva sigmoideal logística de três parâmetros utilizando-se o programa SigmaPlot 12.0 (Systat Software, Inc).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram utilizadas cinco espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. anthracis*, *B. megaterium* e *B. thuringiensis*. O efeito das duas doses de glyphosate (4ppm e 8ppm) sobre o crescimento bacteriano, avaliado por meio da leitura da densidade óptica (OD_{600}) de amostras de culturas líquidas coletadas em intervalos regulares de tempo para todos os isolados foram plotados em função do tempo e das medições da OD_{600} (Figura 1).

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. Os resultados referentes ao crescimento podem ser visto na Figura 1, onde 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*.

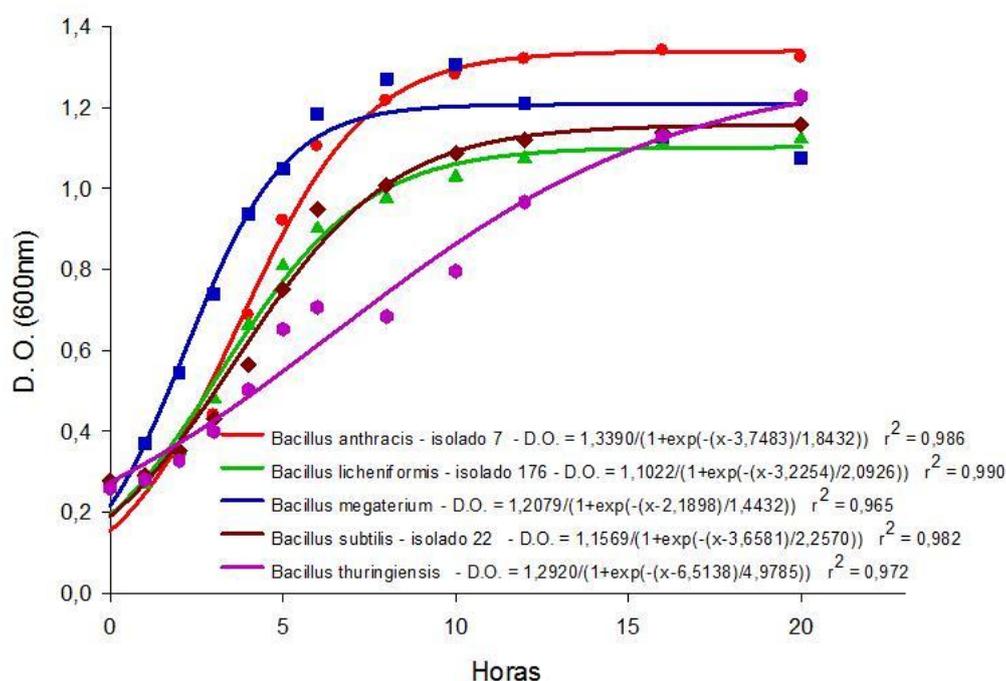


Figura 1 - Curvas de crescimento de de *Bacillus* spp. em meio líquido com adição do herbicida glyphosate. D.O.= densidade óptica (DO=600nm) medida por espectrofotômetro.

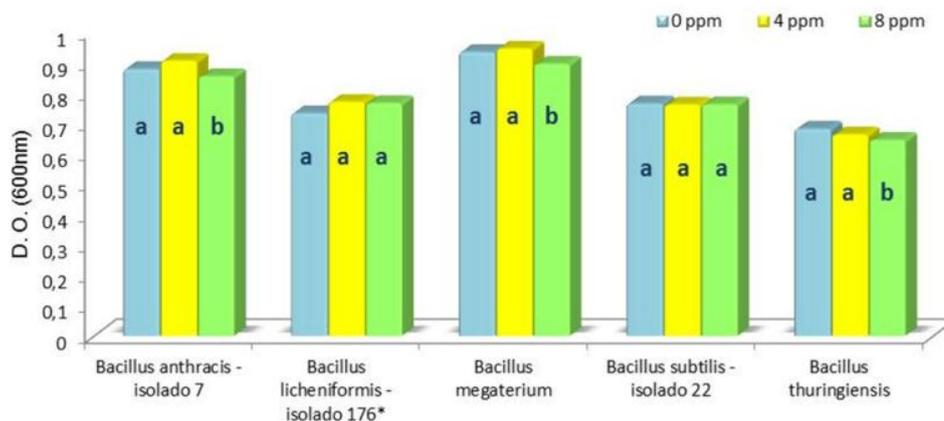


Figura 2 – Gráfico do crescimento de *Bacillus* spp. em meio líquido com doses diferentes de glyphosate. D.O.= densidade óptica (D.O.=600nm) medida por leitura espectrofotométrica.

