

**EFEITO DO ROUNDUP® (GLIFOSATO) SOBRE *Bradyrhizobium* spp. E
FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES “*IN VITRO*” E NA
NODULAÇÃO E MICORRIZAÇÃO DA SOJA**

JULIANO DOS SANTOS MALTY

2004

JULIANO DOS SANTOS MALTY

**EFEITO DO ROUNDUP® (GLIFOSATO) SOBRE *Bradyrhizobium* spp. E
FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES “*IN VITRO*” E NA
NODULAÇÃO E MICORRIZAÇÃO DA SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador
Prof. José Oswaldo Siqueira

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2004

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos
da
Biblioteca Central da UFLA

Malty, Juliano dos Santos

Efeito do Roundup® (glifosato) sobre *Bradyrhizobium* spp. e fungos micorrízicos arbusculares “*in vitro*” e na nodulação e micorrização da soja / Juliano dos Santos Malty. – Lavras : UFLA, 2004.

73 p. : il.

Orientador: José Oswaldo Siqueira.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Soja. 2. Herbicida. 3. Microbiota. I. Universidade Federal de Lavras. II.

Título

CDD-633.34954

JULIANO DOS SANTOS MALTY

**EFEITO DO ROUNDUP® (GLIFOSATO) SOBRE *Bradyrhizobium* spp. E
FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES “*IN VITRO*” E NA
NODULAÇÃO E MICORRIZAÇÃO DA SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas, para a obtenção do título de “Mestre”.

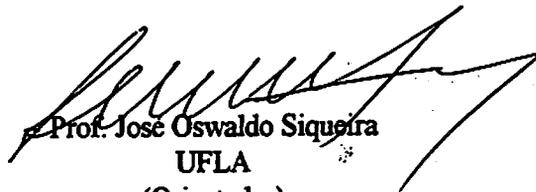
APROVADA em 14 de maio de 2004

Prof.^a Fátima Maria de Souza Moreira (Co-orientadora)

UFLA

Prof. Romildo da Silva

UFLA


Prof. José Oswaldo Siqueira
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2004

**Aos meus avós, em especial a Finha;
À minha tia Rose;
Aos meus irmãos Simone, Larissa e Júnior;
E aos meus sobrinhos, Marcela, Matheus, João e Luca;
Simplesmente por existirem, tornando minha vida muito preferível.**

OFEREÇO

**Aos grandes amores da minha vida, Dalva, minha mãe,
e Gerson, meu pai;
e ao Renato,
por estarem sempre ao meu lado e por me ajudarem
incondicionalmente.**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela companhia, proteção e saúde.

Aos meus pais e avós, pelo amor e exemplo de como viver para o bem.

À minha tia-avó Rose, pelo querido Gurgel, e a meu tio-avô João Carlos, por tudo que fizeram por todos nós, sempre.

À minha namorada Giovana pelo amor, companhia, paciência e por me ensinar a ser uma pessoa melhor.

Aos meus irmãos e sobrinhos pelas visitas, pelo apoio e por acreditarem em mim.

Ao meu orientador, professor José Oswaldo Siqueira, pela oportunidade, confiança, críticas, ensinamentos e, principalmente pela amizade.

À professora Fátima, co-orientadora, e ao professor Romildo da Silva, pelos ensinamentos, críticas e sugestões apresentadas para a melhoria deste trabalho.

Aos professores Wenceslau J. Goedert e Vânia Moda-Cirino pela confiança, amizade e ensinamentos.

Aos meus amigos do CESO, em especial Eduardo, Cláudio, Issan, Luiz Felipe, Antônio, William, Piá e Gabi, por tudo que já aprontamos nesta vida.

Aos meus amigos da Agronomia/UnB, em especial a Izabela, pelo carinho e incentivo para o ingresso nesta fase da minha vida; a Blau-Blau (Monstro), Ellen e Joelho pelos ensinamentos e momentos de alegria (eventos, músicas e drinks vários).

Aos grandes amigos de Lavras, Alexandre (o Barberi), Adrianinha, Alexandre (o D'andrea), Serginho, Renato, Cláudio (Meu Rei), Lizi, Dani (do Lipi), Silvana, Márcio, Lillian e Ana Valéria, pelos momentos que simplesmente são inesquecíveis!

Aos amigos microbiologistas, em especial Zé Geraldo, Isabel, Ederson, Alessandra, Juciane, Adão, e a todos os alunos da iniciação pelo apoio e agradável convivência no decorrer do curso.

A todos os amigos do DCS, especialmente a Cláudia, pelo carinho e auxílio nas atividades da dissertação; Arystides, Antônio Marcos, Gigi, Claret, Vô Frido e Adélia.

A todos da Toca dos Gabirus pelos eventos, festas e coisas do gênero.

Ao laboratorista Manoel pela dedicação e auxílio nas atividades experimentais.

Aos funcionários do DCS, especialmente a Wall, Adriana, Marlene, Pezão e Emerson, pelo apoio em diversos momentos.

A todos os professores do DCS pelos ensinamentos.

A UFLA/DCS pela oportunidade de realização do curso.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Aos amigos que porventura não mencionei.

A vocês: MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Agrotóxicos e seus impactos no solo.....	3
2.2 O glifosato.....	6
2.2.1 Caracterização e ação da molécula.....	6
2.2.2 Interação e comportamento no solo.....	8
2.2.3 Degradação e persistência.....	10
2.2.4 Impacto na microbiota do solo.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Experimentos de laboratório.....	33
3.1.1 <i>Bradyrhizobium elkanii</i> e <i>B. japonicum</i>	33
3.1.2 Fungos micorrízicos arbusculares “in vitro”.....	37
3.2 Soja inoculada em solo com aplicação prévia de Roundup®.....	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Efeitos do Roundup® sobre <i>Bradyrhizobium</i> spp. “in vitro”.....	43
4.1.1 Efeitos do Roundup® sobre fungos micorrízicos arbusculares “in vitro”.....	51
4.2 Efeito do Roundup® no crescimento, nodulação e colonização micorrízica da soja.....	58
5 CONCLUSÕES	64
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
7 ANEXO	73

RESUMO

MALTY, Juliano dos Santos. Efeito do Roundup® (glifosato) sobre *Bradyrhizobium* spp. e fungos micorrízicos arbusculares “*in vitro*” e na nodulação e micorrização da soja. 2004. 72 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, MG*.

Especialmente no Brasil, o sucesso da cultura da soja (*Glycine Max* (L.) MERRIL) está atrelado à tecnologia de produção, que inclui a exploração da simbiose da planta com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, e da simbiose radicular com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Neste sentido, o plantio direto, diminuindo os efeitos deletérios da exposição do solo, e o desenvolvimento e uso de moléculas pesticidas de baixa toxicidade, como aqueles à base de glifosato, são cada vez mais constantes nas áreas de produção. O desenvolvimento da soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato, denominada soja Roundup Ready (RR), tem contribuído para um maior uso do herbicida, tornando necessário conhecer melhor os efeitos do herbicida neste agrossistema. O presente trabalho objetivou avaliar o efeito do herbicida Roundup® (glifosato) sobre 3 estirpes de *Bradyrhizobium elkanii* (BR 29, INPA 80A e INPA 553A), 1 de *B. japonicum* (BR 86) e 3 espécies de FMAs (*Gigaspora margarita*, *Glomus etunicatum* e *Scutellospora heterogama*), em meio de cultivo contendo doses crescentes do herbicida, e sobre a nodulação e micorrização da soja em solo que recebeu, antes da semeadura, diferentes doses do herbicida. O Roundup® mostrou-se inibitório ao crescimento de *Bradyrhizobium* spp. e aos FMAs em meio de cultura, sendo esse efeito dependente da dose aplicada e da estirpe ou espécie avaliada. No entanto, a inibição só ocorreu em concentração muito superior àquelas normalmente esperadas em condições reais de campo. Em função da DI_{50} , pôde-se constatar sensibilidade diferenciada no crescimento das estirpes bacterianas avaliadas, sendo esta decrescente na seguinte ordem: BR 86 > INPA 80A > INPA 553A > BR 29. A germinação, bem como o crescimento dos tubos germinativos dos esporos das FMAs, proporcionaram uma inibição diferenciada decrescendo na seguinte ordem: *G. etunicatum* > *S. heterogama* > *G. margarita*. A aplicação de Roundup® no solo, até a dose equivalente a 10 L/ha e 10 dias antes da semeadura da soja, não influenciou a nodulação e a colonização micorrízica da planta.

Comitê Orientador: José Oswaldo Siqueira – DCS/UFLA (Orientador); Fátima M. S. Moreira – DCS/UFLA (Co-orientadora).

ABSTRACT

MALTY, Juliano dos Santos. Effect of Roundup® (glyphosate) on *Bradyrhizobium* spp. and arbuscular mycorrhizal fungi “in vitro” and on soybean nodulation and mycorrhization. 2004. 72 p. Dissertação (Master in Soils and Plants Nutrition) – Federal University of Lavras, MG*.

Particularly in Brazil, the success of soybean *Glycine Max* (L.) MERRILL) crop is connected to the production technology, that includes the use of the symbiotic association between the plant nitrogen fixing bacteria belonging to the genus *Bradyrhizobium*, and the root symbiosis with the arbuscular mycorrhizal fungi (AMFs). Thus, the no tillage system, which reduces the deleterious effects of the soils exposure, and the development and use of low toxicity pesticide molecules, such as glyphosate, are been increasingly used in field crops. The development of the genetically modified soybean tolerant to glyphosate, named Roundup Ready (RR), has contributed to an increase in the use of this herbicide, and therefore, requiring more knowledge about the potential effects of the herbicide on the various components of the ecosystem. The present work aimed to evaluate the effect of the herbicide Roundup® (glyphosate) on 3 strains of *Bradyrhizobium elkanii* (BR 29, INPA 80A and INPA 553A) and 1 of *B. japonicum* (BR 86), and 3 species of AMFs (*Gigaspora margarita*, *Glomus etunicatum* and *Scutellospora heterogama*), in cultural medium containing increasing amounts of the herbicide, and on nodulation and mycorrhization of soybean, in soil previously sprayed with different doses of the herbicide. The Roundup® inhibited the growth of *Bradyrhizobium* spp. and AMFs in the cultural medium, being these effects dependent upon dosis and microbial strains or species. However, such inhibition only occurred under concentrations much larger than those normally found in real field conditions. The growth of the bacterial strains showed different sensitivity to increasing concentration of ghyphosate and upon ID₅₀ their sensitinty decreased in the following order: BR 86 > INPA 80A > INPA 553A > BR 29. The germination, and germ tube growth of AMFs spores also exhibited differentiated response to gyphosate decreasing in the following order: *G. etunicatum* > *S. heterogama* > *G. margarita*. The soil application of Roundup® at rate equivalent to up to 10 L/ha sprayed ten days before the sowing, had no influence neither in nodulation nor in mycorrhizal colonization of soybean.

*Adivisor Committe: José Oswaldo Siqueira – DCS/UFLA (Major Professor); Fátima M. S. Moreira – DCS/UFLA.

1 INTRODUÇÃO

A safra brasileira 2003/2004 de soja (*Glycine max*) está estimada em aproximadamente 55 milhões de toneladas, com um incremento de 13% em relação à safra anterior (Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, 2004), proporcionando ao Brasil o segundo lugar no ranking de produção do grão no mundo.

Especialmente no Brasil, o sucesso da cultura está atrelado à tecnologia de produção, que inclui a exploração da simbiose da planta com microrganismos do solo, como bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, que se associam às raízes proporcionando benefícios como a substituição da adubação nitrogenada. A soja também forma naturalmente outra simbiose radicular com fungos do solo, o que favorece a aquisição de nutrientes e água, proporciona maior proteção contra patógenos e melhora a agregação do solo. Somente a biofertilização nitrogenada representa uma economia da ordem de 1,4 bilhões de dólares anuais, tornando o grão brasileiro mais competitivo no mercado internacional em função da diminuição do custo de produção. Portanto, a simbiose eficiente do *Bradyrhizobium* é um fator que contribui para o desenvolvimento da sojicultura brasileira e precisa ser preservada.

Dada a importância da cultura da soja no cenário mundial, estudos sobre a planta têm se intensificado no mundo inteiro, visando maiores produtividades, economia na produção e minimização dos impactos ambientais advindos do cultivo em larga escala. Assim, é cada vez mais comum e necessária a utilização de técnicas e produtos que se adequem a esses novos conceitos de produção. Neste sentido, o plantio direto, diminuindo os efeitos deletérios da exposição do

solo, e o desenvolvimento e uso de moléculas pesticidas de baixa toxicidade são cada vez mais constantes nas áreas de produção.

Para o manejo adequado desta cultura em sistema de plantio direto, o uso de um herbicida não seletivo, de contato, como aqueles à base de glifosato, tem se destacado pela eficácia no controle das plantas daninhas e dessecação da cultura formadora da palha. Estes herbicidas apresentam baixa toxicidade ambiental e reduzido efeito residual no cultivo da soja, tornando-se os herbicidas mais utilizados no Brasil e no mundo.

Com o avanço da engenharia genética no melhoramento de plantas, obteve-se a soja geneticamente modificada tolerante ao glifosato, denominada soja Roundup Ready (RR), que apresenta mecanismos de resistência a esse princípio ativo, viabilizando, assim, a aplicação do herbicida em pós-emergência em relação à soja. Devido às vantagens das cultivares transgênicas em expressar esta característica, seu uso atinge cerca da metade da área de soja no mundo. Com isso, o uso deste herbicida aumentou muito e continuará aumentando em função da expansão dos cultivos transgênicos, como ocorre com a soja no Brasil. Portanto, torna-se necessário conhecer melhor os efeitos do herbicida nos componentes do agrossistema, em função de indicações de que o glifosato pode apresentar efeito negativo no crescimento do rizóbio, do desconhecimento dos impactos da aplicação do químico sobre fungos micorrizicos arbusculares (FMAs) e do desenvolvimento do processo infectivo, de estabelecimento e/ou funcionamento da associação soja-endófitos.

Assim, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito do herbicida Roundup® (glifosato) sobre estirpes de *Bradyrhizobium* spp. e de FMAs, crescidas em meio de cultivo contendo doses crescentes do herbicida, e sobre a nodulação e micorrização da soja em solo que recebeu diferentes doses do herbicida.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Agrotóxicos e seus impactos no solo

O solo recebe, de diversas formas, quantidades apreciáveis de compostos químicos sintéticos não existentes naturalmente no ambiente, chamados xenobióticos (Moreira & Siqueira, 2002). A presença destas substâncias antropogênicas no solo, é resultado de deposições intencionais, como a aplicação de pesticidas, rejeitos industriais e urbanos, aterros sanitários, entre outros, ou de acidentes.

De todos os compostos xenobióticos que atingem o solo intencionalmente, os agrotóxicos merecem consideração especial, pois em virtude da larga utilização e conseqüente volume comercializado em todo o mundo, a magnitude do mercado agrícola mundial supera os US\$ 30 bilhões anuais. Segundo dados do Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos – SINDAG, do ano de 2000, o Brasil ocupa a 7^o colocação no consumo médio mundial de defensivos agrícolas, com 3,2 Kg ha⁻¹, movimentando US\$ 2,5 bilhões em vendas por ano. Em função da extensa utilização dos agrotóxicos, vem aumentando o interesse da sociedade e da comunidade científica em conhecer melhor o destino das moléculas pesticidas no ambiente e seus impactos nos processos do solo e do ecossistema. No entanto, a avaliação desses impactos é complexa e dinâmica, pois a taxa de degradação dessas moléculas no solo é função de múltiplos fatores, em que a densidade da população microbiana, as propriedades físico-químicas e a biodisponibilidade das moléculas e fatores edáficos como pH, temperatura, umidade e disponibilidade de nutrientes são fatores determinantes, agindo de forma isolada e/ou interagindo entre si (Aislabie e Lloyd-Jones, 1995).

