

JOSÉ BARBOSA DOS SANTOS

EFEITO DO GLYPHOSATE SOBRE O CRESCIMENTO DE ESTIRPES DE
Bradyrhizobium

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2004

JOSÉ BARBOSA DOS SANTOS

EFEITO DO GLYPHOSATE SOBRE O CRESCIMENTO DE ESTIRPES DE
Bradyrhizobium

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

APROVADA: 13 de fevereiro de 2004.

Prof^a. Maria Catarina M. Kasuya
(Conselheira)

Prof. Francisco Affonso Ferreira
(Conselheiro)

Prof. Silvério de Paiva Freitas

Prof. Valterley Soares Rocha

Prof. Antonio Alberto da Silva
(Orientador)

Ao meu amor Alyne Myriam por me mostrar o maior de todos os sentimentos.

Aos meus pais, Sebastião e Maria por terem me ensinado tudo sobre respeito, humildade e como agradecer a Deus pela vida.

Aos meus irmãos, Gorete, Edson, Arnaldo, Imaculada, Inês, José Carlos e Elizângela, e ao sobrinho Vitor, pelos quais tenho o maior orgulho e admiração.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, em particular aos Departamentos de Fitotecnia e Microbiologia, e ao CNPq, pela oportunidade de realização desse curso.

Ao Professor Antonio Alberto da Silva, pela orientação e amizade.

À Professora Maria Catarina, pelo estímulo e sugestões que contribuíram para realização deste trabalho.

Ao Professor Francisco Affonso, pelo auxílio durante a realização do curso e pelas sugestões.

Aos amigos Sérgio, Fábio, Evander, Eduardo (Juninho), pelo companheirismo.

Um agradecimento especial ao amigo Tadeu, que apesar de ter partido deixando um imenso vazio, se faz presente pela amizade e pelas boas lembranças.

Aos colegas Adriano, Andréia, Aroldo, Francisco, Gilmara, Leonardo, Rogério Ricardo, Luis Henrique e Gino, pela amizade e pelo convívio.

Ao Centro Nacional de Pesquisa da EMBRAPA/Agrobiologia, pelo fornecimento das estirpes de *Bradyrhizobium*.

BIOGRAFIA

JOSÉ BARBOSA DOS SANTOS, filho de Sebastião das Graças dos Santos e Maria Marta Barbosa dos Santos, nasceu em Presidente Bernardes, Estado de Minas Gerais, no dia 01 de maio de 1976.

Em maio de 2002, graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Em setembro de 2002, iniciou o curso de Mestrado em Fitotecnia na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, submetendo-se à defesa de tese em 13 de fevereiro de 2004.

ÍNDICE

<i>RESUMO</i>	vii
<i>ABSTRACT</i>	ix
<i>1. INTRODUÇÃO GERAL</i>	01
<i>2. SENSIBILIDADE DE ESTIRPES DE Bradyrhizobium AO GLYPHOSATE</i>	03
2.1 Abstract.....	04
2.2 Introdução.....	04
2.3 Material e Métodos.....	06
2.4 Resultados e Discussão.....	07
2.5 Conclusões.....	11
2.6 Literatura Citada.....	11
<i>3. INFLUÊNCIA DE HERBICIDAS SOBRE O CRESCIMENTO DE Bradyrhizobium</i>	13
3.1 Abstract.....	14
3.2 Introdução.....	15
3.3 Material e Métodos.....	16
3.4 Resultados e Discussão.....	17
3.5 Conclusões.....	21
3.6 Literatura Citada.....	22
<i>4. EFEITOS DE FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE GLYPHOSATE SOBRE ESTIRPES DE Bradyrhizobium</i>	24
4.1 Abstract.....	25
4.2 Introdução.....	26
4.3 Material e Métodos.....	27
4.4 Resultados e Discussão.....	28

4.5 Conclusões.....	34
4.6 Literatura Citada.....	34
5. TOLERÂNCIA DO <i>Bradyrhizobium</i> AO GLYPHOSATE EM MEIO ADICIONADO DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS.....	37
5.1 Abstract.....	38
5.2 Introdução.....	39
5.3 Material e Métodos.....	41
5.4 Resultados e Discussão.....	43
5.5 Conclusões.....	48
5.6 Literatura Citada.....	48
6. CONCLUSÕES FINAIS.....	52
APÊNDICE.....	54
APÊNDICE A.....	55

RESUMO

SANTOS, José Barbosa, M. S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2004. **Efeito do glyphosate sobre o crescimento de estirpes de *Bradyrhizobium***. Orientador: Antonio Alberto da Silva. Conselheiros: Maria Catarina Megumi Kasuya e Francisco Affonso Ferreira.

O plantio, no Brasil, da soja geneticamente modificada, resistente ao glyphosate, permite a utilização desse herbicida também em pós-emergência nessa cultura. Em regiões dos Estados Unidos, aonde esta prática já vem sendo realizada, foi relatado o efeito tóxico do glyphosate a microrganismos, dentre eles o rizóbio, microssimbionte da soja. Decorrente disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito *in vitro* do glyphosate sobre estirpes de *Bradyrhizobium*, recomendadas, nacionalmente, para inoculação em sementes de soja. Foram realizados quatro experimentos em laboratório com as estirpes de *Bradyrhizobium elkanii*: SEMIA 587 e SEMIA 5019, e *Bradyrhizobium japonicum*: SEMIA 5079 e SEMIA 5080. No primeiro experimento avaliou-se o efeito de concentrações crescentes do glyphosate, variando de 0,0 a 43,2 $\mu\text{g L}^{-1}$. No segundo experimento, as estirpes foram submetidas ao glyphosate puro ou em mistura ao herbicida carfentrazone-ethyl e, também, aos herbicidas fomesafen e imazethapyr. As concentrações dos herbicidas foram: 12,9; 3,6; 1,4; e 1,8 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, de glyphosate-K,

fomesafen, imazethapyr e carfentrazone-ethyl. No terceiro experimento, testaram-se as principais formulações comerciais de glyphosate e, por fim, avaliou-se o crescimento das estirpes sob ação do glyphosate em meio de cultura enriquecido de aminoácidos aromáticos. Com base nos resultados, verificou-se que o glyphosate reduziu o crescimento das estirpes de *Bradyrhizobium* em todas as concentrações testadas, sendo esta redução tanto maior, quanto maior a concentração do herbicida no meio de cultura. As estirpes de *Bradyrhizobium* apresentaram sensibilidade diferencial às menores concentrações do glyphosate, sendo SEMIA 587, a mais sensível. Contudo, na maior concentração do glyphosate todas as estirpes tiveram seu crescimento reduzido, em média, 60%. Na comparação entre os herbicidas, observou-se que carfentrazone-ethyl, além de ter proporcionado menor inibição no crescimento de todas as estirpes, reduziu a toxicidade do glyphosate quando em mistura. Os herbicidas que se mostraram mais tóxicos foram fomesafen e imazethapyr. Dentre as marcas comerciais testadas, foi verificado o efeito tóxico dos aditivos presentes nas mesmas, uma vez que o glyphosate puro apresentou toxidez menor, comparado aos produtos formulados. A formulação Zapp Qi[®] apresentou a menor toxidez e Roundup Transorb[®], a maior, causando inibição total do crescimento das estirpes. A suplementação do meio de cultura com aminoácidos aromáticos diminuiu a ação tóxica do glyphosate puro e da formulação comercial Zapp Qi[®], sobre o *Bradyrhizobium*, entretanto, foi indiferente para Roundup Transorb[®], o qual inibiu quase que totalmente o crescimento de três das quatro estirpes testadas independente do enriquecimento do meio.

ABSTRACT

SANTOS, José Barbosa, M. S., Universidade Federal de Viçosa, February of 2004.
Glyphosate effects on *Bradyrhizobium* strains growth. Advisor: Antonio Alberto da Silva. Committee members: Maria Catarina Megumi Kasuya and Francisco Affonso Ferreira.

In Brazil, soybean genetically modified plantation, resistant to glyphosate, will also allow this herbicide use in post emergence in that culture. In the United States areas, where this practice has already being accomplished, it was told the glyphosate toxicant effect to microorganisms, among them the soybean rhizobium microsymbiont. Due to that, this work aimed to evaluate the in vitro glyphosate effect on *Bradyrhizobium* strains, nationally recommended, for soybean seeds inoculation. Four experiments were accomplished in laboratory with *Bradyrhizobium elkanii* strains SEMIA 587 and SEMIA 5019 and *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 and SEMIA 5080. In the first experiment the glyphosate growing concentrations effect was evaluated, varying from 0.0 to 43.2 $\mu\text{g L}^{-1}$. In the second one, the strains were submitted to the pure glyphosate and in mixture to the herbicide carfentrazone-ethyl and also to the herbicides fomesafen and imazethapyr. In the third experiment, it was tested the main commercial formulations of glyphosate and, finally, the strains growth was evaluated under glyphosate action in medium enriched by aromatic amino acids.

Based in these results, it was verified that the *Bradyrhizobium* strains growth was reduced by the glyphosate in all the tested concentrations, being so much this reduction larger, as larger is the concentration of herbicide in the medium. The *Bradyrhizobium* strains presented differential sensibility to the glyphosate smallest concentrations, being SEMIA 587, the most sensitive. However, in the largest glyphosate concentration, all the strains had its growth reduced, on the average, 60%. Comparison the herbicides, it was observed that carfentrazone-ethyl, besides having provided smaller inhibition in all strains growth, reduced the glyphosate toxicity when in mixture. The treatments with fomesafen and imazethapyr were the ones that showed more toxins. Among the tested commercial marks, toxicant effect of its additive was verified in them, once the pure glyphosate presented smaller toxicity, compared to the formulated products. The formulation Zapp Qi[®] presented the smallest toxicity and Roundup Transorb[®], the largest, causing total inhibition of strains growth. The supplementation of the medium with aromatic amino acids decreased the toxicant action of the pure glyphosate and of the commercial formulation Zapp Qi[®], on *Bradyrhizobium*, however, it was indifferent for Roundup Transorb[®], which totally inhibited the growth of three of the four tested strains, not depending of the enrichment medium.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A fixação biológica de nitrogênio é um processo chave para a sustentabilidade dos agroecossistemas, por ser responsável pela fixação anual de 175 milhões de toneladas de nitrogênio atmosférico (N₂). Nesse processo, a simbiose entre os rizóbios e as leguminosas é considerada a mais importante devido à eficiência na fixação do N₂.

No Brasil, a simbiose entre plantas da família *Leguminosae* e rizóbios, representa elevada economia, sendo a associação da soja com as bactérias do gênero *Bradyrhizobium* mais importante economicamente, pois permite o cultivo de milhões de hectares desta cultura sem a adição de adubos nitrogenados. Essa eficiência é o resultado de programas de melhoramento vegetal que priorizaram o desenvolvimento de cultivares com alta especificidade com as estirpes de rizóbio e alta eficiência na fixação biológica de nitrogênio. Todas as práticas agrícolas nesta cultura deverão considerar os impactos sobre o rizóbio, a fim de possibilitarem a perpetuação dos simbiossantes, sem prejuízos para a associação.

Dentre as práticas agrícolas, a aplicação de herbicidas constitui hoje uma das principais ferramentas para um bom programa de manejo integrado das plantas daninhas. O emprego de tais agroquímicos tornou-se de uso generalizado, principalmente, pelo menor custo e maior eficiência de controle das plantas daninhas comparado aos demais métodos de controle convencionais.

No entanto, os herbicidas podem afetar microrganismos do solo, seja pela interferência em rotas metabólicas comuns com as plantas ou pela presença de componentes tóxicos presentes em suas formulações comerciais, os quais, dentre os diversos efeitos, podem facilitar a penetração dos ingredientes-ativos nas células microbianas.

O glyphosate é hoje o herbicida mais comercializado no País devido às suas características de não seletividade, rápida ação herbicida nas plantas sensíveis tratadas, sem efeito residual no solo para culturas em sucessão, baixo custo e a recente liberação para culturas transgênicas. No caso específico da soja resistente ao glyphosate, este será aplicado diretamente sobre essa cultura, translocando-se no interior da planta sem levá-la à morte.

A liberação do plantio da soja transgênica no Brasil, levou a questionamentos sobre a possibilidade de escape gênico para a natureza, problemas ao ser humano em longo prazo, predomínio de espécies de daninhas tolerantes e/ ou aparecimento de espécies resistentes ao glyphosate com redução na biodiversidade. Também, não há estudos envolvendo os possíveis efeitos desse herbicida sobre a simbiose da soja com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*.

Em países como Estados Unidos onde a soja resistente ao glyphosate é cultivada há mais tempo, há relatos de toxidez desse herbicida sobre estirpes de rizóbio, tanto diretamente (*in vitro*), quanto na simbiose, afetando a nodulação.

Devido à importância da fixação biológica de nitrogênio para a cultura da soja no Brasil, tornam-se necessários estudos que avaliem o impacto da ação do glyphosate sobre as estirpes recomendadas para as variedades nacionais. É importante também avaliar o efeito dos produtos formulados versus o glyphosate puro, tendo em vista o grande número de marcas comerciais encontrado no mercado à base desse ingrediente ativo.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do herbicida glyphosate puro ou nas diferentes marcas comerciais sobre o crescimento *in vitro* de estirpes de *Bradyrhizobium*, recomendadas para inoculação nas sementes das variedades nacionais de soja.

2. SENSIBILIDADE DE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* AO GLYPHOSATE

SENSIBILITY OF Bradyrhizobium STRAINS TO GLYPHOSATE

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade de três estirpes de *Bradyrhizobium*, atualmente recomendadas para a produção de inoculantes de sementes de soja no Brasil ao herbicida glyphosate. O crescimento das estirpes de *B. japonicum* SEMIA 5079 e de *B. elkanii* SEMIA 5019 e SEMIA 587, através da leitura da densidade ótica (560 nm) em intervalos de 12 horas e da confecção de curvas de crescimento com 126 horas de duração, foram obtidos usando concentrações de 0,0; 5,40; 10,80; 21,60 e 43,20 $\mu\text{g L}^{-1}$ do glyphosate no meio YEM líquido. Os resultados demonstraram que as reduções de crescimento das três estirpes na presença da menor concentração do glyphosate foram de 18,4 %, 29,2 % e 34,6 %, respectivamente para as estirpes SEMIA 5079, SEMIA 5019 e SEMIA 587, sendo que, de modo geral, quanto maior a concentração do herbicida no meio de cultura, maior foi a inibição do crescimento das estirpes. As estirpes avaliadas apresentaram sensibilidade diferencial ao ingrediente ativo de glyphosate nas concentrações de 5,4; 10,8 e 21,6 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo

possível determinar a seguinte ordem de sensibilidade: SEMIA 587 > SEMIA 5019 > SEMIA 5079. Na concentração de 43,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ do glyphosate não se observou diferenças de crescimento entre as estirpes sendo inibido, em média, 58% do crescimento.

Palavras-chave: rizóbio, soja transgênica, EPSP sintase.

2.1 ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of glyphosate concentrations: 0.0, 5.4, 10.8, 21.6, and 43.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ on three *Bradyrhizobium* strains: SEMIA 5079, of *B. japonicum* and SEMIA 5019 and SEMIA 587 of *B. elkanii*, used commercially in the soybean crops in Brazil, grown *in vitro* using YEM liquid medium. The growth of the strains was evaluated by reading of the optic density (560 nm) in intervals of 12 hours and of the making of growth curves during 126 hours. The results demonstrated that the reductions of growth of the three strains in the presence of the smallest glyphosate concentration were of 18.4%, 29.2% and 34.6%, respectively to SEMIA 5079, SEMIA 5019 and SEMIA 587. Between the concentration of 5.4 and 21.6 $\mu\text{g L}^{-1}$, the sensibility of growing, of the strains to the glyphosate was to following: SEMIA 587 > SEMIA 5019 > SEMIA 5079. For the concentrations of 43.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ difference was not observed among the strains, inhibiting 58% of the growth.