Alguns autores tem sugerido que o glyphosate pode causar danos à ecologia bacteriana do solo, conseqüentemente, provocar deficiência de micronutrientes para as plantas (HANEY *et al.*, 2000; KING *et al.*, 2001; FENG *et al.*, 2005; PÉREZ *et al.*, 2007; TIRONI, *et al.*, 2009; DICK *et al.*, 2010; ROSA *et al.*, 2010). Estudo sobre efeitos do glyphosate na biomassa e a atividade microbiana no solo, realizado por HANEY *et al.*, (2000) mostrou que o glyphosate foi rapidamente degradado por microrganismos, e mesmo doses muito elevadas deste herbicida não afetou a atividade microbiana. Diferentes grupos de bactérias metabolizam o glyphosate por meio de uma via alternativa que cliva as ligações carbono-fosfato (DICK & QUINN, 1995; SANTOS *et al.*, 2005) e muitos microrganismos utilizam a molécula do glyphosate como fonte de fósforo, quando este elemento químico está ausente no meio (PIPKE *et al.*, 1987; LIU *et al.*, 1991).

Vários trabalhos demonstraram o papel positivo desempenhado por diferentes espécies de *Bacillus* na decomposição de glyphosate (WALLNOFER, 1969; WALLNOFER & BADER, 1970). No presente estudo, o herbicida apresentou efeito negativo sobre o crescimento de três das cinco espécies avaliadas, indicando haver diferenças interespecíficas no gênero *Bacillus*, com relação à habilidade de metabolizar o herbicida.

CONCLUSÃO

O herbicida glyphosate apresentou efeito negativo sobre o crescimento, *in vitro*, de três espécies (*B. anthracis*, *B. megaterium* e *B. thuringiensis*) de rizobactérias do

gênero *Bacillus* e nenhum efeito negativo, ou positivo, sobre o crescimento de duas espécies *B. subtilis* e *B. licheniformis*.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa, CNPq e FAPEMIG

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. Universidade de Santa Cruz do Sul, **Caderno de Pesquisa: Série Biologia**, v. 22, n. 2, p. 18-36, 2010. ISSN: 1677-5600.
- BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, 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**, v. 43, no. 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 **19th World Congress of Soil Science**, 2010.
- 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.
- HANEY, R.L.; SENSEMAN, S.A.; HONS, F.M.; ZUBERER, D.A. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass full access. **Weed Science**, v. 48, no. 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**, 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**, v. 93, n. 2, p. 176-186, 2001.

KONSTANTINO, 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**, v. 141, p. 555-570, 2006.

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**, v. 47, n. 6, p. 391-405, 1995.

MARTINEZ-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**, 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 junho 2012

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**, v. 17, n. 8, p. 2310–2322, 2007.

PIPKER, R.; SCHULZ, A.; AMRHEIN, N. Uptake of glyphosate by an *Arthrobacter sp.* **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, pp. 974-8, 1987.

POLEZA, F.; SOUZA, R.C.; STRAMOSK, C.A.; RORIG, L.R.; RESGALLA JR.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. **Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, 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**, 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**, 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.

- 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**, v. 27, p. 995-1004, 2009.
- WALLNOFER, P. The decomposition of urea herbicides by *Bacillus sphaericus* isolated from soil. **Weed Research**. v. 9, p. 333–339, 1969.
- WALLNOFER, P.R.; BADER, J. Degradation of urea herbicides by cell-free extracts of *Bacillus sphaericus*. **Applied Microbiology**, 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**, v. 26, p. 105-182, 1995.
- ZULU, J.N.; VARISANGA, M.D. **Microbiology and Mycology**. African Virtual University. Disponível em: <<http://www.out.ac.tz/avu/images/Biology/Microbiology20and20Mycology/.pdf>> Acesso em 15 maio. 2012.