Numerosas pesquisas demonstram que os pesticidas têm proporcionado efeitos diferenciados direta ou indiretamente nos microrganismos do solo, favorecendo ou inibindo-os, sendo estes efeitos permanentes ou temporários. Essa variação de resultados pode ser explicada pelos diversos componentes que atuam no sistema quando se faz uma avaliação comportamental dos microrganismos em relação a um pesticida. A condição experimental, as características físico-químicas do meio, a temperatura, a umidade, a luminosidade, o grupo microbiano avaliado, a dose e princípio ativo aplicado e a sensibilidade da variável resposta são algumas das variáveis que devem ser avaliados, segundo Moreira & Siqueira (2002). Ainda de acordo com estes autores, o impacto dos pesticidas sobre a microbiota e os processos biológico do solo é difícil de ser determinado com precisão, devido à natureza, heterogeneidade, dinâmica dos efeitos e respostas adaptativas das populações microbianas do solo.

Entre os pesticidas aplicados, os fungicidas e fumigantes são os produtos que promovem alterações mais drásticas na microbiota do solo devido à sua ação intencional como agente antimicrobiano. No entanto, há relatos de efeitos indesejáveis também de herbicidas e inseticidas.

Greaves (1979), em revisão literária específica sobre efeitos a longo prazo sobre as comunidades microbianas nos solos, em função de aplicações de herbicidas por um longo período, concluiu que são pequenas as evidências de ocorrência de efeitos diretos desses químicos nos microrganismos ou em suas atividades no solo, atribuindo possíveis alterações nestes componentes aos efeitos indiretos proporcionados pelos químicos, como a redução da matéria orgânica em função do controle das plantas daninhas. Roslycky (1977), avaliando o efeito da aplicação no solo de doses recomendadas de diversos herbicidas (paraquat, isolado ou associado à linuron, diuron, atrazina, simazina e simazina mais diuron), não observou grandes alterações nas populações de bactéria,

actinomicetos e fungos do solo, em condição de laboratório e simulação de campo, por 66 e 77 dias, respectivamente, e uma inibição temporária na respiração desses organismos, mesmo quando alguns herbicidas foram aplicados em concentrações extremas.

Além das possíveis alterações nas populações e atividades microbianas do solo, microrganismos endofíticos formadores de simbioses com as plantas, como o rizóbio e os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), podem ser influenciados pelos herbicidas, alterando o comportamento dos mesmos no processo infectivo, de estabelecimento e/ou de funcionamento da associação. Neste sentido, Nemeč & Tucker (1983), avaliando o comportamento do *Glomus etunicatum*, inoculado em *Citrus* sp., observaram um efeito diferenciado na porcentagem de infecção, número de vesículas e desenvolvimento de hifas do fungo em função da dose e do herbicida aplicado (bromacil, diuron, simazina, trifluralina, PPG 844 e paraquat). Em estudo com rizóbio, Arruda *et al.* (2001) observaram, em função do incremento nas doses dos herbicidas imazaquin, clomazone e sulfentrazone, um decréscimo significativo no crescimento ou na sobrevivência de quatro estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, os quais apresentaram tolerância diferenciada aos herbicidas.

Diferenciadas também foram as respostas encontradas por diversos autores (Dunigan *et al.*, 1972; Rennie & Dubetz, 1984; Bollich *et al.*, 1985; Eberbach & Douglas, 1991; Marengo *et al.*, 1993 e Novo *et al.*, 1996) para as avaliações de peso e número de nódulos, atividade da nitrogenase e fixação do N atmosférico em plantas de soja e de trevo em simbioses com bactérias formadoras de nódulos, em função dos diversos herbicidas aplicados (excetuando o glifosato, tratado especificamente no tópico seguinte), tipos de solo e período de avaliação, evidenciando a especificidade de cada molécula, condições edafoclimáticas e composição microbiana do meio.

Esses experimentos ganham importância diante das estimativas de Charudattan (1993), que cita que mais de 90% da demanda total de pesticidas em algumas culturas nos EUA, e também em diversas outras partes do mundo, são por herbicidas. Isto porque as plantas daninhas são consideradas o maior problema mundial em termos de pragas agrícolas, exigindo o uso de grandes quantidades de herbicidas. Segundo o SINDAG (2002), existem no Brasil 278 princípios ativos de agrotóxicos registrados, sendo 81 com ação herbicida, compondo mais de uma centena de formulações, com várias marcas comerciais.

2.2 O glifosato

2.2.1 Caracterização e ação da molécula

Entre os herbicidas comercializados no mundo, o glifosato destaca-se pelo volume comercializado e por sua amplitude de utilização, sendo o sétimo pesticida mais consumido na agricultura, o terceiro em áreas comerciais e industriais e o segundo mais utilizado em residências e jardins nos Estados Unidos (Caroline Cox, 2000). Estimativas da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) mostram que o uso anual do herbicida é de 38-48 milhões de dólares (Aspelin, 1997). No Brasil o glifosato está registrado na forma isolada de 11 marcas comerciais (Agrisato, Glifosato Agripec, Glifosato Fersol, Glifosato Nortox, Glion, Glyphogan, Gliz, Rodeo, Roundup, Scout e Trop) e 3 misturas (Command, Tropazin, Tropuron) (Rodrigues & Almeida, 1998).

A molécula do glifosato (*N*-[fosfonometil]glicina), um derivado da glicina, foi desenvolvida no início dos anos 70 nos Estados Unidos, sendo primeiramente reportada por Baird *et al.* (1971) e inicialmente registrada naquele país, em 1974, como o herbicida Roundup®. O glifosato possui uma estrutura

molecular simples (Figura 1), de baixo peso molecular (PM 169,1) e com estrutura de um zwitterion. No estado sólido encontra-se na forma de cristais brancos, como sais de isopropilamina (PM 228,2; C₆H₁₇N₂O₅P), sesquisódio (PM 228,2; C₆H₁₄N₂Na₃O₁₀P₂) e trimésio (PM 228,2; C₆H₁₆NO₅PS), todos muito solúveis em água e insolúveis em solventes orgânicos comuns, como acetona, etanol e xileno (Tomlin, 1994; Franz, 1985). Possui ponto de ebulição de 200° C, pressão de vapor praticamente nula e, como um ácido fosfônico, possui a habilidade de quelar certos cátions divalente e trivalente. O glifosato é altamente estável, não estando sujeito a fotodecomposição ou volatilização (Hoagland & Duke, 1982).

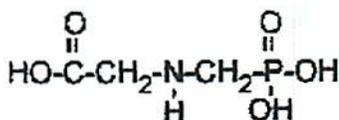


FIGURA 1 Estrutura química do glifosato

A ação herbicida não-seletiva da molécula deve-se à interferência na enzima que cataliza o sexto passo na via metabólica do ácido shikimico, a 5-enol-piruvil-shikimato-3-fosfato (EPSP) sintase (Cole, 1985, citado por Forlani, *et al.*, 1999), a qual é envolvida na biossíntese dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano (Jaworski, 1972 e, Steinrucken, *et al.*, 1980, citado por Liu, *et al.*, 1991). Esses aminoácidos aromáticos são essenciais para a síntese de proteínas que atuam no metabolismo primário e secundário das plantas (Carlisle & Trevors, 1988, citado por Tu *et al.*, 2001), sendo, portanto, vitais para elas. O glifosato pode atuar também como um inibidor competitivo do fosfoenolpiruvato (PEP), um precursor da síntese de aminoácidos aromáticos, afetando outros processos bioquímicos, e apesar de esses efeitos serem considerados secundários,

eles podem ser importantes na ação letal total do glifosato nas plantas (Tu *et al.*, 2001).

O baixo peso molecular e a alta solubilidade em água do glifosato são fatores que favorecem a rápida absorção pelas folhas, penetrando na cutícula por difusão, e a sua translocação é sistêmica, com preferência pelo floema, tanto para as folhas e meristemas aéreos como para os subterrâneos (Rodrigues & Almeida, 1998). No entanto, quando presente no solo, sua absorção também pode ocorrer pelas raízes.

No interior da planta o glifosato não é degradado, nem significativamente metabolizado, o que pode favorecer a manutenção de sua ação fitotóxica quando translocado para outras partes da planta. Meristemas são os locais conhecidos de acúmulo do glifosato (Hoagland & Duke, 1982).

2.2.2 Interação e comportamento no solo

Os estudos do comportamento do glifosato no solo iniciaram-se em 1975 e primeiramente foram reportados por Sprankle *et al.*, em uma série de trabalhos publicados naquele ano (1975a, b e c). Estes autores indicaram que a adsorção inicial do glifosato no solo é reversível e que o grupo fosfônico do herbicida compete com ânions fosfáticos pelos sítios de adsorção. Foi constatada, ainda, uma influência do pH na disponibilidade do glifosato em um solo arenoso, porém somente para elevadas doses do herbicida (56 kg/ha) e valores de pH acima de 5,6 (1975a). Semelhantemente, Nomura & Hilton (1977), trabalhando com glifosato marcado (^{14}C -glifosato) também associaram a adsorção da molécula à capacidade de fixação do fósforo inorgânico dos solos, havendo uma diminuição na adsorção somente em solos com pH acima de 7,0. Variações na adsorção do

glifosato em função do pH também foram reportadas por McConnell & Hossner (1985) e Kawate & Appleby (1987).

Vários autores relacionaram a adsorção do glifosato ao tipo de argila e à textura do solo (McConnell & Hossner, 1985; Glass, 1987 e Kawate & Appleby, 1987), no entanto, segundo Sprankle *et al.* (1975b), a maior adsorção do herbicida parece estar pouco relacionada com a CTC das argilas, mas preferencialmente ao cátion ligado a ela, principalmente Mn^{++} , Fe^{+++} e Al^{+++} , ressaltando a formação de complexos fosfato-metal-ácido fúlvico, o que comprovou a elevada afinidade do glifosato com a matéria orgânica e as argilas do solo. Corroborando o fato reportado por Jonge & Jonge (1999), que citaram que a força iônica e o cátion dominante influenciaram a adsorção do glifosato, sendo a complexação da molécula com cátions multivalentes de superfície-trocável sugerida como um possível mecanismo de sorção, e que esta força variou fortemente em resposta ao pH e à composição da solução do solo estudada. McConnell & Hossner (1985) também observaram maior adsorção do glifosato em função dos íons saturantes, na seguinte ordem: $Al^{3+} > Ca^{2+} > Na^{+}$. A importância do grupo fosfônico para a manutenção de altos níveis de estabilidade dos complexos Fe^{3+} -Glifosato em solução aquosa com valores de pH igual ou superior a 4 foi ainda descrita por McBride & Kung (1989), que sugeriram que a forte adsorção do glifosato nos óxidos é consequência do mesmo mecanismo de quelação observado em solução.

Sprankle *et al.* (1978) confirmaram a rápida inativação do glifosato no solo por sorção às argilas e na matéria orgânica e a subsequente degradação a CO_2 . Posteriormente, Piccolo *et al.* (1996) constataram que a adsorção do glifosato a substâncias húmicas purificadas é semelhante, senão superior, à observada nas argilas minerais. No entanto, esse processo pode variar de acordo com a estrutura macromolecular e o tamanho do material húmico. A adsorção ao

material húmico foi atribuída à sorção do hidrogênio presente na molécula. No entanto, Hance (1976), em estudo realizado com 9 tipos de solos diferentes, não observou correspondência da adsorção do glifosato com a capacidade de adsorção total do fosfato, com o nível de ferro e alumínio solúvel ou com o conteúdo de argila, matéria orgânica ou valor de pH.

Estudando amostras de três solos brasileiros, Prata *et al.* (2000), observaram que a sorção do glifosato foi sempre elevada, independentemente da matéria orgânica dos mesmos, e que esta sorção está diretamente correlacionada com a capacidade do solo em adsorver Pi e a presença de Fe^{2+} , Fe^{3+} e Al^{3+} . Em experimento de dessorção, o glifosato relacionou-se com os altos valores da constante de sorção/dessorção (K_f), os quais indicaram elevada entalpia de ligação entre a molécula e a fração coloidal do solo. Assim, os autores inferiram que praticamente a totalidade do glifosato aplicado ao solo ficou na forma de resíduo ligado. Os autores identificaram ainda a capacidade do glifosato em atuar como um zwitterion, manifestando cargas positivas e negativas nos valores de pH dos solos estudados. Essa característica zwitterionica da molécula já havia sido relatada por Sprankle *et al.* (1975b), o que, segundo os autores, contribui para uma mobilidade altamente limitada do glifosato no solo, variando de acordo com o pH, os níveis de fosfato e o tipo de solo. Essa baixa mobilidade também foi observada por Hance (1976), Nomura & Hilton (1977) e Tortensson & Aamissepp (1977).

2.2.3 Degradação e persistência

No processo de inativação do glifosato, Sprankle *et al.* (1975a) identificaram a degradação biológica ou química da molécula como sendo a etapa conseguinte à adsorção da mesma ao solo, sugerindo ainda a ocorrência de co-

metabolismo no processo de degradação biológica (Sprankle *et al.*, 1975b), o que foi proposto também por outros autores (Torstensson & Aamissepp, 1977; Malik *et al.*, 1989). No entanto, Dick & Quinn (1995) não obtiveram evidência deste processo no catabolismo do herbicida.

Em estudo detalhado sobre o metabolismo e degradação do glifosato no solo, Rueppel *et al.* (1977) concluíram que a degradação da molécula ocorre rapidamente por ação microbiana e não quimicamente, e identificaram o ácido aminometilfosfônico (AMPA) como o principal metabólito do glifosato, o qual, assim como a molécula originária, é facilmente biodegradado no solo. Alguns outros autores também apontaram o AMPA como sendo o principal metabólito da degradação do glifosato (Nomura & Hilton, 1977; Santos & Flores, 1995; Krzysko & Orlik, 1997). Wirén-Lehr *et al.* (1997), estudando a mineralização do [¹⁴C]Glifosato livre e seus resíduos associados a restos vegetais de soja, também constataram a biodegradação do glifosato.

A fotodecomposição da molécula do glifosato foi avaliada por Lund-Høie & Friestad (1986), os quais, estudando a incidência luminosa natural e artificial sobre solução de glifosato, observaram que a luz de comprimento de onda longo não proporcionou qualquer efeito degradante na molécula. No entanto, quando exposto à luz ultravioleta, a meia-vida do glifosato foi de 4 dias, na dose inicial de 1 ppm, e de 3-4 semanas para a dose inicial de 2000 ppm.

Rueppel *et al.* (1977) observaram ainda uma variação na degradação da molécula de acordo com as propriedades dos solos estudados. Para três tipos de solos avaliados, a meia-vida calculada do glifosato, aplicado na dose de 8 ppm, variou de 3 a 130 dias. Também em função das características dos solos estudados, Nomura & Hilton (1977) observaram uma rápida evolução de ¹⁴CO₂ nos primeiros 10 dias, passando para uma liberação mais lenta nos últimos 40 dias de experimento, e calcularam, em função da liberação do ¹⁴CO₂, a meia-vida

da molécula, que variou de 18 dias a 22,7 anos. Contrariando o observado por Sprankle *et al.* (1975a) e Nomura & Hilton (1977), Araújo *et al.* (2003) observaram uma taxa de degradação elevada somente a partir do oitavo e até o trigésimo segundo dia de incubação. Smith & Aubin (1993), também estudando a metabolização do glifosato em solo úmido e não estéril, constataram uma meia-vida da molécula inferior a 40 dias.