Key words: rhizobium, transgenic soybean, EPSP sintase.

2.2 INTRODUÇÃO

No Brasil, a soja é a cultura que utiliza a maior quantidade de herbicidas. Com exceção dos cultivos orgânicos, estes produtos são aplicados em praticamente toda área ocupada por esta cultura, consumindo aproximadamente 40% das 174 mil toneladas de herbicidas que anualmente são comercializadas no país (SPADOTTO, 2002). Apesar dos resultados técnico-econômicos altamente positivos no controle das plantas daninhas, os herbicidas podem prejudicar o processo de fixação do N_2 , realizado pela simbiose

desta planta com as bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (BOLLICH et al., 1988; MARENCO et al., 1993; ZAWOZNIK et al., 1995; NOVO et al., 1996). Tais prejuízos se devem à interferência do herbicida no metabolismo do rizóbio, da planta hospedeira ou de ambos os membros da simbiose (MOORMAN, 1986).

O glyphosate é um herbicida de amplo espectro de ação, não-seletivo à soja, mas que com a introdução dos cultivares transgênicos, está sendo aplicado em pós-emergência na cultura, potencializando assim, sua interferência no funcionamento da simbiose, uma vez que a enzima alvo deste herbicida, a EPSP sintase ou EPSPS (5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintase), está presente também nas células bacterianas (CALDWELL, 1999).

Tanto nas plantas superiores como nos microrganismos, esta é uma importante enzima da rota de biossíntese dos aminoácidos aromáticos. Sua inibição pelo glyphosate impede a síntese do triptofano, da tirosina e da fenilalanina e resulta na acumulação do shiquimato e outros ácidos hidroxibenzóicos nas células (HERNANDEZ et al., 1999). Em vista destes efeitos, o glyphosate pode afetar o crescimento das estirpes de *Bradyrhizobium* (EBERBACH & DOUGLAS, 1989; MOORMAN et al., 1992) e reduzir o número e a atividade de fixação de N₂ dos nódulos da soja (MALLIK & TESFAI, 1985; HERNANDEZ et al., 1999).

Apesar dos comprovados prejuízos do glyphosate ao crescimento dos rizóbio e de outros microrganismos do solo (SCHULZ et al., 1985; ARAÚJO et al., 2003; TSUI & CHU, 2003), as estirpes de *Bradyrhizobium* podem demonstrar sensibilidade diferencial a este herbicida. Assim, MALLIK & TESFAI (1985) reportam a existência de diferentes graus de sensibilidade quando dez estirpes deste rizóbio foram crescidas na presença do herbicida. Tais resultados corroboram com os de HERNANDEZ et al. (1999) que verificaram que três estirpes de *Bradyrhizobium* apresentaram diferentes taxas de crescimento quando o glyphosate foi adicionado ao meio de cultura. Este comportamento também foi observado nas estirpes brasileiras, quando da avaliação do efeito de outros defensivos, que não o glyphosate, no crescimento do *Bradyrhizobium* (ARRUDA et al., 2001). Desta forma, KISHINEVSKY et al. (1988) recomendam que a seleção de estirpes para uso em inoculantes de soja considere, além da característica de nodulação e de fixação de N₂, a tolerância aos defensivos agrícolas mais comumente utilizados nesta cultura.

Em vista do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a sensibilidade a concentrações crescentes do glyphosate, de três estirpes de *Bradyrhizobium*, atualmente recomendadas para a produção de inoculantes de sementes de soja no Brasil.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Associações Biológicas/BIOAGRO do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG. Foram avaliadas três estirpes de *Bradyrhizobium*: duas *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019) e uma *B. japonicum* (SEMIA 5079) e cinco concentrações de glyphosate, constituindo um fatorial 3 x 5, com seis repetições.

As estirpes de *Bradyrhizobium* foram obtidas da Coleção de Bactérias Diazotróficas do Centro Nacional de Pesquisa da EMBRAPA/Agrobiologia, sendo as culturas estocadas em meio YEM composto, em g L⁻¹, por: Manitol, 10; K₂HPO₄, 0,05; MgSO₄, 0,02; NaCl, 0,01; extrato de levedura, 0,5; ágar, 15 e com pH ajustado em 6,8, à temperatura de 4 °C. A ativação destas culturas foi realizada segundo método descrito pela EMBRAPA (1994), sendo realizada, posteriormente, sua multiplicação em Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio YEM líquido, incubados em agitador rotatório a 150 rpm e temperatura de 25 °C, até atingir densidade ótica (DO a 560 nm), equivalente a 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC) por mL.

As soluções do glyphosate foram preparadas imediatamente antes do uso, mediante a mistura do ingrediente ativo N-(fosfonometil) glicina (99% de pureza) com água destilada e deionizada (milli-Q), sendo posteriormente esterilizadas por filtração (filtro Millipore[®], 0,25 µm) em condições assépticas. Utilizaram-se as concentrações de 0,0; 5,4; 10,8; 21,6 e 43,2 µg L⁻¹ do ingrediente ativo do glyphosate em meio YEM líquido, o que corresponde, respectivamente, às doses de 0,0; 0,54; 1,08; 2,16 e 4,32 kg ha⁻¹.

Para inoculação e avaliações, utilizou-se placas de ELISA com 96 células de 300 µL de capacidade volumétrica, onde foram adicionados 180 µL de meio YEM líquido (1,33 vez concentrado), 15 µL do inóculo, para cada estirpe e 60 µL da solução-estoque

do herbicida, sendo imediatamente colocadas em câmara de incubação a 25 °C, no escuro. O crescimento das estirpes foi avaliado pela leitura da densidade ótica a 560 nm em espectrofotômetro (Titertek Multiskan Plus MKII, New York, USA), em intervalos de 4 horas nas primeiras 24 horas e posteriormente em intervalos de 12 horas até a estabilização do crescimento, que ocorreu 126 horas após o início da incubação.

A transformação DO x UFC, foi obtida por meio da contagem em placas, precedida pela diluição seriada da suspensão de DO conhecida. Para interpretação dos resultados foram confeccionadas curvas de crescimento a partir do log (UFC) e, os dados obtidos após 126 horas de inoculação foram submetidos à análise de variância, sendo as médias, quando pertinentes, comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento das três estirpes de *Bradyrhizobium* foi reduzido pela presença do glyphosate no meio de cultura (Figuras 1), o que provavelmente se deve à inibição da atividade da EPSP sintase pelo herbicida (SCHULZ et al., 1985). Como consequência, houve o acúmulo citoplasmático do shiquimato, que é o substrato desta enzima, e o desencadeamento do processo de excreção para o meio de cultura, numa tentativa da célula de restabelecer os níveis normais deste metabólito no citoplasma. Assim, HERNANDEZ et al. (1999) observaram que as células de *Bradyrhizobium* crescidas na presença de glyphosate apresentaram incremento médio na concentração do shiquimato intracelular de 190 vezes e extracelular de 45 vezes. Por outro lado, a redução da atividade da EPSP sintase diminui a produção do triptofano, da tirosina e da fenilalanina, o que compromete a síntese de proteínas e, por consequência, o crescimento celular (CALDWELL, 1999).

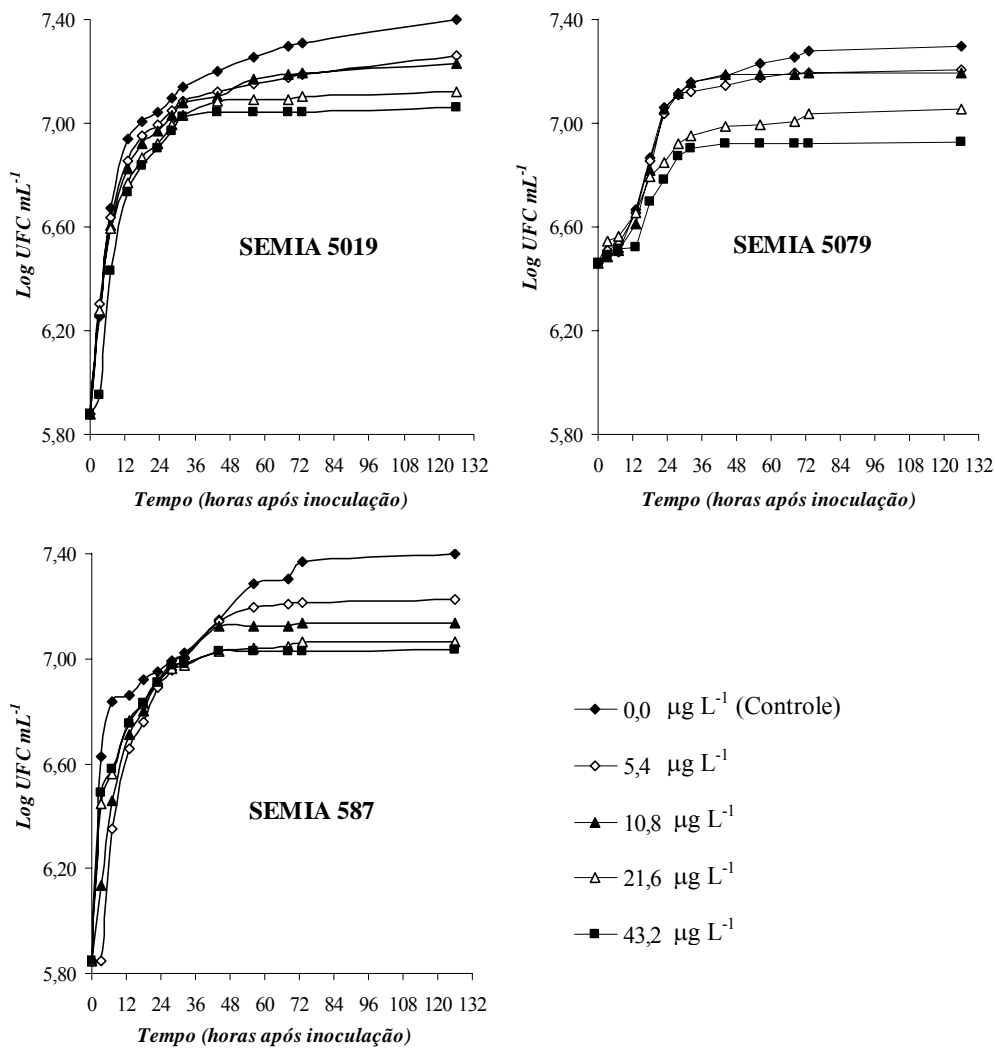


Figura 1. Crescimento das estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 587, medido pelo logaritmo do número de unidades formadoras de colônia (UFC), ao longo do período de incubação em meio de cultura contendo diferentes concentrações de glyphosate.

MOORMAN (1986) não observou redução no crescimento do *B. japonicum* na presença do glyphosate quando aminoácidos aromáticos foram adicionados ao meio de cultura. Neste estudo, o meio de cultura continha aminoácidos aromáticos na sua composição devido a adição do extrato de levedura. Isto indica, por um lado, que a redução do crescimento das estirpes poderia ser ainda maior se os aminoácidos não fossem adicionados ao meio de cultura, e por outro lado, que a quantidade de

aminoácidos fornecidos não foi suficiente para sustentar o crescimento das células na presença do glyphosate ou ainda que os prejuízos advindos do descontrole dos fluxos de carbono pelo acúmulo do shiquimato foram de tal magnitude, que mesmo a célula obtendo os aminoácidos do meio de cultura, não pode manter sua taxa normal de crescimento.

De modo geral, o crescimento das estirpes foi menor quanto maior a concentração do glyphosate no meio de cultura, ainda que houvesse respostas diferenciais das estirpes ao herbicida.

A estirpe mais sensível ao glyphosate foi a SEMIA 587, que apresentou maior redução percentual, em relação ao controle, em todas as concentrações do glyphosate testadas (Figura 1 e Tabela 1). Ao final do período de incubação, foi observado que na menor concentração de glyphosate, esta estirpe apresentou redução de crescimento de 34,6 % em relação ao controle (Tabela 1). Nas maiores concentrações (21,6 e 43,2 $\mu\text{g L}^{-1}$), a redução de crescimento foi, em média 56,7% (Tabela 1).

SEMIA 5019 reduziu seu crescimento em relação ao controle desde as primeiras horas de incubação (Figura 1), porém, em termos percentuais, apresentou sensibilidade intermediária demonstrando, na menor concentração do herbicida, redução de crescimento de 29,2 %, o que não diferiu da concentração de 10,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 1). A estirpe SEMIA 5079 foi a menos sensível ao glyphosate, apresentando redução de 27,66% no crescimento em relação ao controle para a concentração de 21,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 1). Na concentração de 5,4 $\mu\text{g L}^{-1}$, apresentou redução de crescimento de 19,42 %, que também não diferiu da concentração imediatamente superior.

Com base nestes resultados, foi possível determinar a seguinte ordem de sensibilidade das estirpes ao glyphosate: SEMIA 587 > SEMIA 5019 > SEMIA 5079. No entanto, na maior concentração do glyphosate, a redução de crescimento das três estirpes foi próxima a 60 % do controle e não houve diferenças entre elas (Tabela 1). Isto indica que a tolerância destas estirpes ao herbicida é relativa, ou seja, em concentrações elevadas do glyphosate as diferenças de crescimento entre as estirpes desaparecem, pois mesmo as estirpes menos sensíveis têm seu crescimento severamente reduzido.

Tabela 1. Crescimento relativo de três estirpes de *Bradyrhizobium* após 126 horas de incubação em meio de cultura contendo cinco concentrações de glyphosate.

<i>Concentrações de glyphosate</i>	<i>SEMIA 5019</i>	<i>SEMIA 5079</i>	<i>SEMIA 587</i>
$\mu\text{g L}^{-1}$	-----Crescimento relativo (%)-----		
0,0	100,0 aA	100,0 aA	100,0 aA
5,4	70,7 bB	80,6 bA	65,4 bC
10,8	66,4 bB	80,5 bA	53,2 cC
21,6	51,9 cB	72,3 cA	44,9 dC
43,2	41,0 dA	42,2 dA	41,7 dA

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A estirpe SEMIA 5079 de *B. japonicum* foi mais tolerante ao herbicida que as duas estirpes de *B. elkanii*, o que pode indicar que a sensibilidade das estirpes ao glyphosate pode ser uma característica intraespecífica. SCHULZ et al. (1985) observaram variações na taxa de crescimento de doze diferentes bactérias em meio de cultura contendo a mesma concentração deste herbicida. De forma a elucidar este comportamento, eles extraíram as EPSP sintases destas bactérias e verificaram que a inibição da atividade de cada uma das enzimas ocorria em diferentes concentrações do glyphosate, indicando que a sensibilidade das estirpes ao herbicida é consequência da sensibilidade diferencial da enzima EPSP sintase ao glyphosate. Outra hipótese que pode explicar a sensibilidade diferencial é a capacidade de excreção do shiquimato que se acumula nas células em decorrência do bloqueio da EPSP sintase. Nos trabalhos de SCHULZ et al. (1985) e de HERNANDEZ et al. (1999) foi observado que os isolados mais tolerantes ao glyphosate apresentaram maior capacidade de excreção do shiquimato no meio de cultura, podendo este se constituir num mecanismo de manutenção dos fluxos de carbono quando da redução da atividade da EPSP sintase pelo herbicida.

Com base nestes resultados e naqueles de HERNANDEZ et al. (1999) que demonstraram redução da atividade da nitrogenase nos nódulos da soja tratada com glyphosate, sugere-se a realização de experimentos em casa de vegetação e no campo para avaliar os efeitos do glyphosate na nodulação das cultivares brasileiras de soja

transgênica e a possível existência de sensibilidade diferencial na interação planta-microrganismo.

2.5 CONCLUSÕES

- 1) Todas as concentrações do ingrediente ativo do glyphosate reduziram o crescimento das estirpes de *Bradyrhizobium* avaliadas, sendo esta redução tanto maior, quanto maior a concentração do herbicida no meio de cultura;
- 2) As estirpes de *Bradyrhizobium* apresentaram sensibilidade diferencial às menores concentrações do ingrediente ativo do glyphosate avaliadas, sendo possível determinar a seguinte ordem de sensibilidade: SEMIA 587 > SEMIA 5019 > SEMIA 5079;
- 3) A sensibilidade diferencial das três estirpes de *Bradyrhizobium* é dependente da concentração do ingrediente ativo do glyphosate no meio de cultura sendo que, na maior concentração avaliada, todas as estirpes tiveram seu crescimento severamente reduzido.

2.6 LITERATURA CITADA

- ARAÚJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R.; ABARKELI, R.B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. **Chemosphere**, v.52, p.799-804, 2003.
- ARRUDA, J.S.; LOPES, N.F.; MOURA, A.B. Behavior of *Bradyrhizobium japonicum* strains under different herbicide concentrations. **Planta Daninha**, Viçosa, v.19, n.1, p.111-117, 2001.
- BOLLICH, P.K.; DUNIGAN, E.P.; KITCHEN, L.M.; TAYLOR, V. The influence of trifluralin and pendimethalin on nodulation, N₂ (C₂ H₂) fixation, and seed yield of field-grown soybeans (*Glycine max*). **Weed Sci.**, Champaign, v.36, n.1, p.15-19, 1988.
- CALDWELL, D.R. **Microbial Physiol. Metabol.** 2 ed. Belmont: Star, 1999. 403 p.
- EBERBACH, P.L.; DOUGLAS, L.A. Herbicide effects on the growth and nodulation potential of *Rhizobium trifolii* with *Trifolium subterraneum*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.119, n.1, p.15-23, 1989.

- HERNANDEZ, A.; GARCIA-PLAZAOLA, J.I.; BECERRIL, J.M. Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max L. Merr.*). **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.47, n.7, p. 2920-2925, 1999.
- MALLIK, M.A.B.; TESFAI, K. Pesticidal effect on soybean-rhizobia symbiosis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.85, n.1, p. 33-41, 1985.
- MARENCO, R.; LOPES, N.F.; MOSQUIM, P.R. Nodulation and nitrogen fixation in soybeans treated with herbicides. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.5, n.2, p.121-126, 1993.
- MOORMAN, T.B. Effects of herbicides on the survival of *Rhizobium japonicum* strains. **Weed Sci.**, Champaign, v.34, n.4, p.628-633, 1986.
- MOORMAN, T.B.; BECERRIL, J.M.; LYDON, J.; DUKE, S.O. Production of hydroxybenzoic acids by *Bradyrhizobium japonicum* strains after treatment with glyphosate. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.40, n.2, p.289-293, 1992.
- NOVO, M.C.S.; CRUZ, L.S.P.; PEREIRA, J.C.; NAGAI, V.; AMBRÓSIO, L.A. Efeito de linuron e oryzalin no crescimento da planta, na fixação simbiótica do nitrogênio e na produtividade da soja. **Planta Daninha**, Viçosa, v.14, n.1, p.65-81, 1996.
- SCHULZ, A.; KRÜPER, A.; AMRHEIN, N. Differential sensitivity of bacterial 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases to the herbicide glyphosate. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.28, n.3, p.297-301, 1985.
- SPADOTTO, C.A. Monitoração e avaliação de impactos de herbicidas no ambiente, Gramado, RS, 2002. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 23, 2002, Gramado, RS. **Palestras...** Gramado, RS: SBCPD, 2002, 128p.
- TSUI, M.T.K.; CHU, L.M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere**, v.52, p.1189-1197, 2003.
- ZAWOZNIK, M.S.; BENAVIDES, M.P.; TOMARO, M.L. Effect of herbicide diuron on growth and symbiotic behavior of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species. **European Journal of Soil Biology**, Oxford, v.31, n.2, p.183-188, 1995.

3. INFLUÊNCIA DE HERBICIDAS SOBRE O CRESCIMENTO DE *Bradyrhizobium*

INFLUENCE OF THE HERBICIDES ON THE Bradyrhizobium GROWTH

RESUMO

Avaliou-se o impacto de herbicidas sobre o crescimento de três estirpes de *Bradyrhizobium*, utilizadas como inoculantes na cultura da soja no Brasil. As bactérias foram inoculadas em meio de cultura à base de manitol e extrato de levedura. Foram avaliados 18 tratamentos: controle (sem adição de herbicida), glyphosate formulação sal potássico (glyphosate-K), fomesafen, imazethapyr, carfentrazone-ethyl e carfentrazone-ethyl + glyphosate-K, e três estirpes de *Bradyrhizobium*: SEMIA 5079 (*B. japonicum*) e SEMIA 5019 e SEMIA 587 (*B. elkanii*), dispostos em delineamento inteiramente casualizado, num arranjo fatorial 6 x 3, com seis repetições. Os efeitos dos tratamentos no crescimento das estirpes de *Bradyrhizobium* foram avaliados pela leitura da densidade ótica, a 560 nm, em espectrofotômetro. As concentrações dos herbicidas foram: 12,9; 3,6; 1,4; e 1,8 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, de glyphosate-K, fomesafen, imazethapyr e carfentrazone-ethyl. A inibição do crescimento variou desde zero (SEMIA 587, mediante ação de carfentrazone-ethyl) a 53% (SEMIA 5019, sob ação do

fomesafen). Carfentrazone-ethyl foi o herbicida menos tóxico, e imazethapyr e fomesafen os mais tóxicos. As estirpes foram mais sensíveis ao glyphosate-K puro do que em mistura com carfentrazone-ethyl. A ordem crescente de sensibilidade das estirpes aos herbicidas foi a seguinte: SEMIA 587 < SEMIA 5079 < SEMIA 5019, com o glyphosate-K, fomesafen, e carfentrazone-ethyl, puro ou em mistura ao glyphosate e SEMIA 5019 = SEMIA 5079 > SEMIA 587, com o imazethapyr.

Palavras-chave: fixação biológica de N₂, soja transgênica, rizóbio.

3.1 ABSTRACT

This work evaluated herbicides impact on three *Bradyrhizobium* strains: SEMIA 5079 (*B. japonicum*) and SEMIA 5019 and SEMIA 587 (*B. elkanii*), used in soybean crop in Brazil. The strains were inoculated in yeast extract mannitol liquid medium (YEM) and 18 treatments were evaluated: control (without herbicide), glyphosate potassic salt (glyphosate-K), fomesafen, imazethapyr, carfentrazone-ethyl and carfentrazone-ethyl + glyphosate-K, and three *Bradyrhizobium* strains (SEMIA 5019, SEMIA 5079 and SEMIA 587), arranged in a completely randomized design, in a factorial scheme 6 x 3, with six replications. The effects of the treatments on the growth of the *Bradyrhizobium* strains were evaluated by optic density (560 nm) reading in spectrophotometer. The herbicide concentrations were: 12.9, 3.6, 1.4 and 1.8 µg L⁻¹, respectively, for glyphosate-K, fomesafen, imazethapyr and carfentrazone-ethyl. The growth inhibition varied from zero (SEMIA 587 by carfentrazone-ethyl action) to 53% (SEMIA 5019 by fomesafen action). Carfentrazone-ethyl was the less toxic herbicide and imazethapyr and fomesafen the most toxic, for the strains evaluated. The strains were more sensitive to glyphosate-K alone than mixed with carfentrazone-ethyl. The growing order of strain sensibility to the herbicides was the following: SEMIA 587 < SEMIA 5079 < SEMIA 5019, for the glyphosate-K, fomesafen, carfentrazone-ethyl and carfentrazone + glyphosate; and SEMIA 5019 = SEMIA 5079 > SEMIA 587 for the imazethapyr.

Key words: biological fixation of N₂, rhizobium, transgenic soybean.

3.2 INTRODUÇÃO

A utilização de inoculantes à base de bactérias fixadoras de nitrogênio (N_2) (*Bradyrhizobium* spp.), aplicados junto às sementes de soja, é prática usual na condução desta cultura. Esta operação tem apresentado resultados altamente positivos, principalmente em solos onde a cultura ainda não foi cultivada, ou em solos com poucos anos de cultivo de soja (FRANCO & BALIERO, 1999). A fixação de N_2 atmosférico, realizada pela associação soja-rizóbio, pode contribuir com mais de 70% do N total necessário à cultura (MARENCO et al., 1993; THURLOW & HILBOLD, 1985); isso representa, para o Brasil, economia equivalente a mais de 200 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de nitrogênio.

A soja, no Brasil, é a cultura em que mais se aplicam herbicidas: 39,8% de um total de 174 mil toneladas de produtos formulados (SPADOTTO, 2002). Pode-se afirmar que, com exceção dos cultivos orgânicos que visam ao consumo de soja sem o emprego de agroquímicos, praticamente em toda área cultivada com esta cultura aplicam-se herbicidas. A grande aceitação por parte dos produtores de soja ao emprego destes insumos deve-se à alta eficiência no controle das plantas daninhas, ao alto rendimento operacional, aos herbicidas altamente seletivos aos principais cultivares nacionais, e ao menor custo, quando comparado aos outros métodos de controle.

Apesar da grande importância dos herbicidas na cultura da soja, esses compostos podem apresentar efeitos deletérios ao processo de fixação de N pela simbiose soja-bactéria (GONZALEZ et al., 1996; HERNANDEZ et al., 1999; PARAMENSKAYA et al., 1998). Esses efeitos podem ser diretos (prejudicando os rizóbios), indiretos (prejudicando as plantas hospedeiras e/ou estimulando microrganismos antagonistas aos rizóbios), ou em ambos os processos (CARDINA & HARTWIG, 1988; MOORMAN, 1986). Herbicidas que afetam a formação e o crescimento de pêlos radiculares podem prejudicar a infecção das bactérias (GONZALEZ et al., 1996). O declínio induzido pelos herbicidas na nodulação de leguminosas pode ser o resultado de injúrias ao sistema radicular dessas espécies ou dos efeitos tóxicos aos rizóbios antes ou durante o processo de infecção (EBERBACH & DOLGLAS, 1989), todavia, também pode ser devido à redução na atividade da nitrogenase, provocada pelo déficit de suprimentos de

fotoassimilados aos rizóbios, causado por injúrias dos herbicidas às plantas. Os herbicidas também podem prejudicar a nodulação, por inibirem a produção de enzimas celulolíticas e pecnolíticas produzidas pelos rizóbios e essenciais ao processo de penetração nos pêlos radiculares (MAHMOUD & OMAR, 1995). A informação sobre a tolerância e/ou sensibilidade a herbicidas deve ser considerada na seleção e produção de inoculantes comerciais, para melhor rendimento destes no processo de simbiose (KISHINEVSKY et al., 1988).

O objetivo deste trabalho foi avaliar, em laboratório, os efeitos diretos de diversos herbicidas, freqüentemente empregados na cultura da soja, sobre o crescimento de três das principais estirpes de *Bradyrhizobium* utilizadas para inoculação comercial de sementes de soja no Brasil.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Associações Biológicas/BIOAGRO, pertencente ao Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, onde foram avaliados 18 tratamentos: controle (sem adição de herbicida), glyphosate potássico (glyphosate-K), fomesafen, imazethapyr, carfentrazone-ethyl e carfentrazone-ethyl + glyphosate-K, e três estirpes de *Bradyrhizobium*: *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019) e de *B. japonicum* (SEMIA 5079), dispostos em delineamento inteiramente casualizado, num arranjo fatorial 6 x 3, com seis repetições.

As soluções-estoque dos herbicidas glyphosate potássico (K), fomesafen, imazethapyr, carfentrazone-ethyl e carfentrazone-ethyl + glyphosate-K foram preparadas pela mistura das formulações comerciais com água destilada e deionizada, sendo posteriormente esterilizadas por filtração (filtro Milipore[®], 0,25 µm) em condições assépticas.

As estirpes de *Bradyrhizobium* foram obtidas da Coleção de Bactérias Diazotróficas do Centro Nacional de Pesquisa da EMBRAPA/Agrobiologia, sendo as culturas estocadas em meio YEM composto, em g L⁻¹, por: Manitol, 10; K₂HPO₄, 0,05; MgSO₄, 0,02; NaCl, 0,01; extrato de levedura, 0,5; ágar, 15 e com pH ajustado em 6,8., à temperatura de 4 °C. A ativação destas culturas foi realizada segundo método descrito

pela EMBRAPA (1994), sendo realizada, posteriormente, sua multiplicação em Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio YEM líquido, incubados em agitador rotatório a 150 rpm e temperatura de 25 °C, até atingir densidade ótica (DO a 560 nm), equivalente a 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL.

O efeito do herbicida no crescimento das estirpes de *Bradyrhizobium* foi avaliado mediante leitura da DO em espectrofotômetro (Titertek Multiskan Plus MKII), a 560 nm, em intervalos de quatro em quatro horas, até completarem 24 horas e, após, de 12 em 12 horas, até a paralisação do crescimento. Para isso, foram utilizadas placas de ELISA com 96 células de 300 μ L de capacidade volumétrica, onde foram adicionados 180 μ L de meio YEM líquido estéril (1,33 vez concentrado), 60 μ L da solução-estoque estéril dos herbicidas e 15 μ L das culturas ativadas, totalizando 255 μ L de solução. Em seguida, as placas foram incubadas no escuro, em incubadoras a 25°C, de onde foram retiradas somente para as leituras de DO e imediatamente recolocadas neste local, até o final das leituras. As concentrações dos herbicidas foram: 12,9; 3,6; 1,4; e 1,8 μ g L⁻¹ (correspondentes a, aproximadamente a dose comercial de cada produto: 1,50; 0,25; 0,10; e 0,12 kg ha⁻¹ do produto técnico), respectivamente, de glyphosate-K, fomesafen, imazethapyr e carfentrazone-ethyl. A transformação DO x unidades formadoras de colônia (UFC), foi obtida por meio da contagem em placas, precedida pela diluição seriada da suspensão de DO conhecida. Para interpretação dos resultados foram confeccionadas curvas de crescimento a partir do log (UFC) e, os dados obtidos após 134 horas de incubação, foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada resposta diferenciada no crescimento das estirpes sob efeito dos herbicidas avaliados (Figuras 2 e Tabela 2). Observou-se efeito tóxico dos herbicidas sobre a estirpe SEMIA 5019 a partir de 20 horas da inoculação (Figura 2). Foi possível distinguir níveis de toxidez entre os tratamentos, sendo carfentrazone-ethyl o herbicida que causou menor toxicidade a esta estirpe (Figura 2). Sob influência do glyphosate-K, esta estirpe mostrou-se menos tolerante do que quando submetida à mistura glyphosate-

K + carfentrazone-ethyl (Figura 2). Para essa estirpe houve redução no crescimento variando de 16,5% (carfentrazone-ethyl) até 52,8% (fomesafen), 134 horas após a inoculação (Figura 2 e Tabela 2). A possível causa da alta toxicidade do fomesafen a esse rizóbio pode ser atribuída ao seu mecanismo de ação, o qual é inibidor da enzima protoporfirinogênio oxidase (protox), fazendo com que haja acúmulo de protoporfirina IX em células tratadas com este herbicida, ocasionando a interação com o oxigênio e a luz para formas reativas de O_2 , promovendo a formação de superóxidos a peróxido de hidrogênio e, conseqüentemente iniciar o processo de peroxidação dos lipídios via radical hidroxil e morte celular. O fato de as placas terem sido incubadas no escuro não impediu a ação do fomesafen; isto porque, em grande parte do período de incubação, durante o tempo de cada leitura, as placas recebiam em torno de 20 minutos de iluminação artificial, totalizando, aproximadamente, 5 horas e 20 minutos, suficiente para a ação tóxica do produto. Outra possível causa para esse efeito pode ser atribuída à toxicidade de um ou mais ingredientes na formulação comercial do produto. Todavia, pode ter havido interação entre esses dois fatores. WILKINSON & LUCAS (1969) observaram que a formulação comercial do paraquat aumentava seu efeito tóxico contra fungos, quando comparado ao ingrediente ativo puro.