Müller *et al.* (1981), em estudo de persistência do glifosato, aplicado na dosagem de 17 ppm, realizado em dois solos diferentes da Finlândia, sendo o primeiro rico em matéria orgânica e o segundo com textura siltosa, observaram que, após 8 meses, a quantidade do herbicida detectada nos solos diminuiu consideravelmente, estando presentes 10% do aplicado para o primeiro solo e 53% para o segundo, obtendo-se, assim, correlação positiva entre a atividade respiratória dos solos e a taxa de degradação da molécula.

Em estudo da persistência do glifosato, aplicado em dois canais de irrigação secos, na taxa de 5,6 kg/ha de glifosato, Comes *et al.* (1976) não observaram resíduos do herbicida e nem do ácido aminometilfosfônico nas amostras da primeira água percorrida nos canais, fato que aconteceu 158 e 172 dias após o tratamento. Já quando o glifosato foi misturado na água, 70 % e 58% do total adicionado foram observados a 1,6 e 14,4 km a jusante do local de aplicação, respectivamente. Cornish (1992), em experimento de casa de vegetação, identificou efeito residual fitotóxico do glifosato para mudas de tomate transplantadas para um solo que recebeu 4 L/ha do herbicida, 1, 5 e 15 dias antes do transplante. Foi observada também uma redução no peso das plantas secas, 16 dias após o transplante, mas somente onde deficiências nutricionais do solo foram corrigidas após o transplante. Já para experimento de campo, os sintomas de fitotoxicidade também apareceram, porém em menor intensidade e uniformidade. O glifosato reduziu o peso da planta seca em 50, 74 e 78% quando as mesmas

foram transplantadas para o solo que recebeu, 9 dias antes do transplântio, doses equivalentes a 2, 4 e 8 L/ha do herbicida.

Considerando o papel fundamental dos microrganismos do solo na degradação do glifosato, alguns trabalhos foram realizados com o intuito de identificar espécies microbianas capazes de utilizar a molécula do herbicida como fonte de energia. Assim, Moore et al. (1983) isolaram uma estirpe bacteriana a partir de uma cultura de *Pseudomonas aeruginosa*, a qual, por apresentar diferenças morfológicas e metabólicas, foi identificada como *Pseudomonas* sp. PG2982, demonstrando capacidade de degradar o glifosato em cultura pura. Posteriormente, Kishore & Jacob (1987) também observaram a biodegradação do glifosato por esta mesma estirpe, relatando, no entanto, a existência de duas vias metabólicas, ocorrentes em função da presença ou ausência de Pi no meio. Os autores identificaram também a estirpe GLP-1 de *Arthrobacter* sp. como capaz de degradar o glifosato. Balthazor & Hallas (1986) e Pipke & Amrhein (1988) também identificaram estirpes de *Flavobacterium* sp. e de *A. atrocyaneus* ATCC 13752, respectivamente, capazes de metabolizar o glifosato.

Liu et al. (1991), em estudo avaliando diversas estirpes das famílias Rhizobiaceae e *Agrobacterium* quanto à habilidade de degradar o glifosato, observaram que todas foram hábeis em crescer em meio com glifosato, servindo como fonte de P, adicionado de aminoácidos aromáticos. No entanto, o crescimento foi mais lento do que quando se adicionou o Pi no lugar do herbicida. Os autores sugeriram que essa menor taxa de crescimento poderia ser explicada pelo acúmulo do glifosato observado no interior da célula, causando, assim, um efeito inibitório do crescimento. Em estudo específico para a estirpe de *R. meliloti* RM1021, a concentração de 1mM de glifosato proporcionou um retardamento no crescimento. Quando se trabalhou com substrato radioativo, os autores observaram que em 30 minutos, aproximadamente 85% do glifosato tinha sido

transportado para o interior das células, a partir de quando essa taxa começou a decrescer. Em avaliação genética da estirpe *R. meliloti* RM1021 foi evidenciado que o Pi suprime a expressão dos genes que codificam para a formação de enzimas que quebram a ligação C-P, proporcionando células inábeis para metabolizar o glifosato, tendo em vista que a degradação da molécula inicia-se pela clivagem da ligação C-P.

Dick & Quimm (1995), estudando a metabolização do glifosato em 163 estirpes de bactérias isoladas de locais com e sem exposição primária ao herbicida, observaram que isolados capazes de utilizar o glifosato como fonte de fósforo foram mais comuns nas estirpes isoladas dos locais tratados com o herbicida, mas muito menos abundantes do que aquelas capazes de utilizar o metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA).

A degradação do glifosato por espécies fúngicas foi observada por Krzysko-Lupicka & Orlik (1997), os quais adicionaram o glifosato na composição do meio de cultura Martin como fonte de P e C e observaram uma diminuição na população fúngica e uma substancial mudança na composição das estirpes, em função da presença do glifosato no meio, sendo isolados representantes das seguintes espécies: *Penicillium*, *Mucor*, *Verticillium*, *Trichoderma*, *Neosartorya*, *Fusarium* e *Rhizopus*.

Em estudo envolvendo microrganismos na degradação do glifosato, Forlani *et al.* (1999) sugeriram que, pelo menos nas etapas iniciais da degradação do herbicida, organismos não cultiváveis e não formadores de colônias visíveis “in vitro” estariam envolvidos no processo.

2.2.4 Impacto na microbiota do solo

Estudos da influência do glifosato no comportamento de microrganismos do solo são particularmente importantes, pois, segundo Fischer *et al.* (1986), bactérias como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* possuem a enzima EPSPS, que é inibida pelo glifosato, exemplificando a diversidade bioquímica da via metabólica da síntese de aminoácidos aromáticos susceptível à molécula. No entanto, em decorrência da diversidade na biosíntese de aminoácidos aromáticos, o modelo de inibição da molécula é diferenciado entre esses organismos.

Diversos autores já estudaram e reportaram trabalhos referentes ao impacto do glifosato na microbiota do solo, encontrando respostas diversificadas para os mesmos parâmetros avaliados (Tabela 1). Este fato não raramente foi atribuído às características ambientais encontradas nas ocasiões dos estudos, como condições edafo-climáticas; laboratoriais, como o tempo de exposição do químico junto aos microrganismos, pH e componentes de meio de cultura; bem como a especificidade de cada microrganismo estudado.

TABELA 01. Artios consultados, referentes aos impactos da aplicação do glifosato em microrganismos do solo.

Autor	Organismo	Condição/Local	Dose	Resultado/Efeito/Conclusão
Roslycky (1982)	Heterotróficos	Lab. (meio) /Canadá	1 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (resp.) e $\mu\text{g/g}$ (contag.) (5,91 a 5917 μM)	- Para fungos, pequeno incremento temporário (até 28° dia) na contagem e respiração, em condição de elevadas dosagens; - Para bactérias e actinomicetos, elevado incremento, nas maiores doses, no crescimento e respiração.
Quinn <i>et al.</i> (1988)	Heterotróficos	Lab. (meio) /Irlanda	0,25 a 10 mM (40 a 1690 mg/L)	- Houve efeito inibitório no crescimento microbiano, com o aumento da dosagem - Maior tolerância dos microrganismos isolados de área com histórico de aplicação do glifosato, quando comparado com os de área sem este histórico
Wardle & Parkinson (1990a)	Heterotróficos	Lab. (solo) Canadá	0; 2; 20 e 200 $\mu\text{g/g}$ (12 a 1120 μM)	Aumento temporário da respiração somente na maior dosagem
Wardle & Parkinson (1990b)	Heterotróficos	Lab. (solo) /Canadá	0; 2; 20 e 200 $\mu\text{g/g}$ (12 a 1120 μM)	-Sem efeito para fungos e actinomicetos. Para bactérias, efeito estimulante temporário, nas maiores doses -Oito espécies fúngicas isoladas, sendo 3 favorecidas (para 20 e 200 $\mu\text{g/g}$), 1 inibida (200 $\mu\text{g/g}$), e 4 não apresentando efeito. Efeitos temporários (Até o 3° dia)
Wardle & Parkinson (1991)	Heterotróficos	Campo/Canadá	4 kg i.a./ha (DR) (25 μM)	Sem efeito na respiração basal (B), induzida (I), B/I e na presença de inibidores
Souza <i>et al.</i> (1996)	Heterotróficos	Lab. (solo)/Brasil	3 L/ha (DR) (6,75 μM)	Aumento da atividade microbiana (emissão de CO_2)

Gorlach-Lira <i>et al.</i> (1997)	Heterotróficos	a) Lab. (meio) /Polônia b) Lab. (solo) /Polônia	a) 100 a 500 ppm (591,8 a 2959,1 μM) b) 1 e 4 ppm (DR) (5,9 e 23,7 μM)	a) Diminuição na produção de micélio fúngico, em função do aumento das doses b) Houve comportamento inibitório ou estimulante de acordo com as doses aplicadas e o tipo de solo amostrado para bactérias, actinomicetos, quitinolíticos e celulolíticos, diferente dos fungos, que sofreram poucas alterações para estas condições.
Haney <i>et al.</i> (2000)	Heterotróficos	Lab. (solo)/EUA	47 (0,84 kg/ha); 94; 140 e 234 $\mu g/g$ (278 a 1390 μM)	Aumento da atividade microbiana, mas não da biomassa
Busse, <i>et al.</i> (2001)	Heterotróficos	Lab. (meio e solo)/EUA	a) 25 a 500 mM (bact.) (DR=50mM) (4,22 a 84,5 g/L) b) 50 mM (fungos) (8,44 g/L) c) 5 a 5000 mg i.a./kg (resp.) (30 a 30000 μM) d) Doses de campo (9-13 anos)	a e b) Houve variação no crescimento fúngico e bacteriano de acordo com as doses aplicadas e locais de amostragem dos solos a e b) O glifosato reduziu sensivelmente a população bacteriana e fúngica já nas menores doses a e b) Fungos apresentaram-se mais sensível em relação às bactérias, não sendo observado crescimento em isolados de dois solos, para doses recomendadas para aplicações de campo. c) Respiração do solo: sem efeito para doses de campo (50 mM) e estímulo para altas doses d) Solos com aplicação continuada de glifosato por 9-13 anos, não alterarão a respiração basal, quociente metabólico, no número total de bactérias, mineralização do "N" e de M.O., sendo estes efeitos menores do que os observados em função da época e local de amostragem.

Araújo <i>et al.</i> (2003)	Heterotróficos	Lab. (solo)/Brasil	2,16 mg/kg = 2,16 µg/g (13 µM)	- Nº de fungos e actinomicetos aumentaram. Para bactérias foi mínimo o efeito; - Maior evolução de CO ₂ em solos com aplicação prévia do glifosato, comparado a solos sem essa aplicação; - Maior degradação da molécula entre o 8º e o 32º dia
Haahtela <i>et al.</i> (1988)	Bactérias diazotróficas (Finlândia)	Lab. (meio) /Finlândia	0; 5; 25 e 100 mg/L (29,6 a 591,6 µM)	Efeito estimulante ou inibitório do glifosato na atividade da nitrogenase e no crescimento, de acordo com a espécie bacteriana e o meio testado
Santos & Flores (1995)	Bactérias diazotróficas (<i>Azotobacter chroococcum</i> e <i>A. vinelandii</i>)	Lab. (meio) /Espanha	4 a 40 kg/ha do i.a. (60%) = 59 e 590 mM	- Sensibilidade ao glifosato diferente entre as espécies bacterianas; - Na dose recomendada observou-se crescimento normal das espécies.; - Inibição de 60% na respiração (ambas espécies) e 80% (<i>A. vinelandii</i>) e 98% (<i>A. chroococcum</i>) na fixação do "N", para as doses de 20 e 28 kg/ha, respectivamente.
Faizah <i>et al.</i> (1980)	Vários rizóbios tropicais	Lab. (meio YMA) /Malásia	a) 12,1 g/L (71 mM) b) 0 a 30 g/L (17,75 a 177,5 µM)	a) Apesar da dose muito elevada, houve inibição mediana no crescimento (zona de inibição) de 11 isolados de rizóbio b) Apesar da dose muito elevada, não foi observada inibição para os tratamentos de doses na sobrevivência de 3 isolados selecionados de rizóbio (Isolados da Malásia, África e Austrália)
Mallik & Tesfai (1983)	<i>R. japonicum</i> (<i>B. japonicum</i>)	Lab. (meio YMB)/EUA	0 a 250 µg/mL (29,6 a 1479,2 µM)	Sem efeito do glifosato no n.º de colónias formadas, para a estirpe 311b110 (EUA), em 24 horas de cultivo

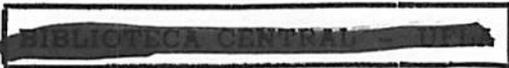
Moorman (1986)	<i>R. japonicum</i> (<i>B. japonicum</i>)	Lab. (meio [YMA] e solo)/EUA	a) 2 e 20 mg/L b) 2 e 20 mg/kg (11,8 e 118,3 μ M)	a) Sem efeito, em ambas as doses, na taxa de crescimento das estirpes 110SK e 138ES (EUA) b) Efeitos inconsistentes no crescimento, para dosagens, tempo (7, 14 e 21 dias de cultivo) e estirpes avaliadas (110SK e 138ES - EUA)
Eberbach & Douglas (1989)	<i>Rhizobium trifolii</i>	Lab. (meio) /Austrália	0; 2 (DR); 5; 10 e 20 mg i.a./L (11,8; 29,6; 59,2 e 118,3 μ M)	Diminuição no crescimento, a partir da dose 10 mg ia/L Glifosato agiu como prolongador da fase "lag"
Liu <i>et al.</i> (1991)	Rizóbio e agrobactéria	Lab. (meio)/EUA	a) 0,05 a 1 mM (8,45 a 169 mg/L) b) 1 mM	a) Todas as estirpes (EUA) foram hábeis em crescer em meio com glifosato b) A estirpe RM1021 (EUA) de <i>R. meliloti</i> teve seu crescimento retardado.
Moorman <i>et al.</i> (1992)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> .	Lab. (meio YMA)/EUA	0; 0,5; 1 e 5 mM do i. a. (84,5; 169 e 845 mg/L)	- Houve inibição no crescimento, para as concentrações de 0,5 e 1 mM, em função das 3 estirpes (USDA 110; 123 e 138 - EUA), variando de 10 a 47% - Para a concentração 5 mM, a inibição foi total
Martensson (1992)	<i>Rhizobium</i> sp.	Lab. (meio YMA)/Suécia	10 e 100 mg/L* * suposto (59 e 591,6 μ M)	Observou um comportamento (inibitório ou estimulante) no crescimento, em função das 7 estirpes estudadas (Suécia)
Jacques <i>et al.</i> (2002)	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Lab. (meio YMA)/Brasil	0 a 206 μ M (4,4 a 35,1 mg/L)	-Decréscimo no crescimento das 3 estirpes estudadas (BR 29, BR 85 e BR 96), em função da aplicação de doses crescentes, variando de 27 (2,6 μ M) a 58% (206 M) -Ordem de tolerância ao glifosato: BR 85 > BR 29 > BR 96