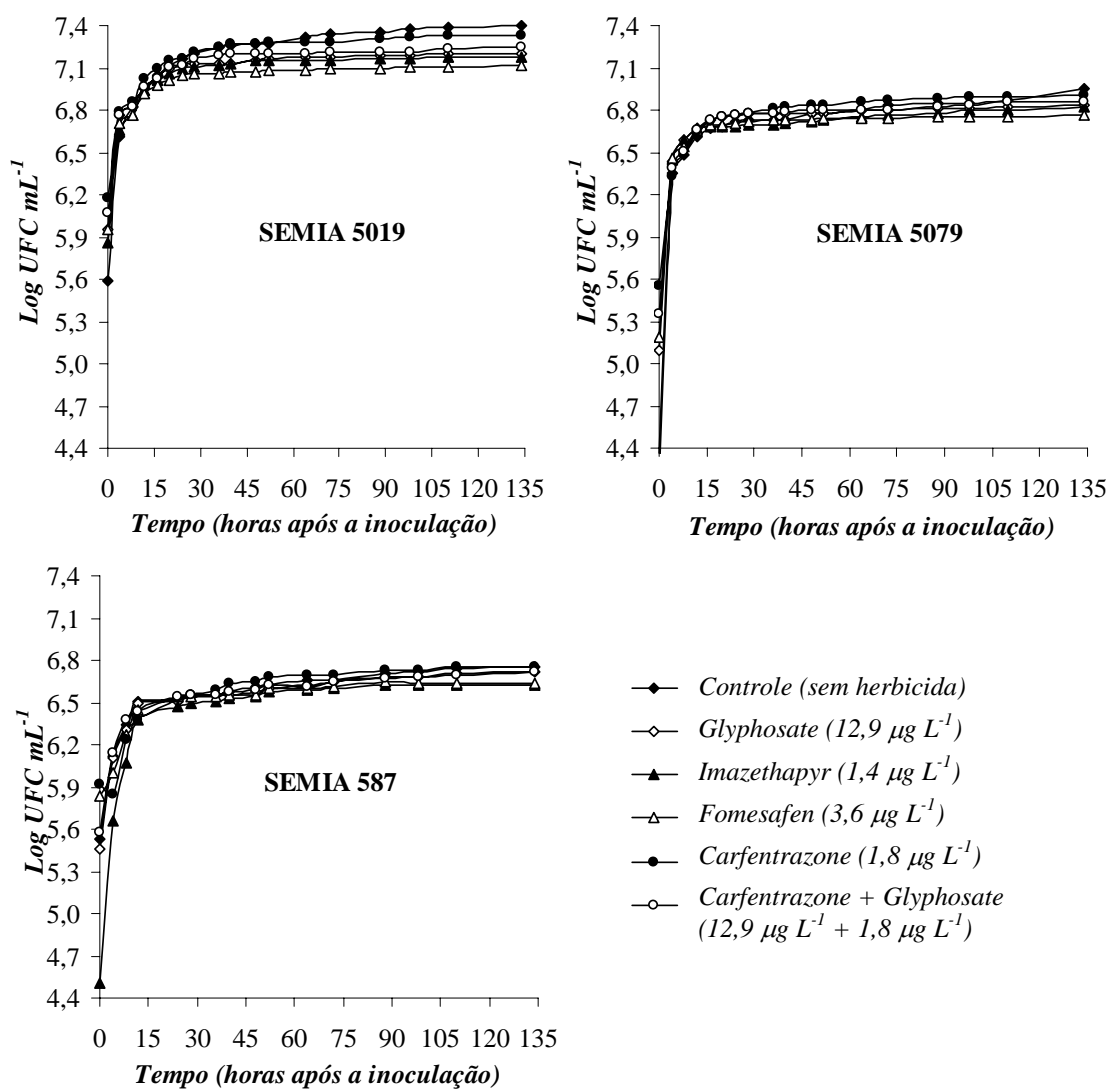


Figura 2. Crescimento das estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 587, medido pelo logaritmo do número de unidades formadoras de colônia (UFC), ao longo do período de incubação em meio contendo diferentes herbicidas.

Observa-se na curva de crescimento de SEMIA 5079, com os tratamentos carfentrazone-ethyl, glyphosate-K e a mistura destes, reduções na ordem de 11,2; 27,0 e 19,9 %, respectivamente (Figura 2). Quando se compara o efeito dos herbicidas em aplicação isolada sobre a estirpe SEMIA 5079 ao final do período de incubação, verifica-se que os tratamentos imazethapyr e fomesafen causaram a maior toxicidade, com redução no crescimento dessa estirpe de 38,3 e 37,1%, respectivamente (Figura 2 e

Tabela 2). Ao longo do período de avaliação, o fomesafen e o imazethapyr provocaram padrão semelhante de crescimento para SEMIA 5079 (Figura 2 e Tabela 2).

A estirpe SEMIA 587 mostrou-se menos sensível aos tratamentos herbicida ao longo do período de avaliação. Nos tratamentos carfentrazone-ethyl, glyphosate-K e, a mistura destes, o padrão de crescimento de SEMIA 587 foi semelhante ao controle (Figura 2). Na presença dos herbicidas imazethapyr e fomesafen, esta estirpe apresentou padrões de crescimento semelhantes, todavia, menores que o controle. A redução no crescimento de SEMIA 587, na presença do imazethapyr e do fomesafen, foi, respectivamente, de 17,5 e 15,8 % ao final do período de avaliação (Figura 2 e Tabela 2).

Tabela 2. Crescimento relativo (%) de três estirpes de *Bradyrhizobium* após 134 horas de incubação em meio de cultura contendo diferentes herbicidas.

<i>Tratamentos</i>	<i>SEMIA 5019</i>	<i>SEMIA 5079</i>	<i>SEMIA 587</i>
	-----Crescimento relativo (%)-----		
<i>Controle</i>	100,0 a A	100,0 aA	100,0 aA
<i>Glyphosate-K</i>	56,3 d C	73,0 d B	90,5 b A
<i>Imazethapyr</i>	58,4 d B	61,7 e B	82,5 c A
<i>Fomesafen</i>	47,2 e C	62,9 e B	84,2 c A
<i>Carfentrazone</i>	83,5 b C	88,8 b B	100,9 a A
<i>Glyphosate + carfentrazone</i>	69,7 c C	80,1 c B	91,9 b A

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Esta sensibilidade diferencial entre as estirpes pode estar relacionada a características particulares de absorção do produto por cada uma delas. HAAHTELA et al. (1988) testaram o glyphosate (sal de isopropilamina) puro e na formulação comercial Roundup, com concentrações variando entre 25 e 100 mg L⁻¹, sobre bactérias do gênero *Enterobacter* e observaram redução no crescimento, todavia, com maior toxicidade para a formulação comercial na maior concentração. Em trabalho verificando os efeitos do glyphosate sobre duas estirpes de *B. japonicum*, observou-se que, aos quatro dias após

inoculação, em meio contendo 1mM deste herbicida, a estirpe USDA 110 teve 47% de inibição contra 19% da estirpe USDA 138 (MOORMAN et al., 1992). Ao mesmo tempo, verificou-se que o acúmulo de ácido shiquímico foi 37,5% maior na estirpe USDA 110, comparada à USDA 138 (MOORMAN et al., 1992).

Carfentrazone-ethyl, além de ter proporcionado menor inibição no crescimento em todas as estirpes, reduziu a toxicidade do glyphosate quando em mistura. Os tratamentos que se mostraram mais tóxicos foram fomesafen e imazethapyr.

A causa da toxicidade do imazethapyr sobre estirpes de *B. japonicum* pode estar ligada ao efeito de inibição do herbicida sobre a enzima acetohidroxiato sintase (AHAS), bloqueando, assim, a síntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina e proporcionando menor produção de proteínas (ARRUDA et al., 2001). Em outro trabalho (GONZALEZ et al., 1996), o *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* mostrou-se tolerante ao imazethapyr. Todavia, há relatos de trabalhos com herbicidas inibidores da enzima AHAS em diferentes doses, sendo observado que eles afetaram as estirpes de *Bradyrhizobium* (ARRUDA et al., 2001). A diferença na suscetibilidade de estirpes a herbicidas foi também observada por ORTIZ et al. (1989), os quais concluíram que a estirpe de *B. elkanii* SEMIA 587 foi mais sensível ao trifluralin que a SEMIA 5019.

3.5 CONCLUSÕES

- 1) Há sensibilidade diferencial das estirpes de rizóbio aos herbicidas testados, sendo SEMIA 5019 a mais sensível.
- 2) O efeito tóxico do glyphosate potássico sobre as estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 5019 e SEMIA 5079 é diminuído quando em mistura ao carfentrazone-ethyl.
- 3) Imazethapyr e fomesafen foram os herbicidas mais tóxicos às estirpes avaliadas.

3.6 LITERATURA CITADA

- ARRUDA, J.S.; LOPES, N.F.; MOURA, A.B. Behavior of *Bradyrhizobium japonicum* strains under different herbicide concentrations. **Planta Daninha**, Viçosa, v.19, n.1, p.111-118, 2001.
- CARDINA, J.; HARTWIG, N.L. Atrazine, bifenox and shade effects on crownvetch (*Coronilla varia*) nodulation and nodule activity. **Weed Sci.**, Champaign, v.36, n.1, p.535-539, 1988.
- EBERBACH, P.L.; DOUGLAS, L.A. Herbicide effects on the growth and nodulation potencial of *Rhizobium trifolii* with *Trifolium subterraneum*. **Plant and Soil**, Dordrecht v.119, n.1, p.15-23, 1989.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. **Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola**. Brasília, 1994. 542p.
- FRANCO, A.A.; BALIERO, F.C. Fixação biológica de nitrogênio: uma alternativa aos fertilizantes nitrogenados. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G., eds. Inter-relações fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. Lavras, 1999. p.577-596.
- GONZALEZ, A.; GONZALEZ-MURUA, C.; ROYUELA, M. Influence of imazethapyr on *Rhizobium* growth and its symbiosis with pea (*Pisum sativum*). **Weed Sci.**, Champaign, v.44, n.1, p.31-37, 1996.
- HAAHTELA, K.; KILPI, S.; KARI, K. Effects of phenoxy acid herbicides and glyphosate on nitrogenase activity (acetylene reduction) in root-associated *Azospirillum*, *Enterobacter* and *Klebsiella*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam v.53, n.1, p.123-127, 1988.
- HERNANDEZ, A.; GARCIA-PLAZAOLA, J.I.; BACERRIL, J.M. Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.). **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.47, n.7, p. 2920-2925, 1999.
- KISHINEVSKY, B.; LOBEL, R.; LIFSHITZ, N.; GURFEL, D. Effects of some commercial herbicides on rhizobium and their symbiosis with peanuts. **Weed Research**, v.28, n.1, p.291-296, 1988.

MAHMOUD, A.L.E.; OMAR, S.A. Growth, cell wall-degrading enzymes and aflatoxin production by lemon-rotting fungi in relation to insecticide application. **Microbiological Resistance**, v.150, n.1, p.195-200, 1995.

MARENCO, R.A.; LOPES, N.F.; MOSQUIM, P.R. Nodulation and nitrogen fixation in soybeans treated with herbicides. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, Campinas, v.5, n.2, p.121-126, 1993.

MOORMAN, T.B. Effects of herbicides on the survival of *Rhizobium japonicum* strains. **Weed Sci.**, Champaign, v.34, n.4, p.628-633, 1986.

MOORMAN, T.B.; BECERRIL, J.M.; LYDON, J.; DUKE, S.O. Production of Hydroxybenzoic Acids by *Bradyrhizobium japonicum* Strains after Treatment with Glyphosate. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.40, n.2, p.289-293, 1992.

ORTIZ, S.; MUSUMECI, M.R.; TSAI, S.M. Efeito de alguns agrotóxicos na sobrevivência e na atividade respiratória de *Rhizobium leguminosarum* e *Bradyrhizobium japonicum*. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.24, n.6, p.663-667, 1989.

PARAMENSKAYA, L.N.; CHERNOVA, T.A.; KROGLOV, Y.V. The problem of increasing the herbicide resistance of legume-rhizobial symbiosis. **Microbiology**, v.67, n. p.351-355, 1998.

SPADOTTO, C.A. Monitoração e avaliação de impactos de herbicidas no ambiente. In: Congresso Brasileiro de Ciência das Plantas Daninhas, 23, 2002, Gramado, RS. **Palestras...**, Gramado, RS, SBCPD, 2002, p.128.

THURLOW, D.L.; HILBOLD, A.E. Dinitrogen fixation by soybeans in Alabama. **Agronomy Journal**, v.77, n. p.432-436, 1985.

WILKINSON, V.; LUCAS, R.L. Effects of constituents of Gramoxone W on rates of respiration of soil fungi. **Weed Research**, v.2, n. p.288-289, 1969.

4. EFEITOS DE FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE GLYPHOSATE SOBRE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium*

*EFFECTS OF COMMERCIAL FORMULATIONS OF GLYPHOSATE ON *Bradyrhizobium* STRAINS*

RESUMO

Avaliou-se o crescimento das estirpes de *B. japonicum* SEMIA 5079 e de *B. elkanii* SEMIA 5019 e SEMIA 587 sob efeito de nove tratamentos: Zapp Qi[®], Roundup Original[®], Roundup Multiação[®], Roundup Transorb[®], Roundup WG[®], Trop[®], Agrisato[®] e glyphosate técnico [padrão de N-(phosphonomethyl) glycina] além do controle sem adição de herbicida (testemunha para as estirpes). As formulações foram aplicadas contendo 43,2 µg L⁻¹ do equivalente ácido e as bactérias inoculadas em meio de cultura à base de manitol e extrato de levedura (YEM). Pelos resultados foi possível observar que todas as formulações de glyphosate causaram toxidez às estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 587. Constatou-se que a formulação Zapp Qi foi a menos tóxica às estirpes de *Bradyrhizobium* avaliadas. A maior toxicidade foi observada para Roundup Transorb que provocou reduções no

crescimento acima de 94% para todas as estirpes de *Bradyrhizobium* estudadas. Não se observou relação entre o tipo de sal, isopropilamina, amônio ou potássico, presentes na formulação herbicida, com o grau de inibição no crescimento das estirpes. SEMIA 587 foi a estirpe menos tolerante à maioria das formulações testadas, porém, SEMIA 5019 foi a mais sensível ao glyphosate padrão, sem adição de sais ou de outros aditivos.

Palavras-chave: Fixação biológica de N₂, herbicida, rizóbio, soja transgênica.

4.1 ABSTRACT

This work aimed to evaluate the *Bradyrhizobium japonicum*: SEMIA 5079, two *Bradyrhizobium elkanii*: SEMIA 5019 and SEMIA 587 strains growth, under the effect of nine treatments: Zapp QI[®], Roundup Original[®], Roundup Multiação[®], Roundup Transorb[®], Roundup WG[®], Trop[®], Agrisato[®], technical glyphosate [N-(phosphonomethyl) glycine] and control without herbicide addition (as control treatment to strains). The formulations were applied in the concentration of 43.2 µg L⁻¹ of the equivalent acid. The strains were inoculated in yeast extract manitol (YEM). It could be observed that different glyphosate formulations: Zapp Qi, Roundup, Roundup Multiação, Roundup transorb, Roundup WG, Trop and Agrisato caused toxicity on the strains in all *Bradyrhizobium* strains tested. It was verified that the Zapp Qi formulation was the least toxicity to strains. The highest toxicity was observed for Roundup Transorb, which reduced growth over 94% for all the strains appraised, presenting a bactericide effect. Correlation was not observed among the type of salt, isopropylamine, ammonium or potassic, presents in the formulation herbicides, and the toxicity degree to the strains. SEMIA 587 was the least tolerant strain to most formulations; however, SEMIA 5019 was the most sensitive to the control treatment N- (phosphonomethyl) glycine, without salts or other additives.