Jacques <i>et al.</i> (2002)	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Lab. (meio YMA)/Brasil	42,2 μ M (25,5 mg/L)	- Sensibilidade diferente entre as estirpes - Ordem de tolerância ao glifosato: BR (96=85>29)
Morandi (1989)	<i>Glomus mosseae</i>	Lab. (solo) /França	0,5 μ g/mL do i.a. (2,9 μ M)	Redução no crescimento das plantas de soja, mas também um aumento significativo nos níveis de infecção do FMA
Chakravarty & Chatarpaul (1990)	<i>Ectomicorriza (Paxillus involutus)</i>	CV (solo) e Campo/Canadá	0,54 e 3,23 kg do i.a./ha (3,1 e 18,6 μ M)	Sem efeito no desenvolvimento da simbiose com <i>Pinus resinosa</i> . Elevada taxa de colonização
Beyrle <i>et al.</i> (1995)	<i>Rhizoctonia</i> sp.	Lab. (meio) /Austrália	0,5 e 1,0 mM (84,5 e 169 mg/L)	- Em nenhuma dose houve inibição do crescimento de <i>Rhizoctonia</i> sp, - 1mM inibiu a iniciação da micorrização em protocormos de orquídea (<i>Orchis morio</i>)
Mallik & Tesfai (1985)	FBN (<i>B. japonicum</i> / soja)	Lab. (solo)/EUA	1,12 (DR) e 5,6 kg/ha (7 e 35 μ M)	- A nodulação e atividade da nitrogenase foram significativamente reduzidas, já na menor concentração (1,12 kg/ha = 7 μ M)
Eberbach & Douglas (1989)	FBN (<i>Rhizobium trifolii</i> / trevo)	Lab. (meio) /Austrália	2 (DR) a 20 mg/L (11,8 a 118,3 μ M)	Diminuição linear no número de nódulos em plantas de trevo
Martensson (1992)	FBN (<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> / trevo)	Lab. (meio YMA)/Suécia	10; 40 e 60 mg/L (59,1 a 354,9 μ M)	Variação na deformação do pelo radicular, nodulação e produção de matéria seca, em função da época de aplicação do herbicida ao meio.
King <i>et al.</i> (2001)	FBN (<i>B. japonicum</i> / soja RR)	Campo e CV (solo)/EUA	a) 3,36 kg/ha (21 μ M) b) 8,4 kg/ha (55,2 μ M) c) 1,68 kg/ha (10,5 μ M)	a) 1ª avaliação: Sem efeito no n.º de nódulos, porém houve diminuição de 34% no peso dos nódulos; b) 2ª avaliação: Aumento no n.º e diminuição no peso de nódulos (massa igual); c) Efeito deletério temporário na N-ase, maior em condição de déficit hídrico do que com glifosato.

DR = Dose recomendada para aplicações de campo

A maioria das avaliações dos impactos do glifosato na microbiota do solo se processou de forma indireta, como estudos da biomassa, respiração, atividade metabólica e enzimática dos organismos, bem como por estudos do comportamento de microrganismos heterotróficos. Essas avaliações, apesar de não específicas, são de extrema importância para o entendimento dos riscos advindo do uso do glifosato.

Utilizando meio de cultura como substrato para estes estudos, Quinn *et al.* (1988) avaliaram o crescimento de populações microbianas, isoladas de um solo que possuía uma parte com histórico de aplicação de glifosato e outra não, em meio de cultura adicionado de doses do herbicida que variaram de 0,25 a 10 mM, e constataram um efeito inibitório no crescimento microbiano com o aumento da dosagem. A presença de 3,5 mM de glifosato foi suficiente para inibir 50% da taxa de crescimento da população microbiana isolada de área sem aplicação prévia do herbicida. Em contrapartida, a taxa de crescimento da população isolada de local em que foi aplicado o glifosato foi inibida em 40%, na presença de 8 mM do produto, evidenciando, assim, uma maior tolerância, ao glifosato, dos microrganismos isolados da área com histórico de aplicação do glifosato. Busse *et al.* (2001), trabalhando com doses mais elevadas nos meios, 0; 25; 50 e 500 mM para bactérias e 0 e 50 mM para fungos, e com microrganismos isolados de três locais de floresta de pinheiros (*Pinus ponderosa*) livre do glifosato, também observaram sensível diminuição na população bacteriana e fúngica, já para as menores doses, e variando de acordo com o local de isolamento, constataram ainda, uma maior sensibilidade dos fungos ao herbicida em relação às bactérias. Para estas, a adição de 25 e 50 mM de glifosato proporcionou elevada diminuição na taxa de crescimento e na diversidade metabólica.



Estudos com aplicação do glifosato ao solo, visando avaliar o impacto na microbiota heterotrófica, também foram desenvolvidos por diversos autores. Roslycky (1982), aplicando dosagens do herbicida que variaram de 1 a 1000 $\mu\text{g/g}$ para avaliações de contagem e 1 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ para a avaliação de respiração, em um solo livre de pesticidas, observou um elevado incremento no crescimento de bactérias e actinomicetos em condição de elevadas dosagens do glifosato (500 e 1000 $\mu\text{g/g}$). No entanto estes efeitos foram temporários, sendo detectados até o 14º dia, a partir do qual foram observadas pequenas alterações nas populações em função das doses aplicadas. Para estas mesmas dosagens os fungos apresentaram somente um inicial e pequeno incremento populacional, não sendo detectado após o 28º dia. Ao contrário, para avaliações da respiração foi observada uma elevada inibição na aquisição do O_2 nas maiores concentrações para bactérias e actinomicetos. Os fungos mostraram-se mais insensíveis ao aumento das doses. Para doses de 1 e 5 $\mu\text{g/mL}$ de glifosato, pequenos efeitos na respiração total dos microrganismos foram observados. Resultados semelhantes foram encontrados por Wardle & Parkinson (1990b), os quais, para aplicações de glifosato ao solo nas doses de 0, 2, 20 e 200 $\mu\text{g/g}$, não observaram efeito significativo no número total de propágulos fúngicos e de actinomicetos. Para bactérias, constatou-se um efeito significativo estimulante até o terceiro e nono dias, para as concentrações de 20 e 200 $\mu\text{g/g}$ do herbicida, respectivamente. Contrariamente a esses resultados, Araújo *et al.* (2003), aplicando 2,16 mg/kg de glifosato em amostras de dois tipos de solos brasileiros, coletados em áreas com histórico de aplicação de glifosato e em áreas sem este histórico, observaram, após 32 dias, um aumento no número de fungos e actinomicetos, enquanto as bactérias foram praticamente insensíveis ao glifosato.

Wardle & Parkinson (1990a), utilizando as mesmas doses de 0, 2, 20 e 200 $\mu\text{g/g}$ do herbicida, somente observaram um aumento na respiração basal e na

induzida por glucose, de uma comunidade microbiana presente em um solo agrícola de elevado teor de matéria orgânica, na maior dose e por um período até o 3º dia após a exposição ao químico, sugerindo uma atuação do herbicida como uma fonte de energia ou auxiliando a utilização de outras fontes como co-metabólitos no aumento da biomassa. Em contrapartida, Haney *et al.* (2000), utilizando dosagens crescentes do herbicida (47; 94; 140 e 234 µg/g do sal de isopropilamina [Glifosato]) aplicadas ao solo, observaram significante estímulo na atividade microbiana do solo, medida pela mineralização do “C” e do “N”, em função do aumento das doses, sem no entanto constatar alterações na biomassa microbiana.

Para doses relativas às recomendadas para aplicações de campo, Gorlach-Lira *et al.* (1997), em estudo de contagem em meio de cultura de grupos de microrganismos isolados, de duas profundidades diferentes de um solo florestal na Polônia, observaram um comportamento inibitório ou estimulante de acordo com as doses aplicadas (1 e 4 ppm [5,9 e 23,7 µM]) de glifosato e o tipo de solo amostrado (orgânico e arenoso), para bactérias, actinomicetos e microrganismos quitinolíticos e celulolíticos. Os fungos não sofreram grandes alterações quando comparados ao controle sem aplicação do químico e demais microrganismos. Também para dose relativa à recomendada (4 kg/ha do i.a.), Wardle & Parkinson (1991) avaliaram alguns parâmetros microbiológicos caracterizados como indicadores. Em todos os parâmetros (Respiração Basal (RB), Respiração por Indução de Substrato (RIS), razão entre estes parâmetros (RB:RIS) e respiração na presença de streptomina e actidione) foi observado comportamento estatisticamente semelhante entre o tratamento com aplicação de glifosato e a testemunha, a qual não sofreu aplicação de químico, evidenciando, assim, um baixo efeito deletério da molécula. Contrariando estas observações, Souza *et al.* (1996), utilizando amostras de três solos brasileiros provenientes de áreas de

reflorestamento com eucalipto, observaram um incremento na atividade microbiana, medido pela emissão de CO₂, em função da aplicação de 3 L/ha de glifosato no solo. Também para dose recomendada (50 mM), Busse *et al.* (2001) não observaram efeito do glifosato na respiração microbiana do solo, a qual foi estimulada nas maiores dosagens (500 e 5000 mg/kg). Os autores ainda avaliaram os efeitos indiretos da aplicação continuada de glifosato por 9-13 anos nos microrganismos do solo. Não foi observado efeito na respiração basal, no quociente metabólico, no número total de bactérias e na mineralização do “N”. A biomassa microbiana e a razão C-microbiano/C-total apresentaram inconsistência sazonal, com declínio após a aplicação dos tratamentos com herbicida. Segundo os autores, os efeitos da aplicação continuada do glifosato no tamanho e atividade da população microbiana foram menores, quando comparados com os efeitos médios proporcionados pelas variações sazonais e locais de amostragens dos solos. Recentemente, Araújo *et al.* (2003), trabalhando com materiais conforme relatado acima, observaram, após 32 dias, uma maior evolução de CO₂ nas amostras dos solos com histórico de aplicações do glifosato, em relação às amostras do solo sem este histórico, evidenciando uma maior atividade microbiana no primeiro sistema. Quando foram aplicados 2,16 mg do herbicida por kg de solo, observou-se ainda uma evolução de CO₂ 10 a 15% maior nos solos com histórico de aplicação do herbicida do que naqueles sem histórico do glifosato. Assim, constatou-se uma ação estimulante do químico na atividade microbiana a curto (aplicação de 2,16 mg de glifosato por kg de solo) e em longo prazos (solos com histórico de aplicação do herbicida).

Apesar dos diferentes resultados obtidos pelos diversos autores, para o crescimento de microrganismos heterotróficos, pode-se observar uma maior inibição do crescimento microbiano para experimentos realizados com a adição do glifosato em meio de cultura, quando comparado com aplicações no solo,

inclusive com favorecimento temporário do crescimento, para este último sistema, tanto para doses referentes a aplicações de campo quanto para concentrações elevadas do químico. Observa-se também, de modo geral, uma maior sensibilidade ao glifosato das bactérias em relação aos fungos, apesar da constatação de resultados contrários. Para respiração, são mais freqüentes resultados que demonstram um estímulo da mesma, independentemente da dose aplicada.

Para grupos específicos de microrganismos, como as bactérias de vida livre fixadoras de nitrogênio, as variações nos resultados aparecem principalmente em função das diferentes espécies estudadas. Haahtela *et al.* (1988) observaram um comportamento estimulante ou inibitório na atividade da nitrogenase e no crescimento bacteriano, de acordo com a espécie de bactéria cultivada (*Azospirillum lipoferum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans* e *Pseudomonas* sp.) e os meios de cultura testados, adicionados de 5, 25 e 100 mg/L, tanto do produto comercial (Roundup) quanto do princípio ativo (glifosato). Respostas diferenciadas também foram observadas por Santos & Flores (1995) no crescimento e na atividade respiratória de duas espécies de bactérias diazotróficas, *Azotobacter vinelandii* e *A. chroococcum*, crescidas em meio de cultura Burk modificado, acrescido de glifosato nas taxas de 4 a 28 kg/ha. Segundo os autores, o glifosato foi o responsável pela inibição na fixação de nitrogênio, a qual alcançou 96% para *A. chroococcum* na dose de 28 kg/ha e 80 % para *A. vinelandii* na dose de 20 kg/ha, além da inibição de 60% na respiração dessas espécies para estas mesmas dosagens, respectivamente. No entanto, para a dose recomendada para aplicações de campo (4 kg/ha), observou-se comportamento normal das espécies. Foram constatadas, ainda, alterações morfológicas nas células, como a diminuição do tamanho e a presença de cistos no seu interior, para as maiores dosagens testadas do herbicida.

Paralelamente aos estudos de impacto da aplicação do glifosato sobre a atividade e sobrevivência das populações microbianas do solo, algumas pesquisas foram realizadas visando avaliar o efeito do herbicida sobre populações microbianas específicas, que realizam associações simbióticas com plantas, principalmente a soja, em virtude dos conhecidos benefícios econômicos e ecológicos advindos da fixação biológica do nitrogênio atmosférico, por bactérias formadoras de nódulos, e das vantagens nutritivas e adaptativas proporcionadas pela colonização radicular por fungos micorrízicos arbusculares.

Liu *et al.* (1991) observaram a habilidade de algumas espécies da família Rhizobiaceae em crescer e degradar a molécula do glifosato quando este foi adicionado em meio de cultura nas concentrações de 0,05 e 1 mM, apesar de se detectar um retardamento no crescimento, em meio de cultura, da estirpe RM1021 de *R. meliloti*, na presença de 1 mM de glifosato. Esses resultados são particularmente importantes diante da ação de espécies de membros desta família em fixar biologicamente o nitrogênio atmosférico, principalmente as leguminosas de interesse comercial, como a soja e o feijão, as quais são intensamente manejadas com herbicidas à base de glifosato.

O crescimento e a sobrevivência de organismos do grupo rizóbio, conhecidos por nodularem espécies leguminosas, foram avaliados em diversos trabalhos, sendo encontrados resultados divergentes, de acordo com as doses do herbicida aplicadas, as espécies estudadas e a condição experimental imposta.

Assim, Faizah *et al.* (1980), estudando o efeito de diversos pesticidas adicionados em meio líquido na taxa de 12,1 g/L (71 mM) sobre 11 isolados de rizóbio, observaram uma inibição mediana do glifosato no crescimento destes, quando comparado com os demais pesticidas testados. Já para avaliação de sobrevivência de 3 isolados de rizóbio, originários da Malásia, África e Austrália, crescidos em meio de cultura adicionado de 0; 3; 6 e 30 g/L, não foi observada

diferença entre os tratamentos em relação ao número de rizóbios viáveis, 24 horas após a adição do herbicida. Mallik & Tesfai (1983), utilizando dosagens menores (5 a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [29,6 a 1479,2 μM]) em meio de cultura YMB, não constataram o efeito do glifosato no número de colônias formadas, após 40 horas de cultivo, para a estirpe 3I1b110 (EUA) de *Rhizobium japonicum* (*B. japonicum*). A sobrevivência da estirpe nas duas maiores dosagens (50 e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) não foi determinada. Esses resultados foram ainda corroborados por Moorman (1986), o qual não observou redução significativa na taxa de crescimento das estirpes 138ES e 110SK de *Rhizobium japonicum* cultivadas em meio de cultura (YMA) com até 20 mg/L (118,3 μM) de glifosato. No entanto, Eberbach & Douglas (1989), aplicando concentrações semelhantes (0; 2; 5; 10 e 20 $\text{mg ia}/\text{L}$ – [11,8 a 118,3]) ao meio de cultura, observaram significativa redução no crescimento de *Rhizobium trifolii* TA1 a partir da dose 10 $\text{mg ia}/\text{L}$ (59,15 μM), ou seja, 8,5 e 17 vezes a concentração recomendada para aplicações de campo, considerando esta igual a 7 μM . Foi constatado também que o glifosato, na concentração acima do nível crítico (59,15 μM), pode agir como prolongador da fase ‘lag’ da curva de crescimento da bactéria.

Em estudo mais detalhado, avaliando o metabolismo de três estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* em meio YMA acrescido de 0,5 e 1 mM do sal de isopropilamina [GLIFOSATO], Moorman *et al.* (1992) observaram uma inibição no crescimento que variou de 10 a 47%, em função das estirpes e das concentrações estudadas. Em outro experimento, a adição dos aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina não reverteu os efeitos do glifosato no crescimento da estirpe 138 de *B. japonicum*. Houve, no entanto, uma inibição de 23% no crescimento desta estirpe quando se adicionaram os aminoácidos em meio de cultura livre do herbicida. Intensidades de inibição diferenciadas, no crescimento de 3 estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, 2 de *R.*

meliloti e 2 de *R. loti*, foram também observadas por Martensson (1992), em função da aplicação das doses 10 e 100 mg/L (59,1 e 591,6 µM) de glifosato ao meio de cultura. Jacques *et al.* (2002), trabalhando com doses crescentes em meio de cultura YMA, observaram uma redução média de 27, 34, 44 e 58% no crescimento de 3 estirpes brasileiras de *Bradyrhizobium* sp. (BR 29, BR 85 e BR 96), nas respectivas concentrações de 26, 52, 104 e 208 µM, as quais apresentaram tolerância ao herbicida na seguinte ordem: BR 85 > BR 29 > BR 96. No entanto, Jacques *et al.* (2002), em estudo com oito formulações, avaliadas em dose fixa de 42,2 µM do ingrediente ativo adicionado ao meio de cultura YMA, observaram uma redução no crescimento das mesmas estirpes de *Bradyrhizobium* sp. (BR 29, BR 85 e BR 96), mas com sensibilidade diferente do constatado anteriormente, ou seja, apresentando tolerância ao ingrediente ativo na seguinte ordem: BR 96 = BR 85 > BR 29, demonstrando uma especificidade de comportamento de cada estirpe para uma determinada concentração da molécula no meio.

Trabalhando com aplicações do glifosato no solo, Moorman (1986) observou uma inibição e um aumento na sobrevivência da estirpe 138ES, respectivamente para as doses 2 e 20 mg/Kg (11,8 e 118,3 µM) do herbicida, 7 dias após a aplicação do glifosato, efeitos estes que não se confirmaram nas avaliações posteriores (14 e 21 dias). A sobrevivência da estirpe 110SK não foi alterada pelo herbicida. O autor ainda ressalta que as reduções na sobrevivência das bactérias foram comparáveis às reduções impostas pelos estresses ambientais simulados (déficit e excesso de água no solo), indicando que o herbicida utilizado na dosagem recomendada proporciona pequeno efeito na sobrevivência de *R. japonicum* (*B. japonicum*) no solo.

Pode-se observar, pelos resultados obtidos dos diversos autores citados, que somente doses de glifosato adicionadas aos meios acima das concentrações

recomendadas para aplicações de campo proporcionaram redução no crescimento de espécies de rizóbio. Para o glifosato adicionado ao solo, a inconsistência dos dados obtidos por Moorman (1986) indicam a maior heterogeneidade do sistema, ressaltando a possível participação de outros componentes do solo na tolerância das espécies bacterianas ao glifosato.

Parâmetros como o número e peso de nódulos e atividade da enzima nitrogenase também são constantemente avaliados pela pesquisa com o intuito de se obter uma resposta do impacto do glifosato na efetivação do processo simbiótico, sendo, neste caso, encontradas respostas menos divergentes, com uma constante redução na nodulação e atividade da nitrogenase, em função da aplicação de doses crescentes do herbicida.

Eberbach & Douglas (1989), aplicando concentrações de 0; 2; 5; 10 e 20 mg ia/L (11,8 a 118,3 μ M) de glifosato em meio de cultura, observaram um decréscimo linear no número de nódulos em plantas de trevo crescidas no meio artificial, de acordo com o aumento das doses. Em outra avaliação, o inóculo de *R. trifolii* TA1 lavado uma ou várias vezes em solução salina, após crescimento em meio de cultura acrescido de glifosato, nas suas várias concentrações, mostrou um decréscimo na habilidade de nodular plantas de trevo. Com base na curva de regressão obtida a partir dos dados de números de nódulos formados, a dose mínima necessária para a total inibição destes foi de 24,5 mg/L, ou seja, aproximadamente 21 vezes a concentração recomendada para aplicações de campo. Martensson (1992), trabalhando com doses de 10; 40 e 60 mg/L (59,1 a 354,9 μ M) de glifosato em meio de cultura, observou uma diminuição da nodulação e uma menor deformação, induzida pela estirpe RTA de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, do pêlo radicular de trevo vermelho (*Trifolium pratense* cv. Britta) somente na condição de maior dosagem e quando o químico foi aplicado 4 dias após a inoculação. A produção de matéria seca das plantas foi

afetada pelo aumento das concentrações do químico no meio, independentemente da época de aplicação do glifosato ao meio.

Já para estudo em condição de solo, desenvolvido em casa de vegetação, Mallik & Tesfai (1985) observaram significativa redução no número e peso dos nódulos, bem como a atividade da nitrogenase de plantas de soja inoculadas com a estirpe 3IIb110 (EUA) de *R. japonicum* (*B. japonicum*), em função da aplicação de 1,12 e 5,6 kg/ha (7 e 35 μM) de glifosato, a qual ocorreu 17 dias após o plantio.

Com o desenvolvimento e utilização, em algumas partes do mundo, da soja geneticamente modificada para resistência ao glifosato (Soja RR), tornou-se elementar a investigação das conseqüências do uso desta tecnologia, associada à pulverização do herbicida, no que se refere aos possíveis impactos na inter-relação microrganismos/planta e à possível carga adicional do glifosato no solo, em função do aumento da freqüência do seu uso. No entanto, poucos trabalhos foram publicados referentes ao assunto até o momento. À exceção, King *et al.* (2001) realizaram dois plantios seqüenciais da soja, os quais receberam aplicações do herbicida na taxa de 1,68 kg i.a./ha (10,5 μM) para cada aplicação, sendo que estas ocorreram no 5º e 10º dias para a primeira avaliação, realizada 19 dias após a emergência (DAE), e no 5º, 10º, 18º, 25º e 32º dia para a segunda avaliação, feita aos 40 DAE. Na primeira avaliação não houve diferença no número de nódulos por plantas, no entanto o peso total dos nódulos diminuiu 34%. Na segunda avaliação houve um aumento no número de nódulos com a aplicação do herbicida, mas também uma diminuição no peso dos mesmos, resultando numa massa total dos nódulos semelhante entre os tratamentos. Maior sensibilidade foi observada para a atividade da nitrogenase quando as plantas, com ou sem aplicação do glifosato, foram submetidas a um déficit hídrico.

Os estudos envolvendo fungos micorrízicos simbiotes e os impactos do glifosato no seu desenvolvimento isolado ou em associação, tanto “in vitro” como “in vivo”, também não são muito frequentes.

Morandi (1989) sugere que o uso de agroquímicos pode modificar significativamente o estado fisiológico do sistema radicular de uma planta e na sua interação com fungos micorrízicos arbusculares. Assim, estudando a aplicação de 5 µg do i.a./mL (2,9 µM) do glifosato por planta de soja, previamente inoculada com *Bradyrhizobium japonicum* (G49 USDA) e *Glomus mosseae*, o autor observou redução no crescimento da planta, mas também um aumento significativo nos níveis de infecção do FMA. Chakravarty & Chatarpaul (1990), investigando os efeitos do glifosato, aplicado nas doses de 0,54 e 3,23 kg/ha (3,1 e 18,6 µM), no desenvolvimento ectomicorrízico de *Paxillus involutus* em *Pinus resinosa*, observaram que, após dois meses de crescimento da planta em solo contaminado, tanto em condição de casa de vegetação como de campo, o desenvolvimento da simbiose não foi afetado, em nenhuma das doses testadas, sendo observada ainda uma elevada taxa, tanto para a colonização espontânea em condição de campo, variando de 74 a 86%, quanto em condição de inoculação em casa-de-vegetação e campo, quando a colonização foi de aproximadamente 99% em todas as concentrações do herbicida.

Posteriormente, Beyrle *et al.* (1995) avaliaram o crescimento de *Rhizoctonia* sp. “in vitro”, na presença de 0,5 e 1,0 mM de glifosato, e após 10 dias não observaram efeito significativo do herbicida em nenhuma dose. Já para a avaliação da interação entre o fungo e protocormos de orquídea (*Orchis morio*), a adição de 1 mM ao meio resultou em falha na iniciação da micorrização.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo constou de experimentos em meio de cultura no laboratório e com solo em casa-de-vegetação, como descritos a seguir:

3.1 Experimentos de laboratório

Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Ciência do Solo da UFLA, no período de fevereiro a agosto de 2003, visando avaliar o desempenho de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. em meio de cultura 79 (Fred & Waksman, 1928), e de espécies de fungos micorrízicos arbusculares em ágar-água, ambos contendo concentrações crescentes de Roundup®.

3.1.1 *Bradyrhizobium elkanii* e *B. japonicum*

Foram conduzidos dois experimentos visando avaliar os efeitos de concentrações crescentes de Roundup® no crescimento “in vitro” das bactérias. No primeiro experimento foi estudado o crescimento de quatro estirpes de *Bradyrhizobium* spp., sendo: a) BR 29 (= 29W) (*B. elkanii*); b) BR 86 (= SEMIA 5080 = CPAC 7)(*B. japonicum*), recomendadas pela RELARE como inoculantes para a cultura da soja; c) INPA 80 A (*B. elkanii*) e d) INPA 553A (*B. elkanii*), isoladas de solos da região amazônica e existentes no banco de germoplasma do DCS/UFLA. Utilizou-se o meio líquido 79 (Anexo 1), adicionado de 29, 58, 112 e 213 $\mu\text{moles L}^{-1}$ do equivalente ácido de N-(fosfometil) glicina (GLIFOSATO), o princípio ativo que constitui 360 g/L (36% m/v) do herbicida Roundup®; além de um tratamento controle, sem a adição

do herbicida ao meio de cultura. As dosagens do herbicida adicionadas ao meio de cultura foram definidas em função dos resultados observados por Jacques *et al.* (2002), que, utilizando doses de 0; 26; 52; 104 e 208 $\mu\text{moles L}^{-1}$, observaram redução no crescimento de três estirpes de *Bradyrhizobium* spp. avaliadas, já na menor concentração do herbicida. Os tratamentos foram dispostos em fatorial 4 x 5, sendo 4 estirpes e 5 doses, totalizando 20 tratamentos dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições por tratamento. Um controle experimental, para verificações de possíveis contaminantes e condição inicial do meio de cultura, foi adicionado ao experimento; em 2 erlenmeyers de cada condição de concentração do herbicida, incluindo a testemunha, não foram realizadas inoculações microbiana.

A preparação dos meios contendo o Roundup® foi realizada a partir da filtração do herbicida em filtro-esterilizador (Milipore®) de 47 mm de diâmetro e 0,46 μm de porosidade. Deste filtrado, 1 mL foi diluído em 1000 mL de água autoclavada para a formação de uma solução estoque de concentração 2130 μM de glifosato, com base na concentração inicial do equivalente ácido de N-(fosfometil) glicina, que é de 2,13 M (P.M. da molécula de glifosato = 169,1 e 360 g/L do equivalente ácido na composição do herbicida). Desta solução estoque, 1, 2, 4 e 8 mL foram adicionados à 72 mL de meio 79 autoclavado, distribuídos em erlenmeyers de 150 mL, para se alcançarem as concentrações desejadas de 29, 58, 112 e 213 $\mu\text{moles L}^{-1}$, respectivamente, do químico no meio. O tratamento testemunha foi constituído de 72 mL de meio, sem adição do herbicida.

As estirpes foram inicialmente crescidas em placas de Petri contendo meio 79 sólido autoclavado (120° C por 20 minutos) e, após 7 dias de crescimento, transferidas para erlenmeyers com capacidade para 125 mL, contendo 75 mL de meio 79 líquido estéril para a constituição do inóculo inicial.

Foram utilizados dois erlenmeyers para cada estirpe, os quais ficaram sob agitação orbital constante a 110 rpm e 28° C por seis dias.

Após o período de crescimento, 1 mL do inóculo inicial de cada estirpe foi adicionado aos meios com os tratamentos, e todos os frascos, incluindo os tratamentos de referência (sem inoculação), foram colocados sob agitação orbital constante a 110 rpm e temperatura ambiente média de 28° C. No momento da inoculação dos meios, foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada um dos inóculos iniciais para a realização de diluições seriadas e posterior contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Para isto, a alíquota foi colocada em um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução fisiológica (NaCl 0,55%), previamente autoclavada, e agitada por 10 segundos em vórtex, originando uma solução com concentração de diluição 10^{-1} . Posteriormente, retirou-se 1 mL da solução 10^{-1} , o qual foi colocado em outro tubo, com 9 mL, seguindo o procedimento citado acima, originando a diluição 10^{-2} . Este processo foi realizado sucessivamente até a obtenção da diluição 10^{-9} . Em seguida, foram retiradas alíquotas de 0,02 mL das diluições 10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6} ; 10^{-7} ; 10^{-8} e 10^{-9} , as quais foram colocadas em placas de Petri contendo meio 79 sólido e divididas previamente em seis setores, utilizando um setor da placa por diluição. Este procedimento foi realizado em número de três repetições. Após a inoculação e secagem da alíquota, as placas foram colocadas invertidas em uma câmara de crescimento a 28 °C pelo período de sete dias, quando então foi efetuada a contagem das UFC da diluição que apresentou de 6 a 50 UFC por gota de 0,02 mL, conforme metodologia descrita por Miles & Misra (1938).

Após 120, 168 e 240 horas sob agitação, alíquotas de 5 mL foram retiradas de cada erlenmeyer para determinação de densidade ótica, utilizando um espectrofotômetro marca Hitachi, modelo U-2001 UV/Vis, sendo as leituras feitas

a 560 nm de absorvância e considerando padrão "0", determinado em água destilada.

Todos os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de média (Tukey) a 5% de probabilidade pelo programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000) e foram calculadas equações de regressão linear para o crescimento da população bacteriana em função das doses crescentes de glifosato.

Em função da baixa variação observada no crescimento das estirpes entre o tratamento testemunha e a menor dose do herbicida aplicada ($29 \mu\text{moles L}^{-1}$), optou-se pela realização de um segundo experimento, em que foi retirado o tratamento de menor dose e incluído um tratamento de dose elevada, constituído pelo dobro da maior dosagem testada na primeira avaliação, definindo os 5 tratamentos de doses, a saber: 0; 58; 114; 230 e $454 \mu\text{moles L}^{-1}$ de glifosato. Foram avaliadas as mesmas 4 estirpes do experimento anterior, totalizando 20 tratamentos, também dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições por tratamento. O meio de cultura e o controle experimental (frascos sem inoculação microbiana) foram utilizados conforme descrito no experimento 1.

Para a preparação do tratamento com elevada dose do herbicida no meio ($454 \mu\text{M}$), diferentemente da metodologia utilizada no primeiro experimento, decidiu-se utilizar duas soluções estoque com o intuito de não alterar demasiadamente o volume final do meio deste tratamento.