Key words: Biological fixation of N₂, herbicide, rhizobium, transgenic soybean.

4.2 INTRODUÇÃO

O glyphosate é o produto de maior participação no mercado mundial de herbicidas, e caracteriza-se pelo amplo espectro de ação e não seletividade às plantas daninhas. Existem, atualmente, mais de 90 marcas comerciais com esse ingrediente ativo no mundo (HEAP, 1997). Apesar de não seletivo para a soja, esse herbicida está sendo utilizado diretamente nesta cultura, graças à introdução de cultivares resistentes ao glyphosate. Por inibir a síntese da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs), a molécula de glyphosate bloqueia a síntese de aminoácidos aromáticos. Entretanto, cultivares de soja, resistentes a esse herbicida, possuem a capacidade de produzir os aminoácidos aromáticos, mesmo na presença do glyphosate.

Um fator altamente positivo na produtividade da soja, no Brasil, é a simbiose que esta cultura realiza com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, todavia, estas bactérias fixadoras de N₂ quando associadas ao sistema radicular da soja, não apresentam a mesma insensibilidade enzimática ao glyphosate, podendo este herbicida interferir na interação simbiótica. Segundo GONZALEZ et al. (1996), o risco de intoxicação de herbicidas sobre os microrganismos é maior quando os produtos inibem processos bioquímicos comuns entre as plantas e os microrganismos.

Em outros países, foi constatado que o glyphosate provocou intoxicação em estirpes de rizóbios ou prejudicou a nodulação de leguminosas inclusive da soja (MALLIK & TESFAI, 1985; SCHULS et al., 1985; EBERBACH & DOUGLAS, 1989; MOORMAN et al., 1992; HAUGLAND, 1994; HERNANDEZ et al., 1999; KING et al., 2001). Entretanto, em razão da grande variabilidade nas respostas de estirpes de rizóbio à presença de herbicidas (KAPUSTA & ROUWENHORST, 1973; ALAGAVADI & REDDY, 1986; KISHINEVSKY et al., 1988), é importante avaliar a natureza e a intensidade de resposta das principais estirpes utilizadas no Brasil.

Segundo MALKONES (2000), os aditivos presentes na formulação dos agroquímicos, podem afetar os microrganismos, e em certos casos até modificar o efeito dos agroquímicos, todavia poucos trabalhos foram realizados sobre o assunto. BERNER et al. (1991) mencionaram que aplicações de glyphosate, em formulações com ou sem surfatante, inibiram o crescimento micelial de *Calonectria crotalariae*.

Objetivou-se neste trabalho avaliar a toxicidade das principais formulações de glyphosate comercializadas no Brasil sobre três estirpes comerciais do gênero *Bradyrhizobium*.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Associações Biológicas (FBN)/BIOAGRO, pertencente ao Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.

As soluções-estoque das formulações de glyphosate foram preparadas mediante a mistura do produto comercial com água destilada e deionizada, sendo posteriormente esterilizadas por filtração (filtro Milipore® 0,25 µm) em condições assépticas.

As estirpes de *Bradyrhizobium* foram obtidas da Coleção de Bactérias Diazotróficas do Centro Nacional de Pesquisa da EMBRAPA/Agrobiologia, sendo as culturas estocadas em meio YEM, composto, em g L⁻¹, por: Manitol, 10; K₂HPO₄, 0,05; MgSO₄, 0,02; NaCl, 0,01; extrato de levedura, 0,5; ágar, 15 e com pH ajustado em 6,8., à temperatura de 4 °C. A ativação destas culturas foi realizada segundo método descrito pela EMBRAPA (1994), sendo realizada, posteriormente, sua multiplicação em Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio YEM líquido, incubados em agitador rotatório a 150 rpm e temperatura de 25 °C, até atingir densidade ótica (DO a 560 nm), equivalente a 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC) por mL. Uma alíquota de 15 µL das estirpes ativadas foi inoculada em placas de ELISA de 96 células com capacidade volumétrica de 300 µL, contendo a mistura estéril de 180 µL de meio YEM líquido (1,33 vez concentrado) e 60 µL da solução do herbicida, para cada tratamento, sendo imediatamente colocadas em câmara de incubação a 25 °C e no escuro. O crescimento das estirpes foi avaliado pela leitura da densidade ótica a 560 nm em espectrofotômetro (Titertek Multiskan Plus MKII, New York, USA), em intervalos de 4 horas nas primeiras 24 horas e após em intervalos de 12 horas até a estabilização do crescimento. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x9, totalizando 27 tratamentos, sendo estes a combinação de duas estirpes de *B. elkanii* SEMIA 587 e SEMIA 5019, uma de *B. japonicum* SEMIA 5079, e

de nove formulações de glyphosate: Zapp Qi, Roundup, Roundup Multiação, Roundup transorb, Roundup WG, Trop, Agrisato, PMG [padrão N-(phosphonomethyl) glycina com 99% de pureza] e o controle sem adição de herbicida, com seis repetições. Todas as formulações foram aplicadas contendo $43,2 \mu\text{g L}^{-1}$ de glyphosate, correspondente a $4,32 \text{ kg ha}^{-1}$ deste herbicida, considerando área por área. A transformação DO x unidades formadoras de colônia (UFC), foi obtida por meio da contagem em placas, precedida pela diluição seriada da suspensão de DO conhecida. Para interpretação dos resultados foram confeccionadas curvas de crescimento a partir do log (UFC) e, os dados obtidos após 122 horas de incubação, foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Formulações, fabricante e composição dos produtos comerciais de glyphosate utilizados.

Formulações comerciais[®]	Fabricante	Composição	Formulação (expressa em equivalente ácido)
<i>Agrisato</i>	Alkagro	Sal de isopropilamina	CS (360 g L^{-1})
<i>Roundup Original</i>	Monsanto	Sal de isopropilamina	CS (360 g L^{-1})
<i>Roundup Multiação</i>	Monsanto	Sal de amônio	GRDA (720 g kg^{-1})
<i>Roundup transorb</i>	Monsanto	Sal de isopropilamina	CS (480 g L^{-1})
<i>Roundup WG</i>	Monsanto	Sal de amônio	GRDA (720 g kg^{-1})
<i>Trop</i>	Milênia	Sal de isopropilamina	CS (360 g L^{-1})
<i>Zapp Qi</i>	Syngenta	Sal potássico	CS (500 g L^{-1})

[®]Marca registrada do fabricante; CS: Concentrado solúvel; GRDA: Grânulos dispersíveis em água (dry floable);

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tanto as sete marcas comerciais como o glyphosate puro afetaram o desenvolvimento das estirpes, todavia, observou-se diferença no grau de inibição do crescimento (Figuras 3 e Tabela 4).

A estirpe SEMIA 5019 foi a mais sensível à molécula pura do glyphosate (*PMG*) (Figura 3 e Tabela 4). Para esta estirpe, as inibições máximas de crescimento medidas pelo aumento do logaritmo da unidade formadoras de colônia (UFC), observado entre os tratamentos, variaram desde 25,9%, para Zapp Qi[®] até 97,8%, para Roundup Transorb[®] (Tabela 4). A formulação Zapp Qi[®] (mais tolerada por esta estirpe) foi menos tóxica do que o padrão N-(phosphonomethyl) glycina (*PMG*) utilizado como controle para os herbicidas. (Figura 3 e Tabela 4). As formulações Roundup Original[®], Trop[®], Agrisato[®] e Roundup Multiação[®] foram semelhantes quanto à toxicidade a esta estirpe, proporcionando, em média, inibição do crescimento de 55,8%, em relação ao controle (Figura 3 e Tabela 4). A formulação Roundup WG[®] reduziu o crescimento desta estirpe em 65,1% comparado ao controle sem adição de herbicida. Roundup Transorb[®] afetou drasticamente esta estirpe, apresentando inibição do crescimento em todo período de incubação (Figura 3 e Tabela 4). A alta toxidez de formulações Roundup sobre estirpes de *Bradyrhizobium* também foi observada por TSUI & CHU (2003), os quais verificaram que surfatantes presentes na formulação apresentavam maior toxidez às estirpes do que o glyphosate puro.

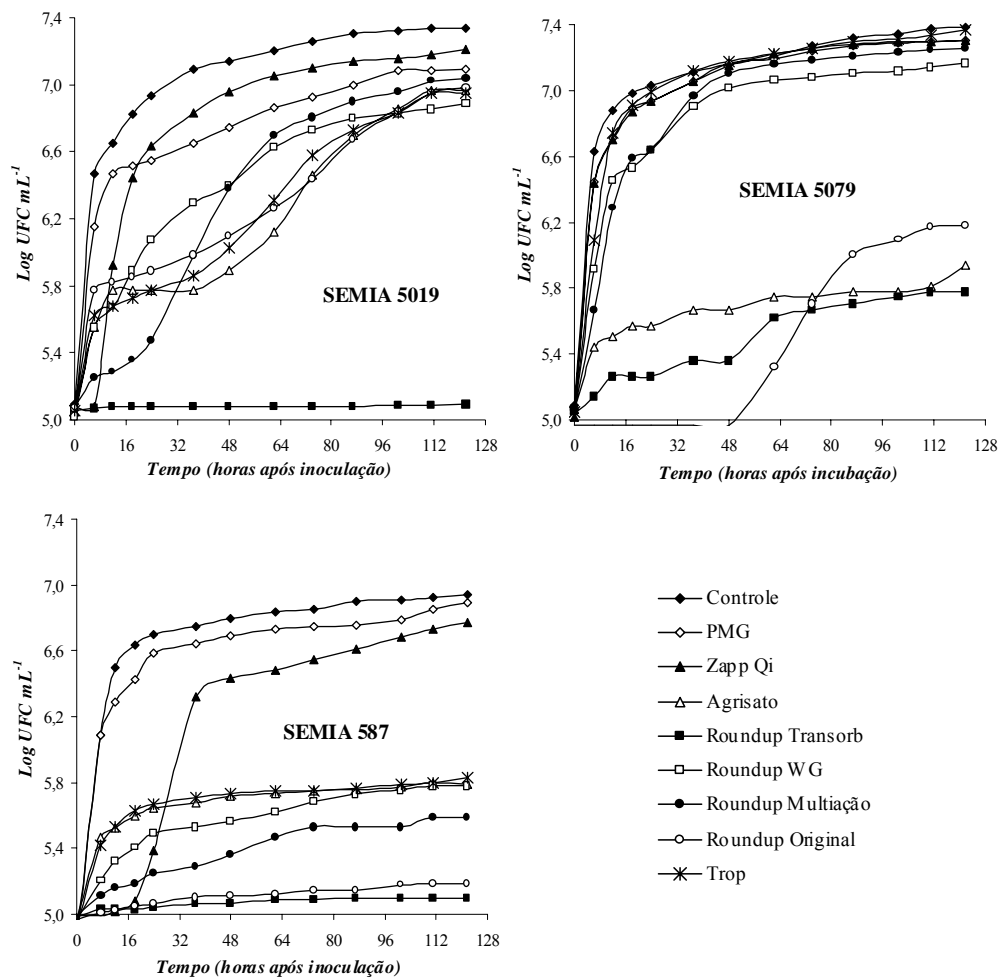


Figura 3. Efeito de diferentes formulações de glyphosate ($43,2 \mu\text{g L}^{-1}$ de e.a.) sobre o logaritmo do número de unidades formadoras de colônia (UFC) das estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 587.

Tabela 4. Efeito de diferentes formulações de glyphosate (43,2 µg L⁻¹) sobre o crescimento de estirpes de *Bradyrhizobium*, medido por meio do crescimento relativo, 122 horas após inoculação.

Tratamentos	Crescimento relativo (%)		
	SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 587
Controle	100,0 a A	100,0 a A	100,0 a A
Trop[®]	40,7 de B	96,3 ab A	7,7 c C
Roundup Original[®]	43,8 de A	6,1 d B	1,8 c B
Agrisato[®]	42,2 de A	3,6 d B	7,1 c B
Roundup Transorb[®]	2,2 f A	0,8 d A	1,4 c A
Roundup WG[®]	34,9 e B	59,7 c A	7,0 c C
Roundup Multiação[®]	49,9 cd B	73,5 b A	4,5 c C
Zapp Qi[®]	74,1 b AB	77,2 b A	67,4 b B
PMG	56,5 c B	83,4 b A	89,1 a A

Médias seguidas de letras iguais, maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A estirpe SEMIA 5079 apresentou, quando submetida à formulação Trop[®], crescimento similar ao controle (Figura 3 e Tabela 4). As formulações Zapp Qi[®] e Roundup Multiação[®] inibiram o crescimento desta estirpe em 22,8% e 26,5%, respectivamente, em relação ao controle sem adição de herbicida, todavia, 122 horas após a inoculação, esses valores não diferiram do observado para o controle herbicida PMG (16,6% de inibição) (Tabela 4). Conforme pode ser observado na Figura 3, esta estirpe se mostrou altamente sensível às formulações Roundup Original[®], Agrisato[®] e Roundup Transorb[®], visto as mesmas terem reduzido o crescimento ao longo do período de incubação, chegando a mais de 90% após 122 horas da inoculação. Pode-se afirmar que esta estirpe sob efeito de tais herbicidas, não se desenvolve *in vitro*. Novamente Roundup Transorb[®] foi a formulação mais tóxica sendo observado inibição no crescimento acima de 99%, em relação ao controle (Tabela 4), contudo, não diferiu das formulações Roundup Original[®] e Agrisato[®] (Figura 3 e Tabela 4). Observando-se o comportamento da estirpe SEMIA 5079 (Figura 3) ao longo do tempo de avaliação, sob

efeito da formulação Roundup Original[®], nota-se efeito bacteriostático até 48 horas da inoculação sendo observado pequeno crescimento a partir desse tempo (Figura 3).

SEMIA 587 foi, de maneira geral, a estirpe mais sensível às formulações do glyphosate testadas, visto que, entre as mesmas, seis impossibilitaram seu crescimento (Figura 3). Mesmo com o decréscimo no valor máximo de UFC, foi possível observar que além do tratamento controle (sem adição de herbicida), a estirpe apresentou crescimento relativo maior que 60% somente nas formulações Zapp Qi[®] e PMG (controle herbicida) (Figura 3 e Tabela 4). O controle PMG, após 122 horas de incubação não apresentou diferença quando comparado ao controle sem herbicida, enquanto que neste mesmo período, a formulação Zapp Qi[®] inibiu em 32,6% o crescimento (Tabela 4). Acompanhando a curva de crescimento para essa estirpe (Figura 3), é possível constatar que as formulações Trop[®], Agrisato[®], Roundup transorb[®], Roundup WG[®], Roundup Multiação[®] e Roundup Original[®] reduziram de forma drástica seu crescimento a partir de 10 horas da inoculação. A formulação Zapp Qi[®] apresentou-se como bacteriostático até 20 horas após inoculação; entretanto, após esse período possibilitou a maior taxa de crescimento, entre os produtos comerciais testados (Figura 3). As formulações Roundup Original[®] e Roundup Transorb[®], não permitiram o crescimento de SEMIA 587 durante todo o período de avaliação (Figura 3 e Tabela 4).

HAAHTELA et al. (1988) testaram o glyphosate puro e na formulação comercial Roundup[®], sobre vários microrganismos e observaram que as concentrações entre 25 e 100 µg L⁻¹, afetaram o crescimento de bactérias do gênero *Enterobacter*, todavia com maior intoxicação quando tratadas com a formulação comercial na maior concentração.

Em relação aos sais que integram as formulações estudadas, pouca inferência se pode fazer na discussão dos resultados. O sal de isopropilamina compõe as formulações Agrisato[®], Roundup Original[®], Roundup Transorb[®] e Trop[®] (Tabela 3) os quais apresentaram diferentes graus de intoxicação nas estirpes e entre elas. O sal de amônio presente na composição de Roundup WG[®] e Roundup Multiação[®] (Tabela 3) não conferiu a estes o mesmo grau de intoxicação para as três estirpes. Todavia, pode-se destacar que Zapp Qi[®], único que se apresenta com o sal potássico (Tabela 3), foi a

formulação que se manteve menos tóxica a todas as estirpes, sendo, para SEMIA 587, o único tratamento que se apresentou com ação não bactericida (Figura 3 e Tabela 4).