A preparação do inóculo inicial, bem como sua inoculação nos meios, o procedimento para a contagem das UFC, a metodologia de avaliação, as condições ambientais impostas e os procedimentos estatísticos para avaliação dos resultados foram realizados de forma semelhante ao descrito para o primeiro experimento, diferindo somente na época de avaliação da densidade ótica das culturas, que foram realizadas 72 e 216 horas após a inoculação dos meios, em

função da rápida multiplicação das células bacterianas (tempo de geração), exigindo uma avaliação em intervalos menores. Como não se objetivou criar uma curva resposta do crescimento bacteriano em função do tempo de exposição ao herbicida, decidiu-se pela realização de somente duas épocas de avaliação, uma no início e outra no final do experimento.

3.1.2 Fungos micorrízicos arbusculares “in vitro”

Os efeitos da adição de Roundup® na germinação de esporos e crescimento micelial de FMAs foram avaliados em meio ágar-água (2%) acrescido de concentrações crescentes do herbicida.

Em função da ausência de trabalhos referência, as dosagens de glifosato adicionadas ao ágar-água foram as mesmas daquelas adotadas para os experimentos com bactérias. Assim, avaliou-se, em ensaios separados, a germinação de esporos de *Gigaspora margarita*, *Glomus etunicatum* e *Scutellospora heterogama*, em aproximadamente 20 mL de ágar-água 1 % adicionado de Roundup®, vertido em placas de Petri, nas concentrações 25,6; 51; 102; 204,5 e 409 $\mu\text{moles L}^{-1}$ do equivalente ácido de N-(fosfonometil) glicina (GLIFOSATO) por placa. Foi utilizado, como testemunha, um tratamento sem a adição do químico ao meio de cultura, totalizando 6 tratamentos de doses para cada espécie fúngica estudada, com 4 repetições por tratamento.

A preparação dos substratos de ágar-água contendo o glifosato foi realizada a partir da obtenção de duas soluções estoques. À primeira foram adicionados 3 mL do herbicida filtro-esterelizado, conforme descrito anteriormente, em 500 mL de água autoclavada, proporcionando uma solução de concentração 12780 μM do princípio ativo. Desta solução, 1, 2 e 4 mL foram adicionados a 500 mL de ágar-água 1% autoclavado, momentos antes de se verter

o substrato nas placas, alcançando as concentrações desejadas de 25,6; 51 e 102 $\mu\text{moles L}^{-1}$, respectivamente. Para a segunda solução estoque, foram adicionados, a 125 mL de água, 3 mL de Roundup[®], resultando em uma solução de 51120 μM do princípio ativo, da qual 2 e 4 mL foram retirados e adicionados a 500 mL de ágar-água autoclavado, proporcionando a concentração de 204,5 e 409 μM do princípio ativo nas placas, respectivamente. O tratamento testemunha foi constituído de aproximadamente 20 mL de ágar-água 1% por placa, sem adição do herbicida.

Os esporos dos FMA foram extraídos do solo dos vasos de cultivo da coleção de FMAs do DCS/UFLA através do peneiramento via úmida e centrifugação em solução de sacarose (Gerdemann & Nicolson, 1963). Com o auxílio de uma lupa com aumento de 40 vezes foram selecionados, quanto ao aspecto morfológico, aproximadamente 500 esporos por espécie. Após lavagens sequenciais em água estéril, em capela de fluxo laminar horizontal, os esporos foram transferidos para placa de Petri (50 mm de diâmetro) previamente autoclavada, com duas folhas de papel de filtro no seu interior, para a drenagem do excesso de água. Toda a transferência dos esporos foi realizada utilizando uma micropipeta e ponteiros estéreis. No interior da capela foi instalada uma lupa, a qual foi desinfetada com álcool 70%, para possibilitar a captura dos esporos e sua transferência para as placas contendo o ágar-água. Utilizando uma alça de ponta fina foram colocados 10 esporos por placa, caracterizando as unidades experimentais, selecionando-se aqueles que apresentavam integridade na sua estrutura. Em seguida as placas foram vedadas com filme plástico, evitando, assim, a desidratação excessiva, envolvidas em papel alumínio e incubadas em sala de crescimento a aproximadamente 28° C por 15 dias, quando se procedeu a avaliação da porcentagem de germinação e crescimento do tubo germinativo dos esporos. Na avaliação empregou-se microscópio estereoscópico em ampliação,

que variou de 5 a 40 vezes. Foram considerados germinados os esporos com um ou mais tubos germinativos e a germinação foi calculada em porcentagem em função do número total de esporos em cada placa. O crescimento do tubo germinativo foi avaliado utilizando um sistema de categorias de crescimento, atribuindo-se valores de 0 a 4, sendo: 0 = sem crescimento; 1 = < 5 mm; 2 = 5 a 10 mm; 3 = 10 a 15 mm e 4 = > 15 mm, como empregado por Lambais & Cardoso (1989).

Os dados de porcentagem de germinação foram normalizados pela transformação arco seno ($\% \text{ germinação}/100$)^{1/2} e os de crescimento do tubo germinativo (CTG) pela transformação (CTG + 0,5)^{1/2}, sendo todos os dados submetidos à análise de variância e teste de média (Tukey) a 5% de probabilidade pelo programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000). Foram produzidas as equações de regressão linear para o crescimento do tubo germinativo e para a porcentagem de germinação dos esporos, em função das doses crescentes de glifosato.

3.2 Soja inoculada em solo com aplicação prévia de Roundup®

Realizou-se o experimento em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo (DCS) da Universidade Federal de Lavras – UFLA, no período de maio a julho de 2003, empregando-se a soja (*Glycine Max* Merrill) semeada em um Latossolo Vermelho distrófico (LVd), muito argiloso, coletado no bairro Jaguara, no município de Nazareno – MG, que após a calagem apresentou pH em água = 6,0; P e K (Mehlich 1) = 1,4 e 74 mg.dm⁻³, respectivamente; Ca²⁺ e Mg²⁺ (KCl 1 N) = 3,8 e 1,8 cmolc.dm⁻³, respectivamente; V = 75,3 % e M.O. (Na₂Cr₂O₇ 4N + H₂SO₄ 10 N) = 2,7 dag.kg⁻¹.

No estudo foi utilizada a cultivar “Doko” melhorada, plantada em solo que recebeu aplicação prévia de 5 doses do herbicida Roundup®. Como testemunha, um tratamento sem aplicação do Roundup® foi utilizado. Em todos os tratamentos foram inoculadas espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e da bactéria *Bradyrhizobium japonicum*, estirpe BR 29, recomendada pela RELARE como inoculante para a soja. O experimento foi ainda constituído de 2 tratamentos adicionais que não foram inoculados com microrganismos, permanecendo apenas a microbiota nativa, sendo ao primeiro adicionado uma dose do herbicida referente a 10 L. ha⁻¹ e o outro utilizado como controle, sem aplicação do químico, ambos com adubação nitrogenada adicional. Para cada tratamento, três épocas distintas de corte da planta foram feitas, proporcionando um fatorial 6 x 3, totalizando 18 tratamentos. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições para cada tratamento.

Os recipientes de cultivo foram preparados a partir de tubos de PVC de 10 cm de diâmetro e 25 cm de altura, revestidos internamente com sacos plásticos (conferindo um volume de 3,9 dm³), os quais foram preenchidos com 1,0 Kg de solo (não inoculado), aplicados nos dois terços inferiores dos vasos, mais 0,5 Kg de “solo inóculo”, aplicado no terço superior. Os vasos dos tratamentos que não foram inoculados receberam somente o solo não infestado.

Para a preparação do inóculo de fungos micorrízicos foram misturados três vasos de multiplicação de FMAs, pertencentes à coleção de FMAs do Departamento de Ciência do Solo – DCS/UFLA, os quais são mantidos em substrato composto por duas partes de um LVd e uma de areia de rio e cultivados com *Brachiaria brizantha*. Optou-se por utilizar, neste estudo, preferencialmente a espécie *Glomus etunicatum*, pelo seu histórico de elevada eficiência de colonização em raízes de soja (Silva Júnior & Siqueira, 1998). Desta forma, e

com base na densidade de esporos observada, selecionaram os seguintes vasos: 1) N° UFLA-05, com *G. etunicatum* (~ 600 esporos/50 mL); 2) N° UFLA-07, com *Gigaspora margarita* (~ 300 esporos/50 mL), *G. etunicatum* (~ 100 esporos/50 mL) e *G. occultum* (~ 50 esporos/50 mL); e 3) N° UFLA-62, com *G. etunicatum* (~ 200 esporos/50 mL) e *G. occultum* (resíduo). Após a homogeneização, o inóculo, contendo 40 esporos/mL, foi misturado com o solo experimental, obtendo-se uma densidade final de 4 esporos/mL de solo. Os esporos foram extraídos e contados conforme metodologia descrita por Gerdemann & Nicolson (1963).

As doses de Roundup® aplicadas ao solo foram preparadas a partir de uma solução estoque, em que 1 mL do herbicida foi diluído em 1000 mL de H₂O, e a partir desta solução, 20, 40, 80, 120 e 160 mL foram retirados e diluídos novamente em 1000 mL de H₂O. Destas soluções, 50 mL foram aplicados ao solo por vaso, representando, assim, as concentrações 1,25; 2,5; 5; 7,5 e 10 L ha⁻¹, respectivamente. Para os tratamentos que não receberam doses do herbicida, foram adicionados ao solo 50 mL de água autoclavada.

O inóculo de *B. japonicum* foi preparado de forma semelhante e sob as mesmas condições do experimento 1. Após 7 dias de crescimento, 0,2 mL da suspensão de células foi adicionado ao fundo de cada cova de semeadura, totalizando 1 mL de inóculo por vaso, conforme recomendação da RELARE, tendo em vista a semeadura de 5 sementes por vaso.

As sementes de soja foram inicialmente desinfestadas superficialmente por meio de imersão em solução de hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto e 30 segundos e posteriormente lavadas em água corrente. Foram semeadas cinco sementes por vaso, 10 dias após a aplicação do herbicida ao solo, e aos 13 dias após a emergência (DAE) foi realizado o desbaste, permanecendo uma planta por vaso.

Todos os tratamentos receberam, de forma parcelada aos 14, 21 e 28 DAE das plantas, 225 mg/vaso de K na forma de KH_2PO_4 e 375 mg/vaso de P, na forma de H_3PO_4 . Exclusivamente para os dois tratamentos que não receberam inoculação microbiana, foram fornecidos 300 mg/vaso de N, na fonte NH_4NO_3 , como adubação nitrogenada.

Aos 17, 31 e 45 DAE, as plantas foram cortadas rente ao solo, sendo as partes aéreas secas em estufa de circulação de ar a 60°C até peso constante, momento em que se determinaram as suas massas secas em balança de precisão. As raízes foram lavadas em água corrente e em seguida foi feito o destaque e a contagem do número de nódulos. Aproximadamente 1 g de raízes frescas, de cada planta, foi separado para ser corado, conforme Phillipis & Haymann (1970), e foi avaliada a porcentagem de colonização micorrízica, segundo Giovannetti & Mosse (1980). Foi ainda determinado o peso de raízes e nódulos secos das plantas, após secagem em estufa de fluxo de ar forçado.

Todos os dados foram submetidos à análise de variância e teste de média (Tukey) a 5% de probabilidade pelo programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000), sendo os resultados de colonização micorrízica transformados pelo arco seno $(\text{colonização}/100)^{1/2}$ e nodulação $(n^\circ \text{ de nódulos} + 0,5)^{1/2}$, respectivamente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeitos do Roundup® sobre *Bradyrhizobium* spp. "in vitro"

Em ambos experimentos, o inóculo inicial apresentou boa quantidade de unidades formadoras de colônia, sendo encontradas $11,45 \times 10^8$ UFC/mL para o primeiro experimento e $8,79 \times 10^8$ UFC/mL para o segundo.

Em todos os períodos avaliados, 120; 168 e 240 horas, foram observados efeitos significativos do glifosato no crescimento bacteriano, sendo estes efeitos diferenciados para concentração do herbicida e estirpe estudada (Tabela 2).

As estirpes BR 29 e INPA 553A apresentaram pequeno aumento e nenhuma inibição para as doses iniciais, já a BR 86 sofreu redução linear com 120 horas de crescimento (Figura 2a). Nesta época, o comportamento da curva de crescimento das estirpes BR 29 e INPA 553A, em função das doses crescentes, foram quadráticos, sendo os crescimentos máximos calculados pelas regressões, equivalentes a 89,47 e 86,21 μM , respectivamente, correspondendo a aproximadamente 12,8 e 12,3 vezes a dose experimental (DC) equivalente à concentração esperada no solo a campo (7 μM), estimada por Moorman, (1986), os quais consideraram uma pulverização de 1,12 Kg/ha e concentração de 1 mg de glifosato por Kg de solo com densidade 1,2 e profundidade alcançada pelo químico de 0-7 cm. Para as avaliações subseqüentes (168 e 240 horas), a estirpe BR 29 não apresentou efeito significativo no crescimento, para o aumento de doses, demonstrando insensibilidade ao químico. Já para a estirpe INPA 553A, nestas mesmas épocas de avaliação, o crescimento foi decrescido linearmente, de acordo com o aumento das doses, proporcionando 50 % de inibição do crescimento (DI_{50}) para as doses calculadas de 294,92 e 646,37 μM , respectivamente (Figuras 2b e c).

TABELA 2. Valores de densidade ótica (560 nm) realizadas após 120, 168 e 240 horas de crescimento bacteriano em meio 79 contendo concentrações crescentes de Roundup®

Estirpes	[] Glifosato (μ M)				
	0	29	58	112	213
----- 120 h -----					
BR 29	0,66 bB	0,87 aA	0,85 aA	0,84 aA	0,66 aB
BR 86	0,81 aA	0,71 bcAB	0,63 cBC	0,53 cC	0,38 cD
INPA 80A	0,70 bNS	0,75 bNS	0,76 abNS	0,74 abNS	0,68 aNS
INPA553A	0,62 bAB	0,64 cAB	0,66 bcAB	0,68 bA	0,56 bB
----- 168 h -----					
BR 29	1,29 bA	1,26 bA	1,25 bA	1,31 abA	1,16 abA
BR 86	2,96 aA	2,10 aB	1,27 bC	0,93 bCD	0,79 bD
INPA 80A	1,71 bAB	1,68 abAB	1,88 aA	1,64 aAB	1,26 aB
INPA553A	1,42 bA	1,39 bAB	1,41 bA	1,27 abAB	0,93 abB
----- 240 h -----					
BR 29	1,20 cA	1,08 dA	1,04 dA	1,16 cA	1,08 bA
BR 86	2,78 aA	2,78 aA	2,76 aA	1,14 cB	0,97 bB
INPA 80A	1,70 bBC	1,79 bBC	2,35 bA	1,92 aB	1,57 aC
INPA553A	1,48 bcAB	1,48 cAB	1,59 cA	1,47 bAB	1,32 bB

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si (Tukey a 5%). NS = Não significativa.

A estirpe BR 86 apresentou a maior sensibilidade ao glifosato, principalmente nas últimas avaliações, em que se observou uma redução linear do crescimento, em relação à testemunha, já nas primeiras dosagens do herbicida, com a DI_{50} de 210,26; 122,25 e 135,94 μM, respectivamente com 120, 168 e 240 horas de cultivo. No entanto, na última avaliação, a estirpe atingiu o máximo crescimento detectável pelo aparelho de leitura ótica, para as duas menores dosagens e para a testemunha, havendo posteriormente uma acentuada.

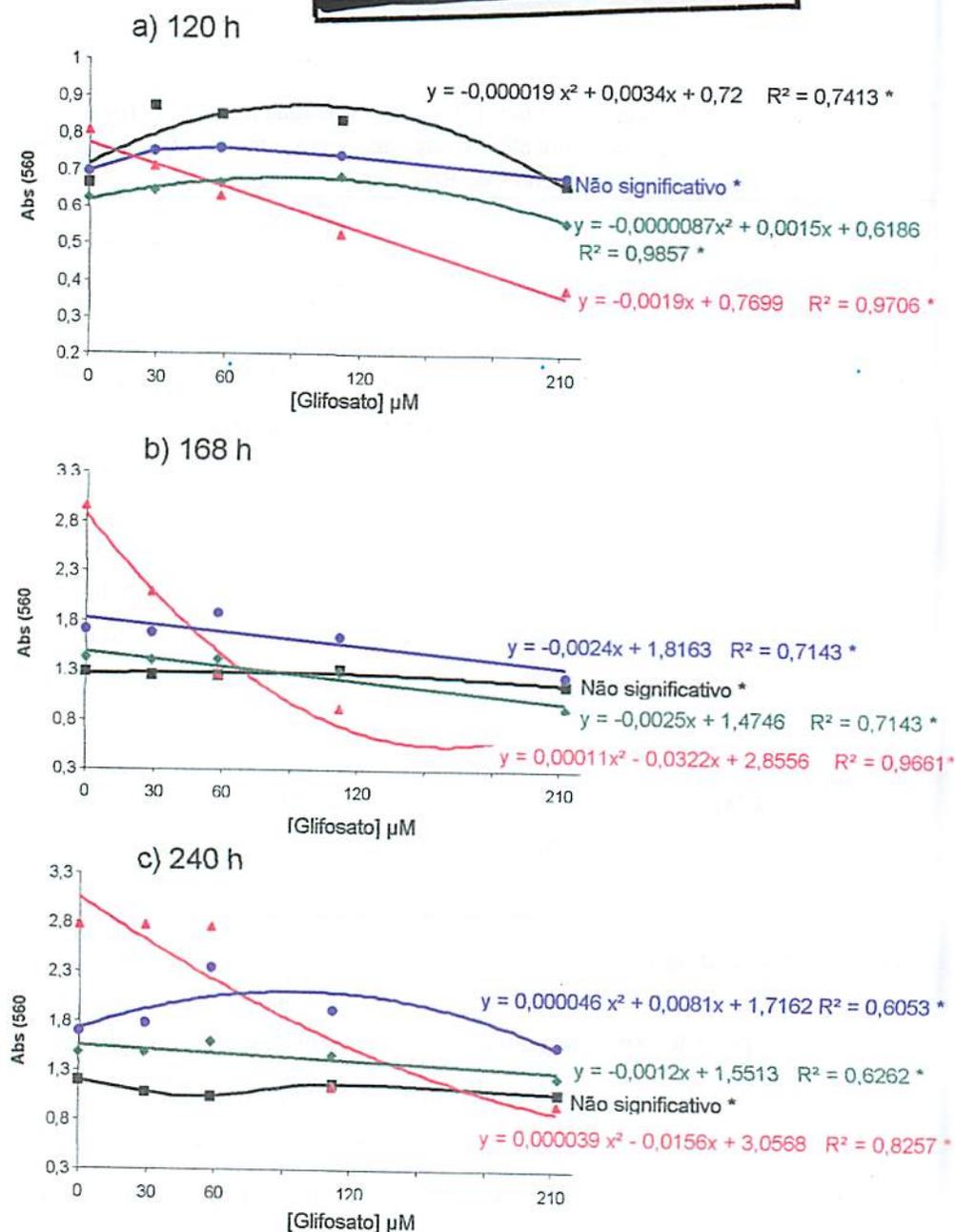


FIGURA 2. Evolução da densidade ótica das caldas bacterianas (■ BR 29; ▲ BR 86; ● INPA 80A; ◆ INPA 553A), com 120 (A), 168 (B) e 240 (C) horas de crescimento, em função do aumento da dosagem do glifosato no meio de cultura. (* = prob. 0,05).

diminuição para as maiores doses. Este fato pode ser explicado por um possível processo de “adaptação” da nova condição, em que as novas células geradas, seja por mutação ou expressão de genes crípticos, apresentaram maior capacidade de sobrevivência e replicação em baixas dosagens do herbicida.

De uma forma geral, a estirpe INPA 80A apresentou elevada estabilidade no crescimento, em todas as épocas de avaliação, não sofrendo influência das doses do herbicida aplicadas nas primeiras 120 horas. Para a segunda avaliação foi observado decréscimo linear significativo no crescimento, apresentando uma DI_{50} de 378,39 μM , demonstrando uma maior tolerância ao químico, quando comparada com a INPA 553A e BR 86. No último período de avaliação (240 horas), a curva de crescimento da estirpe, calculada pela análise de regressão, comportou-se de forma quadrática, sendo a dose estimada para o máximo crescimento referente a 88,04 μM , ou seja, 12,5 vezes a dose experimental (DC) equivalente à concentração esperada no solo a campo (7 μM).

Com o aumento da maior dosagem do herbicida no meio para 454 μM no segundo experimento, o crescimento bacteriano praticamente não existiu com essa dose, não sendo observada diferença entre as estirpes estudadas nos dois períodos de avaliação (Tabela 3).

Com a ampliação da variação entre as doses do Roundup® no meio (0 – 454 μM) e a retirada do tratamento de dose 28 μM aplicado no primeiro experimento, observou-se, de um modo geral, um desempenho semelhante entre as estirpes estudadas, sendo observado, após 72 horas, um decréscimo linear no crescimento de todas as estirpes, em função do aumento das dosagens do herbicida, para os quatro tratamentos bacterianos (Figura 3A). Em função da DI_{50} calculada a partir das equações de regressão, pode-se constatar sensibilidade diferenciada no crescimento entre as estirpes, decrescente na seguinte ordem: BR 86 > INPA 80A > INPA 553A > BR 29 (DI_{50} = 242,94; 247,27; 260,5 e 270,68

μM , respectivamente). Considerando aplicações na dose experimental equivalente à esperada a campo (DR), ou seja, aproximadamente $7 \mu\text{M}$, a inibição no crescimento, calculada pela equação de regressão, será de 1,3; 1,4; 1,3 e 1,5%, evidenciando um efeito inibitório do herbicida desprezível e semelhante entre as estirpes.

TABELA 3. Valores de densidade ótica (560 nm) realizadas após 72 e 216 horas de crescimento bacteriano em meio 79 contendo concentrações crescentes de Roundup®

Estirpes	[] Glifosato ($\mu\text{mol L}^{-1}$)				
	0	58	114	230	454
----- 72 h -----					
BR 29	0,84 bA	0,85 aA	0,71 aB	0,68 aB	0,09 aC
BR 86	1,01 aA	0,67 bB	0,49 cC	0,38 bC	0,12 aD
INPA 80A	0,68 cA	0,69 bA	0,60 abA	0,44 bB	0,05 aC
INPA553A	0,64 cA	0,62 bA	0,53 bcAB	0,42 bB	0,07 aC
----- 216 h -----					
BR 29	2,96 nsA	1,99 bB	1,39 bBC	1,72 aB	0,87 aC
BR 86	2,96 nsA	2,96 aA	1,37 bB	1,02 bBC	0,42 aC
INPA 80A	2,96 nsA	2,96 aA	2,68 aA	1,46 abB	0,39 aC
INPA553A	2,96 nsA	2,96 aA	2,13 aB	1,36 abC	0,51 aD

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si (Tukey a 5%). ns = Não significante.

Na segunda época de avaliação (216 horas), o comportamento no crescimento das estirpes INPA 80A e INPA 553A foi semelhante ao observado na primeira avaliação, ou seja, com decréscimo linear e sensibilidade semelhante entre elas ($DI_{50} = 254$ e $259,91 \mu\text{M}$, respectivamente). As estirpes BR 29 e BR 86, para esta segunda avaliação, mostraram decréscimo de crescimento quadrático, em função do aumento de doses, porém estas estirpes novamente apresentaram a menor e a maior sensibilidade ao glifosato com DI_{50}

de aproximadamente 293,75 e 209,38 $\mu\text{moles L}^{-1}$, respectivamente. Em dose experimental equivalente à concentração esperada a campo (DR = 7 μM), novamente não houve inibição para o crescimento das estirpes (Figura 3B).

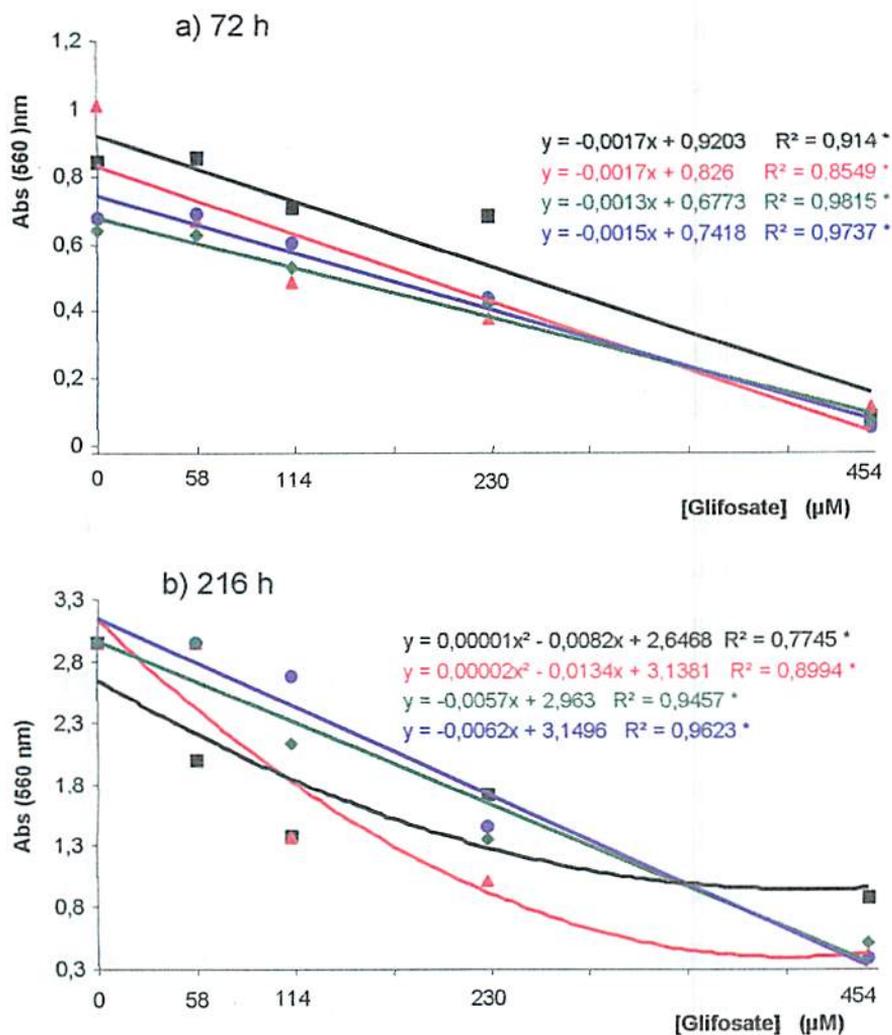


FIGURA 3. Evolução da densidade óptica das caldas bacterianas (■ BR 29; ▲ BR 86; ● INPA 80A; ◆ INPA 553A), com 72 (a) e 216 (b) horas de crescimento, em função do aumento da dosagem do glifosato no meio de cultura. (* = probabilidade de 0,05).

O bom desempenho das estirpes INPA 80A e INPA 553A, em ambos os experimentos, de certa forma não era esperado, pois em função das bactérias terem sido isoladas de solos da região amazônica, local onde é menor o convívio desses organismos com pesticidas como o Roundup[®], acreditava-se que, pela inexistência de um processo adaptativo das novas condições impostas, uma maior sensibilidade destas à molécula herbicida fosse ocorrer. Esta suposição é embasada em resultados obtidos por Quinn *et al.* (1988), que observaram 50% de inibição no crescimento de bactérias heterotróficas isoladas de local sem aplicação prévia do glifosato, quando submetidas à dosagem de 3,5 mM (3500 µM ou 591,5 mg/L) do herbicida. Para bactérias isoladas de local com aplicação do herbicida, a inibição de 40% só foi alcançada com 8 mM (8000 µM ou 1352,1 mg/L) do químico.

Pôde-se concluir que, ao final dos dois experimentos, o crescimento das bactérias em meio 79 acrescido de glifosato variou de acordo com as estirpes estudadas, independentemente do local de isolamento das mesmas, e com as dosagens aplicadas do herbicida, até a dosagem de 230 µM. A dose de 454 µM foi capaz de inibir o crescimento para todas as estirpes estudadas. Estes resultados corroboram o observado por Jacques *et al.* (2002), que trabalhando com as estirpes brasileiras BR 29, BR 85 e BR 96, de *Bradyrhizobium* spp., cultivadas em meio 79 adicionado de 26, 52, 104 e 208 µM, no primeiro trabalho, e dose fixa de 42,2 µM do ingrediente ativo, no segundo, também observaram, ao final do período de incubação (126 e 122 horas, respectivamente), um decréscimo no crescimento, que variou em sua magnitude em função das estirpes estudadas, sendo a ordem de tolerância das estirpes ao glifosato igual a BR 85 (SEMIA 5079 = CPAC 15) > BR 29 (SEMIA 5019) > BR 96 (SEMIA 587) para o primeiro experimento e BR 96 (SEMIA 587) > BR 85 (SEMIA 5079) > BR 29 (SEMIA 5019) para o segundo. Semelhantemente, Moorman *et al.* (1992),

avaliando a população de três estirpes de *B. japonicum*, por contagem do número mais provável de colônias crescidas em placas de Petri contendo meio YMA, previamente crescidas em meio de cultura MSR adicionado de 0,5; 1 e 5 mM (500, 1000 e 5000 μM) do sal de isopropilamina do glifosato, por até 3 dias de cultivo, constataram inibições variando de 10 a 47 %, em função das estirpes estudadas, para doses até 1 mM (1000 μM), e de 100% para a dose de 5 mM (5000 μM), em relação ao tratamento sem aplicação do glifosato ao meio. Inibição variada, em função das estirpes de rizóbio estudadas, também foi observada por Faizah *et al.* (1980) e Martensson (1992), quando o herbicida foi adicionado aos meios de cultura nas dosagens de 12,1 g/L (71000 μM) e 10 e 100 mg/L (59,1 e 591,6 μM), respectivamente.

O pequeno estímulo observado no crescimento das estirpes BR 29, INPA 553A e INPA 80A, até as respectivas doses calculadas de 89,47, 86,21 e 88,04 μM , a partir das equações de regressão, e posterior inibição do crescimento para as doses subsequentes, corroboram as observações de Eberbach & Douglas (1989), que aplicando concentrações de 0 a 20 mg ia/L (11,8 a 118,3 μM) ao meio de cultura, observaram significativa redução no crescimento de *Rhizobium trifolii* TA1 a partir da dose 10 mg ia/L (59,2 μM).

Liu *et al.* (1991) observaram um crescimento mais rápido da estirpe RM1021 de *Rhizobium meliloti* com o aumento dos níveis da molécula no meio. No entanto, quando estes níveis excederam a 1 mM (1000 μM), o crescimento foi retardado. Este comportamento assemelha-se ao observado para as estirpes BR 29 e INPA 553A com 120 horas de crescimento e para a estirpe INPA 80A com 240 horas, todos no primeiro experimento.