Com base no padrão de crescimento e comparação das médias às 122 horas após inoculação pode-se estabelecer a seguinte ordem crescente de intoxicação pelos herbicidas às estirpes: Zapp Qi[®] < PMG < Roundup Multiação[®] = Roundup Original[®] = Agrisato[®] = Trop[®] = Roundup WG[®] < Roundup Transorb[®], para SEMIA 5019; Trop[®] < PMG = Zapp Qi[®] = Roundup Multiação[®] < Roundup WG[®] < Roundup Original[®] = Agrisato[®] = Roundup Transorb[®], para SEMIA 5079 e PMG < Zapp Qi[®] < Trop[®] < Roundup Original[®] = Agrisato[®] = Roundup WG[®] = Roundup Transorb[®], para SEMIA 587.

Entre as estirpes a ordem crescente de sensibilidade aos herbicidas foi a seguinte: SEMIA 5079 < SEMIA 5019 < SEMIA 587, para as formulações Trop[®], Roundup WG[®] e Roundup Multiação[®]; SEMIA 5019 < SEMIA 5079 = SEMIA 5019, para Agrisato[®] e Roundup Original[®]; SEMIA 5079 = SEMIA 587 < SEMIA 5019, para o controle herbicida PMG e SEMIA 5079 < SEMIA 587, todavia, sem diferirem de SEMIA 5019 para Zapp Qi[®]. A formulação Roundup Transorb[®] causou elevado grau de intoxicação entre todas as estirpes.

A maior sensibilidade da estirpe SEMIA 587, em relação a SEMIA 5019, também foi verificada por ORTIZ et al. (1989), quando crescidas em meio contendo trifluralin. ARRUDA et al. (2001), trabalhando com herbicidas inibidores da enzima AHAS, em diferentes concentrações, observaram que eles afetaram drasticamente as estirpes de *B. japonicum* testadas, sendo estabelecidas diferentes ordens de tolerância para cada herbicida.

A redução do crescimento das estirpes de *Bradyrhizobium* na presença do equivalente ácido e das formulações comerciais de glyphosate provavelmente se deve a inibição da atividade da enzima EPSP sintase e a conseqüente redução da síntese de aminoácidos aromáticos nas células bacterianas. MOORMAN (1986) não observou redução do crescimento do *B. japonicum* na presença de glyphosate quando aminoácidos aromáticos foram adicionados ao meio de cultura. É provável que os efeitos específicos das formulações comerciais de glyphosate no crescimento das estirpes sejam devido à presença de diferentes substâncias químicas na formulação do herbicida, como solventes, surfatantes e agentes molhantes, que podem modificar o

efeito do equivalente ácido do herbicida nos organismos (KISHINEVSKY et al., 1988; MALKONES, 2000).

4.5 CONCLUSÕES

- 1) Entre as estirpes, SEMIA 5019 foi a mais tolerante aos produtos comerciais testados, não apresentando crescimento somente na presença de Roundup Transorb[®].
- 2) SEMIA 587 foi a estirpe mais sensível aos produtos testados, entretanto, a mais tolerante ao glyphosate puro (PMG).
- 3) O sal de isopropilamina ou o de amônio, presente nas formulações comerciais, não está diretamente relacionado com o grau de toxidez às estirpes de *Bradyrhizobium*.
- 4) De maneira geral, Zappi Qi[®] e Roundup Transorb[®] foram, respectivamente, as formulações que apresentaram a menor e maior toxidez às estirpes de *Bradyrhizobium*.

4.6 LITERATURA CITADA

- ALAGAVADI, A.R.; REDDY, T.K.R. Effect of trifluralin on *Rhizobium* and its nodulation on groundnut. **Pesticides**, v.20, n.1, p.27-30, 1986.
- ARRUDA, J.S.; LOPES, N.F.; MOURA, A.B. Behavior of *Bradyrhizobium japonicum* strains under different herbicide concentrations. **Planta Daninha**, Viçosa, v.19, n.1, p.111-117, 2001.
- BERNER, D.K.; BERGGREN, G.T.; SNOW, J.P. Effects of glyphosate on *Calonectia crotalariae* and red crown rot of soybean. **P. Disease**, v.75, n.8, p.809-813, 1991.
- DELANAY, X.. Yield evaluation of a glyphosate-tolerant soybean line after treatment with glyphosate. **Crop Science**, v.35, n.5, p.1461-1467, 1995.
- EBERBACH, P.L.; DOUGLAS, L.A. Herbicide effects on the growth and nodulation potencial of *Rhizobium trifolii* with *Trifolium subterraneum*. **Plant Soil**, v.119, n.1, p.15-23, 1989.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. **Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola**. 1 ed. Brasília, 1994, 542p.

GONZALEZ, A.; GONZALEZ-MURUA, C.; ROYUELA, M. Influence of imazethapyr on *Rhizobium* growth and its symbiosis with Pea (*Pisum sativum*). **Weed Sci.**, v.44, p.31-37, 1996.

HAAHTELA, K.; KILPI, S.; KARI, K. Effects of phenoxy acid herbicides and glyphosate on nitrogenase activity (acetylene reduction) in root-associated *Azospirillum*, *Enterobacter* and *Klebsiella*. **FEMS Microbiology Letters**, v.53, n.1, p.123-127, 1988.

HAUGLAND, E. Ecological consequences of chemical weed control. **Norsk Landbruksforskning**, v.8, n.1, p.01-13, 1994.

HEAP, I.M. The occurrence of herbicide resistant weeds world wide. **Pesticide Science**, v.51, n.2, p.235-243, 1997.

HERNANDEZ, A.; GARCIA-PLAZAOLA, J.I.; BACERRIL, J.M. Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.) **J. Agric. Food Chem.**, v.47, p. 2920-2925. 1999.

KAPUSTA, G.; ROUWENHORST, D.L. Interaction of selected pesticides and *Rhizobium japonicum* in pure culture and under field conditions. **Agronomy Journal**, v.65, p.112-115, 1973.

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.1, p.176-186, 2001.

KISHINEVSKY, B. et al. Effects of some commercial herbicides on rhizobia and their symbiosis with peanuts. **Weed Research**, v.28, p.291-296, 1988.

MALLIK, M.A.B.; TESFAI, K. Pesticidal effect of soybean-rhizobia symbiosis. **Plant Soil**, v.85, p.33-41, 1985.

MALKONES, H.P. Comparation of the effects of differently formulated herbicides on soil microbial activities – a review. **J. Plant Dis. Protec.**, v.8, n.5, p.781-789, 2000.

MOORMAN, T.B. et al. Production of hydroxybenzoic acids by *Bradyrhizobium japonicum* strains after treatment with glyphosate. **J. Agric. Food Chem.**, v.40, n.2, p.289-293, 1992.

ORTIZ, S.; MUSUMECI, M.R.; TSAI, S.M. Efeito de alguns agrotóxicos na sobrevivência e na atividade respiratória de *Rhizobium leguminosarum* e *Bradyrhizobium japonicum*. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.24, n.6, p.663-667, 1989.

SCHULS, A.; KRUPER, A.; AMRHEIN, N. Differential sensitivity of bacterial S-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthases to the herbicide glyphosate. **FEMS Microbiology Letters**, v.28, p.297-301, 1985.

TSUI, M.T.K; CHU, L.M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere**, v.52, p.1189-1197, 2003.

5. TOLERÂNCIA DO *Bradyrhizobium* AO GLYPHOSATE EM MEIO ADICIONADO DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS

Bradyrhizobium TOLERANCE TO GLYPHOSATE IN MEDIUM ADDED OF AROMATIC AMINO ACIDS

RESUMO

Estudos vêm mostrando que há efeito negativo do glyphosate sobre o crescimento *in vitro* de *Bradyrhizobium*. A aplicação direta do glyphosate sobre plantas de soja resistentes a esse herbicida poderá prejudicar a simbiose da cultura com os *Bradyrhizobium*. Com o objetivo de averiguar essa hipótese avaliou-se os efeitos de formulações do glyphosate, sobre quatro estirpes de *Bradyrhizobium*: duas de *B. elkanii* (SEMIA 5019 e SEMIA 587) e duas de *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080), inoculadas em meio de cultura à base de manitol e extrato de levedura (YEM), com ou sem a suplementação de aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr e Trp) na concentração de 30 mg L⁻¹. As estirpes, separadamente, foram crescidas em meio YEM acrescido de: controle (sem adição de herbicida), produto padrão N-(phosphonomethyl) glycine (PMG), Zapp Qi[®] e Roundup Transorb[®], na concentração de 43,2 µg L⁻¹ do glyphosate

puro, com ou sem a suplementação de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptofano), dispostos em delineamento inteiramente casualizado, num arranjo fatorial 4x2, com seis repetições, para cada estirpe. O efeito dos tratamentos no crescimento das estirpes de *Bradyrhizobium* foi avaliado mediante leitura da densidade ótica (DO a 560 nm) em espectrofotômetro. As estirpes de *Bradyrhizobium* apresentaram sensibilidade diferenciada ao glyphosate, no entanto, todas sofreram o efeito tóxico do herbicida. Com a suplementação do meio de cultura com aminoácidos aromáticos, diminuiu-se, em média, 50% a ação tóxica do produto puro N-(phosphonomethyl) glycine, para todas as estirpes avaliadas. Dentre as formulações de glyphosate testadas, Roundup Transorb® mostrou-se mais tóxico que o Zapp Qi® e o glyphosate puro.

Palavras-chave: Fenilalanina, glyphosate, herbicida, rizóbio, tirosina, triptofano.

5.1 ABSTRACT

Studies have shown that there is negative effect of glyphosate on the *in vitro* growth of *Bradyrhizobium*. Direct application of glyphosate on soybean plants resistant to that herbicide can be harmful to symbiotic bacterium as *Bradyrhizobium*. So it was evaluated the effects of glyphosate formulations, on four *Bradyrhizobium* strains: two of *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 5019 and SEMIA 587) and two of *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 and SEMIA 5080), inoculated in basal mannitol and yeast extract medium (YEM), with or without aromatic amino acids supplementation (Phe, Tyr and Trp) in the concentration of 30 mg L⁻¹. The strains, separately, were grown in YEM medium added by: control (without any herbicide addition), standard product N-(phosphonomethyl) glycine (PMG), Zapp Qi® and Roundup Transorb®, in the concentration of 43,2 µg L⁻¹ of the pure glyphosate, with or without aromatic amino acids supplementation (phenylalanine, tyrosine, tryptophan), disposed in completely randomized design, in a factorial arrangement 4x2, with six replications. The effects of the treatments of *Bradyrhizobium* strains growth were appraised by optic density (OD) in spectrophotometer. The *Bradyrhizobium* strains presented differentiated sensitivity to glyphosate, however, the herbicide was toxic for all of them. The addition of aromatic

amino acids to the medium decrease the toxic effect to about 50% of the pure product N- (phosphonomethyl) glycine, for all the appraised strains. Among the glyphosate formulations tested, Roundup Transorb[®] provided greatest toxicity than Zapp Qi[®] and than the pure glyphosate, and the strains growth was not allowed.

Key words: Phenylalanine, glyphosate, herbicide, rhizobium, tyrosine, tryptophan.

5.2 INTRODUÇÃO

As recentes descobertas no campo da biotecnologia têm proporcionado o desenvolvimento de plantas cultivadas resistentes a herbicidas até então não seletivos. Entre estas culturas, destaca-se a soja resistente ao glyphosate, produzida em larga escala em vários países.

A cultura da soja ocupa, atualmente, a maior área de produção no Brasil, sendo aproximadamente 19,5 milhões de hectares, com produção esperada de 54 milhões de toneladas para safra 2003/2004 (IBGE, 2003). Além disso, esta cultura é a maior consumidora de herbicidas, uma vez que aproximadamente 100% da área plantada no Brasil é tratada com esses produtos. As vantagens do emprego de herbicidas se devem a alta eficiência no controle das plantas daninhas, ao alto rendimento operacional, a presença de produtos seletivos aos principais cultivares nacionais e ao menor custo, quando comparado aos outros métodos de controle disponíveis. Para gerar resultados que ajudem a esclarecer melhor os efeitos da adoção de cultivares de soja, geneticamente modificados, na agricultura brasileira, se faz imprescindível, pesquisas que avaliem possíveis problemas gerados a partir desta tecnologia.

Como os microrganismos têm papel primordial na manutenção da produtividade das culturas, uma vez que contribuem com a decomposição da matéria orgânica do solo, fixação de nitrogênio atmosférico, oxidação do amônio do solo a nitrato, aumento da capacidade de absorção de nutrientes do solo pelas plantas (micorrizas), parasitismo de pragas agrícolas, degradação de xenobióticos, entre outras, se torna importante conhecer a ação dos agroquímicos sobre esses. A aplicação de herbicidas dependendo do princípio ativo, da formulação, da dose utilizada, dos microrganismos presentes e da sensibilidade desses aos diversos produtos (ROYUELA et al., 1998), das condições

climáticas e do tipo de solo (SILVA et al., 2002), podem trazer conseqüências indesejáveis à microbiota de maneira geral. Por este motivo, a busca de moléculas herbicidas e formulações menos agressivas ao meio ambiente deve ser objetivo de todos aqueles que se utilizam dessa tecnologia para aumentar a produção de alimentos sem, no entanto, comprometer os recursos naturais que sustentam a vida no planeta.

O glyphosate é um herbicida não seletivo e de amplo espectro de ação, não podendo ser aplicado em área total após a germinação das culturas convencionais. No entanto, com o desenvolvimento da soja geneticamente modificada, resistente a este herbicida, tem-se observado aumento considerável na utilização de glyphosate aplicado em pós-emergência desta cultura nas áreas de plantio em diversos países do mundo.

Apesar dos resultados satisfatórios no controle das plantas daninhas, tem-se questionado a possibilidade de o glyphosate prejudicar o processo de fixação de N₂, realizado pela simbiose da planta de soja com as bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (BOLLICH et al., 1988; MARENCO et al., 1993; ZAWOZNIK et al., 1995; NOVO et al., 1996).

Trabalhos realizados em outros países (MOORMAN et al., 1992, EBERBACH & DOUGLAS, 1989, MALLIK & TESFAI, 1985, SCHULS et al., 1985) mostraram que o glyphosate apresentou toxicidade a estirpes de rizóbios ou prejudicou a nodulação de leguminosas, inclusive da soja. Segundo GONZALEZ et al. (1996), o risco de toxicidade de herbicidas aos microrganismos é maior quando os produtos inibem processos bioquímicos comuns entre as plantas e os microrganismos.

Como o glyphosate inibe a síntese da EPSP sintase, resultando na inibição da síntese de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano), a falta destes no metabolismo, pode ser o motivo da ação tóxica deste herbicida (EBERBACH & DOUGLAS, 1989). Nesse contexto, MOORMAN (1986), ao adicionar aminoácidos aromáticos no meio de cultura, verificou que o crescimento de estirpes de *R. japonicum*, não foi influenciado pela presença do glyphosate. Todavia, vários trabalhos mostraram que o efeito tóxico de adjuvantes presentes na composição comercial de herbicidas, inclusive o glyphosate afetam ou mesmo impedem o desenvolvimento de muitos microrganismos (KATAN & ESHEL, 1973; JOHAL & RAHE, 1984; SAWADA et al., 1988; BERNER et al., 1991).

Os surfatantes, classe especial de adjuvantes, podem assumir papel tóxico por diminuírem ou eliminarem a seletividade de alguns herbicidas a culturas pela remoção

da camada cerosa (KISSMANN, 1997). Além disso, a ação redutora de tensão superficial que tais aditivos apresentam, poderá tornar as bactérias mais sensíveis à ação herbicida, facilitando a entrada destes pelas membranas das mesmas (MALKONES, 2000).

Neste trabalho objetivou-se avaliar o comportamento de quatro estirpes de *Bradyrhizobium* sob efeitos do glyphosate, puro e em duas formulações comerciais, em meio enriquecido ou não por aminoácidos aromáticos.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas quatro estirpes de *Bradyrhizobium*: duas de *B. elkanii* (SEMIA 5019 e SEMIA 587) e duas de *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080), crescidas em meio YEM, enriquecido ou não por uma solução contendo aminoácidos aromáticos fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp); duas formulações comerciais de glyphosate: Zapp Qi e Roundup Transorb, mais o produto puro N-(phosphonomethyl) glycine (PMG) e uma testemunha sem herbicida.

As estirpes de *Bradyrhizobium* foram obtidas da Coleção de Bactérias Diazotróficas do Centro Nacional de Pesquisa da EMBRAPA/Agrobiologia, sendo as culturas estocadas em meio YEM, composto, em g L⁻¹, por: Manitol, 10; K₂HPO₄, 0,05; MgSO₄, 0,02; NaCl, 0,01; extrato de levedura, 0,5; ágar, 15 e com pH ajustado em 6,8., à temperatura de 4 °C. A ativação destas culturas foi realizada segundo método descrito pela EMBRAPA (1994), sendo realizada, posteriormente, sua multiplicação em Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio YEM líquido, incubados em agitador rotatório a 150 rpm e temperatura de 25 °C, até atingir densidade ótica (DO a 560 nm), equivalente a 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC) por mL.

O meio YEM enriquecido com aminoácidos foi preparado a partir da adição de 0,1 mL de uma solução contendo água esterilizada adicionados dos aminoácidos aromáticos Phe, Tyr e Trp, na concentração de 1 g L⁻¹, em 20 mL do meio YEM, de modo que a concentração final total dos aminoácidos fosse de 30 mg L⁻¹. Para o preparo da solução, após a pesagem de cada aminoácido e mistura em água destilada e deionizada, foi realizado o processo de *tindalização*, ou seja, aquecimento em *banho-*

maria, por uma hora a 100 °C, processo repetido por três vezes, com intervalo de 24 horas, sendo após estocadas no escuro a 5 °C, até o momento da adição ao meio.

As soluções-estoque dos herbicidas foram preparadas mediante a mistura de água destilada e deionizada aos produtos, sendo posteriormente esterilizadas por filtração (filtro Milipore 0,25 µm) em condições assépticas. As soluções-estoque contendo o PMG e as formulações comerciais foram preparadas na concentração de 43,2 µg L⁻¹, correspondente a 4,32 kg ha⁻¹ de glyphosate.

Para as avaliações, foram utilizadas placas de ELISA com 96 células de 300 µL de capacidade volumétrica. Nestas foram adicionados 180 µL de meio YEM líquido estéril (1,33 vez concentrado com ou sem enriquecimento de Phe, Tyr, Trp), 60 µL das soluções-estoque estéril contendo as formulações de glyphosate, e 15 µL das culturas ativadas, totalizando 255 µL de solução. Em seguida, as placas foram incubadas no escuro a 25 °C, de onde foram retiradas somente para as avaliações de crescimento e imediatamente recolocadas neste local, até o final do período de incubação. O efeito dos tratamentos sobre o crescimento das estirpes foi avaliado mediante leitura da DO em espectrofotômetro (Titertek Multiskan Plus MKII), a 560 nm, em intervalos de quatro em quatro horas, até completarem 24 horas e, após, de 12 em 12 horas, até a paralisação do crescimento, que se deu por volta de 132 horas após inoculação. O experimento foi constituído de um arranjo fatorial 4x2, totalizando oito tratamentos, sendo a combinação de quatro tratamentos-herbicidas (Zapp Qi, Roundup Transorb, PMG e testemunha sem herbicida) e duas fontes de crescimento (meio YEM com ou sem o enriquecimento dos aminoácidos Phe, Tyr e Try), para cada estirpe avaliada (SEMIA 5019, SEMIA 587, SEMIA 5079 e SEMIA 5080), dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições. A transformação DO x unidades formadoras de colônia (UFC), foi obtida por meio da contagem em placas, precedida pela diluição seriada da suspensão de DO conhecida. Para interpretação dos resultados foram confeccionadas curvas de crescimento a partir do log (UFC) e, os dados obtidos após 132 horas de incubação, foram submetidos à análise de variância, e, quando pertinentes, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na ausência do herbicida, para todas as estirpes avaliadas, verificou-se diminuição no número de unidades formadoras de colônia (UFC) com a suplementação de aminoácidos aromáticos ao meio de cultura (Figura 4 e Tabela 5). Resultados semelhantes foram obtidos por MOORMAN et al. (1992) os quais observaram que o enriquecimento do meio de cultura com $0,45 \text{ mg L}^{-1}$ com cada um dos três aminoácidos aromáticos, reduziu o crescimento da estirpe de *B. japonicum* USDA 138 em 23%. Tal fato foi atribuído ao possível desbalanceamento das condições ótimas oferecidas pelo meio YEM, com a suplementação por algum nutriente.

Nos meios contendo glyphosate, independente da formulação do herbicida, todas as estirpes foram afetadas, negativamente, ao longo do período de incubação, gerando diferentes padrões de crescimento (Figura 4 e Tabelas 5).

No meio contendo a formulação Zapp Qi[®], a suplementação ou não de aminoácidos aromáticos não interferiu no crescimento das estirpes SEMIA 5019, SEMIA 5080 e SEMIA 587, no entanto, este produto diminuiu 50%, em média, o total de UFC produzidas por tais estirpes ao final do período de incubação, quando comparado ao controle sem herbicida e aminoácidos (Tabela 5).

Para a estirpe SEMIA 5079, a suplementação com aminoácidos, em meio contendo Zapp Qi[®], provocou aumento no número de UFC, passando de $7,7 \times 10^6$ para $13,8 \times 10^6$, 132 horas após a inoculação (Tabela 5). Este efeito diferencial entre as estirpes pode estar relacionado a características particulares de absorção do produto por cada uma delas, como observado por FISCHER et al. (1986) em *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, mas não em *Bacillus subtilis*.

As estirpes SEMIA 5019 e SEMIA 587, ambas *B. elkanii*, apresentaram comportamento semelhante na presença da formulação comercial Zapp Qi[®], independente do enriquecimento do meio com aminoácidos. No entanto, SEMIA 5079 e 5080, ambas *B. japonicum*, diferiram na resposta à suplementação de tais compostos (Tabela 5). Este fato evidencia que mesmo dentro da espécie, há resposta diferenciada na sensibilidade ao glyphosate. MOORMAN et al. (1992), verificando os efeitos do glyphosate sobre duas estirpes de *B. japonicum*, observaram que, aos quatro dias após a inoculação em meio contendo 1mM deste herbicida, a estirpe USDA 110 teve 47% de inibição contra 19% da estirpe USDA 138. Ao mesmo tempo, esses autores verificaram

que o acúmulo de ácido shiquímico foi 37,5% maior na estirpe USDA 110, comparada à USDA 138. O aumento nos teores de ácido shiquímico pode ser resultante da menor metabolização do glyphosate ou da maior concentração deste herbicida no interior da célula bacteriana. Isolados de bactérias, crescidos em meio adicionado com glyphosate, apresentaram maior capacidade de excreção do shiquimato no meio de cultura, mostrando que este pode ser um dos mecanismos de tolerância a este herbicida (SCHULZ et al. 1985). HERNANDEZ et al. (1999), observaram que estirpes de *Bradyrhizobium* crescidas na presença de glyphosate apresentaram incremento médio na concentração do shiquimato intracelular de 190 vezes e extracelular de 45 vezes.

Quando se avaliou o glyphosate puro, sem o efeito de adjuvantes (PMG), ficou evidenciado o efeito deste produto sobre a rota do ácido shiquímico, uma vez que para todas as estirpes testadas, a suplementação com aminoácidos aromáticos, diminuiu, significativamente o efeito tóxico do herbicida (Figura 4 e Tabela 5). A redução na atividade da EPSP sintase diminuiu a produção de triptofano, tirosina e fenilalanina, o que compromete a síntese de proteínas e, por conseqüência, o crescimento celular (CALDWELL, 1999).

Quando se comparou a formulação comercial Zapp Qi® e o glyphosate puro (PMG), observou-se não haver diferença entre os tratamentos com suplementação de aminoácidos ao meio, podendo-se inferir que os aditivos presentes no produto comercial não apresentam efeito tóxico adicional aos descritos para o glyphosate puro.

TSUI & CHU (2003), estudando o glyphosate e alguns adjuvantes, verificaram que a toxicidade do produto comercial Roundup foi menor do que o surfatante polioxietileno amina, todavia, essa toxicidade foi superior àquela observada para o produto puro glyphosate e o sal de isopropilamina sem adição de surfatantes. Para esses autores, algumas espécies como algas, por serem fotossintetizantes, e apresentarem metabolismo similar às plantas superiores, são mais sensíveis aos efeitos do glyphosate puro, sem aditivos; no entanto, bactérias e fungos poderão apresentar maior sensibilidade a aditivos que compõem as formulações comerciais.

Segundo KISHINEVSKY et al. (1988) é possível que solventes, surfatantes e agentes molhantes presentes nas formulações comerciais a base de glyphosate, contribuam para os efeitos inibitórios destes produtos no crescimento de estirpes de rizóbios. Também MALKONES (2000), inferiu que os aditivos presentes na formulação dos agroquímicos podem afetar os microrganismos, e em certos casos até modificar o

efeito dos agroquímicos. Para MALIK et al. (1989), a toxicidade do glyphosate a mamíferos, aves e peixes é quase desprezível na sua formulação pura, isenta de adjuvantes. Entretanto, SAWADA et al. (1988), verificaram que para induzir a intoxicação aguda para mamíferos, a dose do surfatante com o qual o produto comercial Roundup® é formulado é cerca de três vezes menor do que a do próprio ingrediente ativo do herbicida. Tal fato evidencia que relatos de toxidez do glyphosate aos microrganismos do solo, poderá não somente ser devido ao herbicida, mas também a aditivos presentes na formulação comercial deste. WILKINSON & LUCAS (1969) observaram que a formulação comercial do paraquat aumentava seu efeito tóxico contra fungos, quando comparado ao ingrediente ativo puro.

O efeito da toxicidade dos aditivos presentes em formulações de glyphosate foi facilmente observado para Roundup Transorb® o qual apresentou ação inibitória sobre o crescimento de todas quatro estirpes avaliadas (Figura 4 e Tabela 5). Somente para SEMIA 5019, a partir de 48 horas da inoculação, observou-se pequeno crescimento na presença deste produto comercial independente da adição de aminoácidos aromáticos ao meio de cultura (Figura 4). Todavia, comparado ao PMG, este aumento foi menor do que 50% em meio não suplementado com Phe, Tyr e Trp, ao final do período de avaliação (Tabela 5). Mesmo a suplementação do meio com aminoácidos aromáticos não foi suficiente para impedir o efeito tóxico da formulação comercial Roundup Transorb® às estirpes.

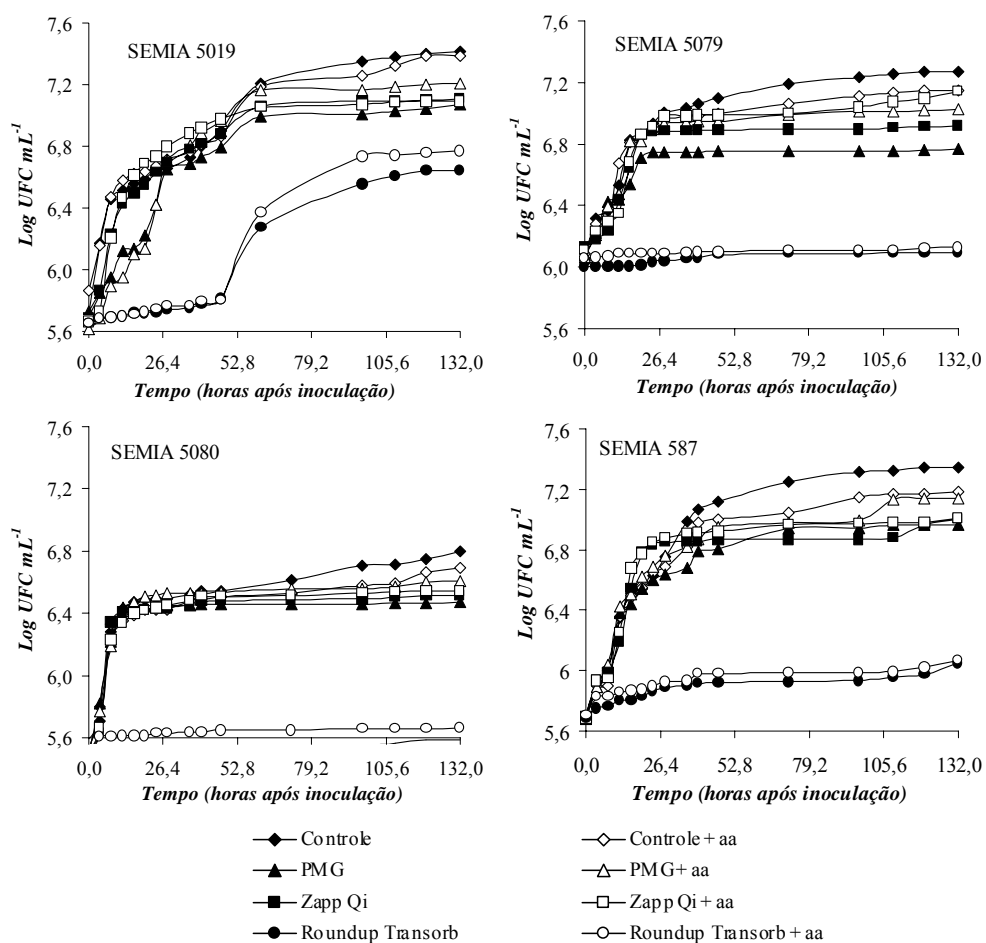


Figura 4. Efeito do glyphosate puro padrão N-(phosphonomethyl) glycine (PMG) e das formulações comerciais Zapp Qi[®] e Roundup Transorb[®] (aplicados na concentração de $43,2 \mu\text{g L}^{-1}$), sobre o logaritmo do número de unidades formadoras de colônia (UFC mL^{-1}) para as estirpes de *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 5019 e SEMIA 587, e de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 e SEMIA 5080, em meio com ou sem enriquecimento pelos aminoácidos aromáticos (aa).

Tabela 5. Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de quatro estirpes de *Bradyrhizobium*, 132 horas após inoculação em meio YEM enriquecido ou não pelos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano, sob efeito de três formulações de glyphosate (ZappQi® e Roundup Transorb® e o produto puro PMG).

Meio YEM Utilizado	Testemunha	Zapp Qi®	Roundup Transorb®	PMG
	-----UFC 10 ⁶ mL ⁻¹ -----			
SEMIA 5019				
C(aa)	24,27 a A	12,45 a B	5,42 a C	14,61 a B
S(aa)	25,29 a A	12,34 a B	4,73 a C	9,83 b B
SEMIA 5079				
C(aa)	14,16 b A	13,84 a A	1,38 a B	10,60 a A
S(aa)	18,52 a A	7,70 b B	1,20 a C	5,72 b BC
SEMIA 5080				
C(aa)	4,89 b A	3,21 a B	0,45 a C	3,59 a B
S(aa)	6,31 a A	3,04 a B	0,33 a C	2,88 b B
SEMIA 587				
C(aa)	14,87 b A	10,23 a B	0,66 a C	13,01 a AB
S(aa)	22,08 a A	10,11 a B	0,57 a C	8,80 b B

C(aa) e *S(aa)*: Meio YEM, respectivamente, com e sem a suplementação com Phe, Tyr e Trp, na concentração de 10 mg L⁻¹ de cada aminoácido.

Médias seguidas de letras iguais, maiúscula na linha e minúscula na coluna, para cada estirpe, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O estudo do glyphosate sobre microrganismos revelou que o produto Roundup®, comparado ao sal isopropilamina de glyphosate, sem aditivos ou surfatantes, apresentou toxidez superior, principalmente a bactérias e protozoários (TSUI & CHU, 2003). Os autores ainda determinaram que 86% da toxidez do produto comercial foi atribuída ao surfatante nele presente.

A paralisação total do crescimento por efeito do Roundup Transorb®, observada a partir dos resultados, não se deve, somente, ao ingrediente ativo, mas também a aditivos presentes na formulação. Vários autores relataram a rápida penetração deste produto, comparada à observada para outras marcas a base de glyphosate, nas plantas

(JAKELAITIS et al. 2001; PEDRINHO JUNIOR, et al., 2002), se devendo tal fato aos adjuvantes especiais contidos no Roundup Transorb®.

Variedades transgênicas de soja resistentes ao glyphosate têm a capacidade de translocar este herbicida por muito mais tempo do que variedades sensíveis (MOORMAN et al.1992), portanto, mantendo-o em maior contato com os bacteróides nos nódulos das raízes. Mesmo que as variedades resistentes forneçam os aminoácidos aromáticos ao microsimbionte, o efeito dos aditivos presentes na formulação poderá ser prejudicial aos mesmos.

5.5 CONCLUSÕES

- 1) As estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 5019, SEMIA 5079, SEMIA 5080 e SEMIA 587 apresentaram sensibilidade diferenciada ao glyphosate.
- 2) A formulação Roundup Transorb® apresentou toxidez superior ao Zapp Qi® e ao glyphosate puro, inibindo totalmente o crescimento das estirpes de *Bradyrhizobium* avaliadas.
- 3) A suplementação do meio de cultura com aminoácidos aromáticos diminui a ação tóxica do produto puro N-(phosphonomethyl) glycine, sobre *Bradyrhizobium*.
- 4) A ação tóxica de Roundup transorb® para as estirpes de *Bradyrhizobium*, não é diminuída com a suplementação do meio por aminoácidos aromáticos.
- 5) Os adjuvantes presentes nas formulações comerciais de glyphosate têm importante papel no grau de toxidez, desse herbicida, às estirpes de *Bradyrhizobium*.

5.6 LITERATURA CITADA

BERNER, D.K.; BERGGREN, G.T.; SNOW, J.P. Effects of glyphosate on *Calonectia crotalariae* and red crown rot of soybean. **P. Disease**, v.75, n.8, p.809-813,1991.

- BOLLICH, P.K.; DUNIGAN, E.P.; KITCHEN, L.M.; TAYLOR, V. The influence of trifluralin and pendimethalin on nodulation, N₂ (C₂ H₂) fixation, and seed yield of field-grown soybeans (*Glycine max*). **Weed Sci.**, v.36, n.1, p.15-19, 1988.
- CALDWELL, D.R. **Microbial Physiol. Metabol.** 2 ed. Belmont: Star, 1999. 403 p.
- EBERBACH, P.L., DOUGLAS, L.A. Herbicide effects on the growth and nodulation potencial of *Rhizobium trifolii* with *Trifolium subterraneum*. **Plant Soil**, v.119, p.15-23, 1989.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. 1 ed. Brasília, 1994, 542p.
- FISCHER, R.S.; BERRY, A.; GAINES, C.G.; JENSEN, R.A. Comparative action of glyphosate as a trigger of energy drain in Eubacteria. **J. Bacteriol.** 1986, v.168, p.1147-1154.
- GONZALEZ, A., GONZALEZ-MURUA, C., ROYUELA, M. Influence of imazethapyr on *Rhizobium* growth and its symbiosis with Pea (*Pisum sativum*). **Weed Sci.**, v.44, p.31-37, 1996.
- HERNANDEZ, A., GARCIA-PLAZAOLA, J.I., BACERRIL, J.M. Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.) **J. Agric. Food Chem.**, v.47, p.2920-2925. 1999.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA –IBGE. Disponível em <http://www.ibge.org.br/agricultura/estatísticas_brasil2003/htm> acessado em 23/12/2003.
- JAKELAITIS, A.; FERREIRA, L.R.; SILVA, A.A.; MIRANDA, G.V. Controle de *Digitaria horizontalis* pelos herbicidas glyphosate, sulfosate e glyphosate potássico submetidos a diferentes intervalos de aplicação. **Planta Daninha**, v.19, n.2, p.279-285, 2001.
- JOHAL, G.S.; RAHE, J.E. Effect of soilborne plant-pathogenic fungi on the herbicidal action of glyphosate on bean seedlings. **Phytopathology**, v.74, p.950-955, 1984.
- KATAN, J.; ESHEL, Y. Interactions between herbicides and plant pathogens. **Residue Reviews**, v.45, p.145-177, 1973.
- KISHINEVSKY, B., LOBEL, R., LIFSHITZ, N., GURFEL, D. Effects of some commercial herbicides on rhizobia and their symbiosis with peanuts. **Weed Research**, v.28, p.291-296, 1988.

KISSMANN, K.G. **Adjuvantes para caldas de produtos fitossanitários**. In: XXI Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas (21:1997: Caxambu, MG). Palestras e mesas redondas. Caxambu, MG: SBCPD, 1997, 1997. 189 p.

MALIK, J.; BARRY, G.; KISHORE, G. **The herbicide glyphosate**. *Biofactors*, v.2, n.1, p.17-25, 1989.

MALKONES, H.P. Comparation of the effects of differently formulated herbicides on soil microbial activities – a review. **J. Plant Dis. Protect.**, v.8, n.5, p.781-789, 2000.

MALLIK, M.A.B., TESFAI, K. Pesticidal effect of soybean-rhizobia symbiosis. **Plant Soil**, v.85, p.33-41, 1985.

MARENCO, R.A., LOPES, N.F., MOSQUIM, P.R. Nodulation and nitrogen fixation in soybeans treated with herbicides. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v.5, p.121-126, 1993.

MOORMAN, T.B. Effects of herbicides on the survival of *Rhizobium japonicum* strains. **Weed Sci.**, v.34, p.628-633, 1986.

MOORMAN, T.B. BECERRIL, J.M.; LYDON, L.; DUKE, S.O. Production of Hydroxybenzoic Acids by *Bradyrhizobium japonicum* Strains after Treatment with Glyphosate. **J. Agric. Food. Chem.**, v.40, p.289-293, 1992.

NOVO, M.C.S. S.; CRUZ, L.S.P.; PEREIRA, J.C.V.N.A.; NAGAI, V.; AMBRÓSIO, L.A. Efeito de linuron e oryzalin no crescimento da planta, na fixação simbiótica do nitrogênio e na produtividade da soja. **Planta Daninha**, Viçosa, v.14, n.1, p.65-81, 1996.

PEDRINHO JUNIOR, A.F.F.; MARTINI, G.; FELICI, G.V.; PIVA, F.M.; DURIGAN, J.C. Momento da chuva após a aplicação e a eficácia dos herbicidas sulfosate e glyphosate aplicados em diferentes formulações. **Planta Daninha**, v.20, n.1, p.115-123, 2002.

ROYUELA, M.; GONZALEZ, A.; ARRESE-IGOR, C.; APARICIO-TEJO, P.M.; GONZALEZ-MURUA, C. Imazethapyr inhibition of acetolactate synthase in *Rhizobium* and its symbiosis with pea. **Pestic. Sci.**, v.52, p.372-380, 1998.

SAWADA, Y.; NAGAY, Y.; UEAMA, M. Probalbe toxicity of surface-active agent in commercial herbicide containing glyphosate. **The Lancet**, v.1, n.2, p.299, 1988.

SCHULS, A., KRUPER, A., AMRHEIN, N. Differential sensitivity of bacterial S-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthases to the herbicide glyphosate. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.28, p.297-301, 1985.

- SILVA, A.A., SILVA, J.F., FERREIRA, F.A., FERREIRA, L.R., SILVA, J.F. **Controle de plantas daninhas**. Brasília, DF: ABEAS, módulo 3, 2000. 260p.
- SPADOTTO, C.A. Uso de Herbicidas no Brasil. Comitê de Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas. 2002. [on-line] Disponível: <<http://www.cnpma.embrapa.br/herbicidas/>> [Acessado em 06/10/2003].
- TSUI, M.T.K; CHU, L.M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere**, v.52, p.1189-1197, 2003.
- WILKINSON, V. LUCAS, R.L. Effects of constituents of Gramoxone W on rates of respiration of soil fungi. **Weed Research**, v.2, n.9, p.288-288, 1969.
- ZAWOZNIK, M.S.; BENAVIDES, M.P., TOMARO, M.L. Effect of herbicide diuron on growth and symbiotic behavior of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species. **Eur. J. Soil Biol.**, v.31, n.2, p.183-188, 1995.

6. CONCLUSÕES FINAIS

Bactérias do gênero *Bradyrhizobium* mostraram-se sensíveis ao glyphosate, evidenciando que este produto tem ação tóxica sobre seu metabolismo.

Na avaliação das concentrações crescentes de glyphosate, foi observada a sensibilidade dos rizóbios mesmo na menor concentração. No entanto, ficou claro que a sensibilidade é diferenciada entre as espécies, *B. elkanii* e *B. japonicum*, e entre as estirpes na mesma espécie. Tal fato evidencia que o melhoramento genético ao qual tais estirpes foram submetidas pode ter selecionado estirpes com maior ou menor capacidade de metabolização de compostos, dentre eles o glyphosate.

Quando se comparou o efeito do glyphosate com outros herbicidas, sobre as estirpes de rizóbio, foi possível distinguir índices de toxidez entre eles, sendo imazethapyr e fomesafen, os mais tóxicos. Todavia, apesar do herbicida carfentrazone-ethyl apresentar o mesmo mecanismo de ação do fomesafen (inibidores da protoporfirinogênio oxidase – PROTOX), este produto não foi tóxico às estirpes. Tal fato pode estar associado à recente preocupação, por parte das indústrias de agroquímicos, quanto ao estudo de moléculas com menor impacto ambiental negativo. Sabe-se que o carfentrazone-ethyl foi lançado recentemente no mercado, sendo relatado como não agressivo para animais e microrganismos. No entanto, a tolerância diferencial do rizóbio ao carfentrazone e fomesafen, pode estar associada, também, a aditivos da formulação comercial.

A ação tóxica de aditivos ficou evidenciada no experimento com produtos comerciais à base de glyphosate. Os efeitos sobre o crescimento das estirpes de rizóbio pelos produtos testados, variaram desde muito baixo, para Zappi Qi[®], até muito alto, para Roundup Transorb[®]. Tal resultado pode estar relacionado com a capacidade que esses produtos têm em penetrar com maior ou menor rapidez sobre as células bacterianas. Aditivos especiais, presentes nas formulações, com o objetivo de facilitar a penetração rápida do produto nos tecidos das plantas tratadas, a fim de se evitar perdas pela ação de chuvas, podem estar promovendo a maior toxidez ao rizóbio.

Uma prova de que o efeito de formulações de glyphosate sobre o crescimento do rizóbio não se dá somente pela inibição da EPSP sintase, é dada quando se adiciona ao meio os aminoácidos aromáticos. Para o produto comercial Roundup Transorb[®], essa adição não diminuiu a sensibilidade observada nas estirpes a este herbicida. Entretanto, sobre o glyphosate puro, a adição desses aminoácidos fez aumentar o crescimento de todas as estirpes avaliadas.

As estirpes avaliadas neste trabalho são as comercialmente recomendadas para inoculação em sementes de soja em todo Brasil. As mesmas se mostraram sensíveis ao glyphosate.

Levando-se em conta o efeito do glyphosate sobre o rizóbio e a importância da simbiose entre estas bactérias com a soja, quanto à economia na adubação nitrogenada, e, sabendo-se que em cultivares transgênicos, resistentes ao glyphosate, esse herbicida será aplicado diretamente sobre a cultura, torna-se justo o estudo desse produto sobre a simbiose dessas espécies a fim de se evitar possíveis problemas futuros sobre a produtividade dessa cultura tão importante na economia brasileira.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Quadro 1. Resumo da Análise de Variância das variáveis, tempo de avaliação (T) durante o período de 126 horas de incubação e cinco doses (0,0; 5,4; 10,8; 21,6 e 43,2 µg L⁻¹ de glyphosate) (D) para o número de unidades formadoras de colônia (UFC 10⁶) das estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 587.

F.V.	G.L.	QUADRADOS MÉDIOS*		
		SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 587
REP	5	34,0592	5,8779	40,4872
DOSE (D)	4	266,8378	369,1236	240,2874
Resíduo (a)	20	8,0198	11,1485	6,9337
TEMPO (T)	12	790,3900	621,7593	703,1620
D x T	48	15,5951	19,9197	31,9621
Resíduo (b)	300	1,0544	2,1554	2,3552
C.V. (%)		10,53	15,88	16,62

*F significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Quadro 2. Resumo da Análise de Variância das variáveis, tempo de avaliação (T₁) durante o período de 134 horas de incubação e seis tratamentos herbicida (controle, glyphosate, imazethapyr, fomesafen, carfentrazone-ethyl, e glyphosate + carfentrazone) (H) para o número de unidades formadoras de colônia (UFC 10⁶) das estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 587.

F.V.	G.L.	QUADRADOS MÉDIOS*		
		SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 587
REP	5	76,9745	18,6640	3,6245
HERBICIDA (H)	5	492,6342	21,2985	7,7739
Resíduo (a)	25	75,0534	7,6742	1,3265
TEMPO (T)	17	812,0840	99,0902	66,7300
H x T	85	18,3286	2,0864	0,6533
Resíduo (b)	510	2,3551	0,4742	0,08236
C.V. (%)		11,73	12,68	8,25

* F significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Quadro 3. Resumo da Análise de Variância das variáveis, tempo de avaliação (T) durante o período de 122 horas de incubação e nove formulações de glyphosate (controle, glyphosate puro, Zapp Qi, Agrisato, Roundup Transorb, R. WG, R. Multiação, R. Original e Trop) (F) para o número de unidades formadoras de colônia (UFC 10^6) das estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 587.

F.V.	G.L.	QUADRADOS MÉDIOS*		
		SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 587
REP	5	5,8614	7,4833	1,7105
FORMULAÇÃO (F)	8	1061,2620	2749,3270	287,0863
Resíduo (a)	40	3,4843	7,5749	2,1753
TEMPO (T)	12	775,5377	1140,6900	28,9047
F x T	96	30,2553	73,2860	9,0241
Resíduo (b)	540	0,4595	0,7567	0,1868
C.V. (%)		13,37	10,85	23,33

* F significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Quadro 4. Resumo da Análise de Variância das variáveis, tempo de avaliação (T_1) durante o período de 132 horas de incubação e oito tratamentos (controle, glyphosate puro, Zapp Qi e Roundup Transorb, com ou sem suplementação por aminoácidos aromáticos) (T_2) para o número de unidades formadoras de colônia (UFC 10^6) das estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 5019, SEMIA 5079, SEMIA 5080 e SEMIA 587.

F.V.	G.L.	QUADRADOS MÉDIOS*			
		SEMIA 5019	SEMIA 5079	SEMIA 5080	SEMIA 587
REP	5	16,3097	5,3850	0,9937	6,3279
TRATAMENTO (T_2)	7	872,6605	979,8800	131,5948	943,387
Resíduo (a)	35	5,4819	6,0180	0,3400	11,9928
TEMPO (T_1)	15	1204,2410	344,2757	29,1781	534,2760
T_1 x T_2	105	51,0329	31,6676	2,5683	51,9854
Resíduo (b)	600	1,0462	1,1243	0,0684	0,9305
C.V. (%)		16,85	17,82	11,93	18,14

* F significativo ao nível de 1% de probabilidade.