O comportamento de insensibilidade da estirpe BR 29 nas duas últimas avaliações, assim como da estirpe INPA 80A na primeira, em função das doses crescentes do glifosato, é corroborado por Moorman (1986), que estudando o

crescimento “in vitro”, por meio de contagem das unidades de colônias formadas, de duas estirpes de *Rhizobium japonicum* (*B. japonicum*) cultivadas em meio de cultura YMA adicionado de 2 e 20 mg/L (11,8 e 118,3 µM) de glifosato, não observou redução significativa na taxa de crescimento das bactérias, concluindo que houve uma ação bacteriostática do herbicida, porém, não tóxica. Semelhantemente, Mallik & Tesfai (1983) não constataram o efeito do glifosato no número de colônias formadas, para a estirpe 311b110 de *Rhizobium japonicum* (*B. japonicum*), testadas em meio de cultura adicionado de doses de até 25 µg/mL (mg/L) (147,9µM) do herbicida. Apesar de trabalharem com doses maiores (0; 3; 6 e 30 g/L) (17,75 a 177,5 mM), Faizah *et al.* (1980) também não observaram diferença no crescimento de 3 isolados de rizóbio originários da Malásia, África e Austrália. No entanto, estes resultados foram constatados 24 horas após a inoculação dos meios.

O melhor desempenho da estirpe BR 29 observado no presente estudo comprova a sua elevada plasticidade, conforme observado em outros trabalhos, em que também se observou a alta capacidade competitiva e adaptativa da estirpe quando em condições de estresse.

4.1.1 Efeitos do Roundup® sobre fungos micorrízicos arbusculares “in vitro”

A aplicação de Roundup® teve efeito significativo na germinação e no crescimento do tubo germinativo dos esporos dos fungos micorrízicos arbusculares cultivados em ágar-água acrescido de doses crescentes de Roundup® (Tabela 4).

Com exceção dos esporos da espécie *Glomus etunicatum*, que não germinaram quando a concentração do glifosato no ágar-água excedeu 51 μM , houve germinação para as outras duas espécies, em todas as doses aplicadas do herbicida. Até a dose de 204,5 μM , a média de germinação dos esporos de *Gigaspora margarita* foi de 78%. Já para *Scutellospora heterogama*, a variação observada na germinação dos esporos, em relação às demais espécies, pode ser atribuída à falta de sincronização destes em função da ocorrência de quiescência (Tabela 4).

TABELA 4. Porcentagem de germinação e a média dos valores das classes atribuídas ao tamanho dos tubos germinativos dos esporos dos FMAs em ágar-água acrescido de doses crescentes de Roundup®

Glifosato ($\mu\text{ mol L}^{-1}$)	Germinação (%)			Crescimento do TG		
	G.	G.	S.	G.	G.	S.
	<i>etunicatum</i>	<i>margarita</i>	<i>heterogama</i>	<i>etunicatum</i>	<i>margarita</i>	<i>Heterogama</i>
0	47,5 a	77,5 a	63,6 ab	1,33 b	3,77 a	2,52 a
25,6	46,6 a	75,0 a	72,5 a	1,95 a	3,66 a	1,81 ab
51	30,0 a	77,5 a	57,5 abc	1,0 b	3,52 a	1,93 ab
102	0,0 b	80,0 a	35,0 bc	0,0 c	3,13 a	1,40 b
204,5	0,0 b	80,0 a	42,5 abc	0,0 c	1,87 b	1,0 b
409	0,0 b	32,5 b	27,5 c	0,0 c	1,67 b	1,0 b
Pr>Fc	0,0000	0,0017	0,0011	0,0000	0,0000	0,0010
CV(%)	34,86	16,48	18,38	6,64	6,49	10,73

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey a 5%). Pr = Probabilidade; CV = Coeficiente de variação.

Pelos resultados obtidos, constatou-se uma inibição da germinação diferenciada entre as espécies estudadas, em relação à adição de doses crescentes de Roundup® no meio de cultivo, sendo esta decrescente na seguinte ordem: *G. etunicatum* > *S. heterogama* > *G. margarita* (Figura 4). No entanto, a até a dose

de 51 μM de glifosato adicionados ao ágar-água não houve efeito na porcentagem de germinação, para nenhum dos isolados de FMAs avaliados.

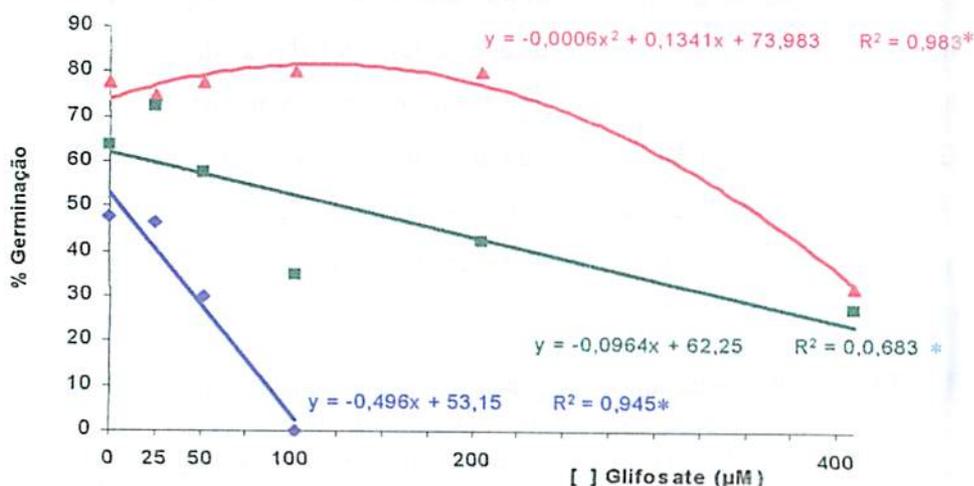


FIGURA 4. Curvas de regressão linear das porcentagens de germinação dos esporos de FMAs (\blacktriangle *G. margarita*; \blacksquare *S. heterogama* e \blacklozenge *G. etunicatum*) em ágar-água acrescido de doses crescentes de Roundup[®]. (* = probabilidade de 0,05).

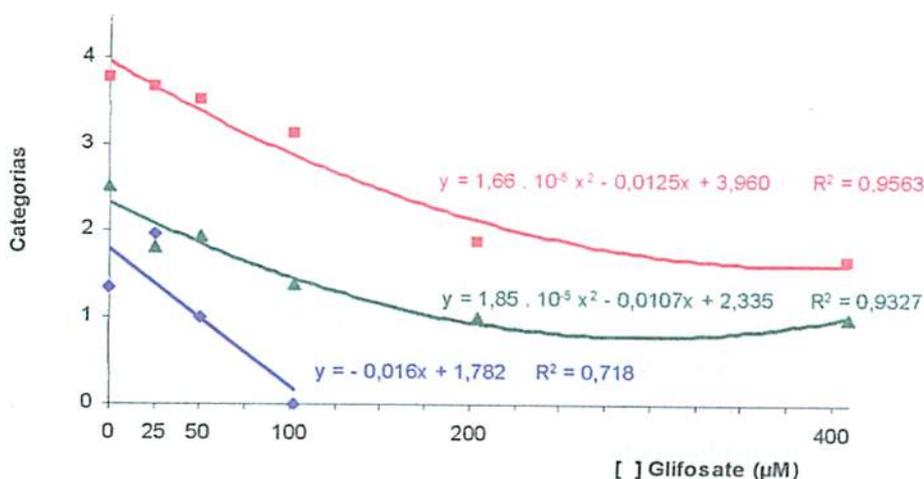


FIGURA 5. Curvas de regressão linear das médias dos valores das classes atribuídas ao tamanho dos tubos germinativos dos esporos dos FMAs \blacksquare (*G. margarita*; \blacktriangle *S. heterogama* e \blacklozenge *G. etunicatum*) em ágar-água acrescido de doses crescentes de Roundup[®]. (* = probabilidade de 0,05).

Observando o gráfico das curvas de regressão dos percentuais de germinação dos esporos (Figura 4), verificamos um pequeno estímulo do glifosato na germinação de esporos de *G. margarita* até a dose máxima de 111,75 μM , calculada pela equação de regressão, com posterior inibição para as dosagens subsequentes. Os esporos das espécies *S. heterogama* e *G. etunicatum* sofreram inibição da germinação, de acordo com o aumento das doses, as quais promoveram 50% de inibição da germinação (DI_{50}) nos valores aproximados de 322,9 e 53,6 μM , respectivamente, o que caracterizou o *G. etunicatum* como altamente sensível ao glifosato. Para esta última espécie, a germinação dos esporos foi totalmente inibida na concentração do glifosato no ágar-água igual a 102 μM , e por este motivo, desconsideraram, para cálculo da equação de regressão, as dosagens subsequentes (204,5 e 409 μM).

Considerando, semelhantemente ao disposto para o experimento com bactérias, a dose experimental (DC) equivalente à concentração esperada no solo a campo igual a 7 μM , proposta em Moorman (1986), e as equações de regressão de cada espécie fúngica, a inibição na germinação dos esporos de *S. heterogama* e *G. etunicatum* de 1,08 e 6,45%, respectivamente, e o estímulo de 1,22% na germinação dos esporos de *G. margarita*, são considerados irrelevantes.

Semelhantemente ao observado na avaliação de germinação, para o crescimento do tubo germinativo as doses crescentes do herbicida proporcionaram uma inibição diferenciada entre as espécies, decrescendo na mesma ordem do experimento de germinação, ou seja, *G. etunicatum* > *S. heterogama* > *G. margarita*, apesar da ocorrência de comportamento semelhante entre elas. Com base nas equações de regressão de cada espécie, as doses de inibição de 50% (DI_{50}) no crescimento do tubo germinativo dos esporos foram de 323,2; 316,9 e 55,68 μM . Aplicando a dose considerada para aplicações de campo (7 μM) nas equações de regressão de cada espécie fúngica, não houve efeito no crescimento

do tubo germinativo dos esporos de *G. margarita* e *S. heterogama*. Para os esporos de *G. etunicatum* esta dose promoveu uma inibição de 6,33%.

Para as maiores doses (204,5 e 409 μM), somente foram constatados esporos de *S. heterogama* classificados como “1”, evidenciando um efeito inibitório, em doses elevadas de glifosato, no crescimento dos tubos germinativos dos esporos (Figura 6A). A germinação inconstante dos esporos desta espécie e a relativa baixa diferença de esporos germinados entre o tratamento testemunha e o tratamento de maior dose do Roundup® no ágar-água (409 μM) podem ter contribuído para a não diferenciação estatística entre os tratamentos com aplicação do químico.

Na análise de distribuição dos esporos germinados de *G. etunicatum*, por classe de crescimento, a ocorrência de esporos com tubos germinativos categorizados como “3”, de crescimento médio-alto, e com a maioria classificados como “2”, proporcionou ao tratamento com dose de 25,6 μM um estímulo significativo no crescimento do tubo germinativo, em relação a testemunha e ao tratamento com dose 51 μM . Não se observaram esporos caracterizados como “4”, de elevado crescimento do TG (Figura 6B). Em função da baixa germinação dos esporos de *G. etunicatum*, o estímulo observado no crescimento do tubo germinativo desta espécie na concentração 25,6 μM deve ser observado de forma cautelosa, pois é comum a ocorrência de variações em avaliações neste tipo de estudo, exigindo a realização de repetidos estudos, visando a confirmação dos resultados.

O fungo *G. margarita*, na avaliação do CTG, demonstrou um efeito inibitório do glifosato no crescimento do tubo germinativo dos esporos somente para os dois tratamentos com as maiores doses (204,5 e 409 μM) do glifosato no

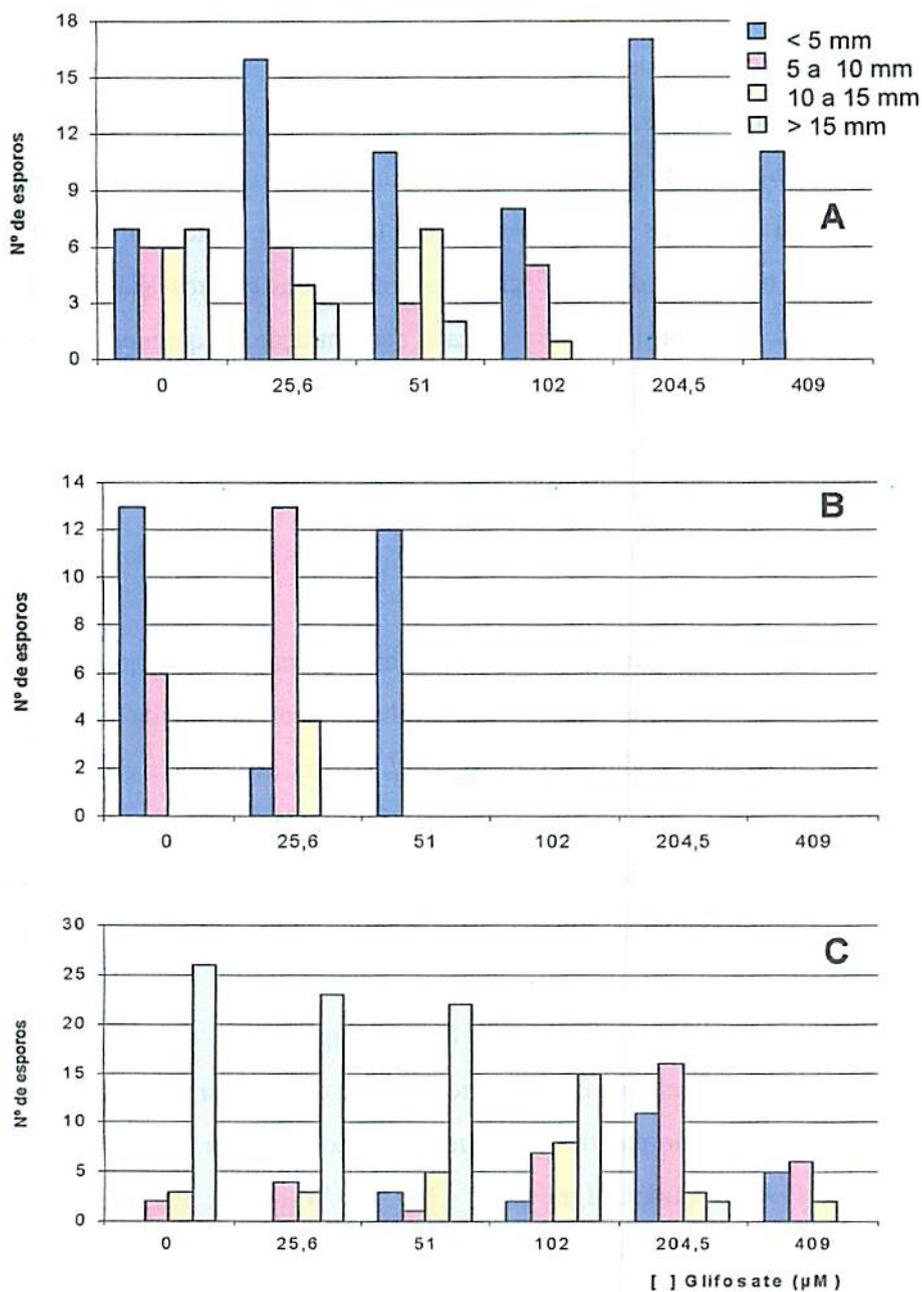


FIGURA 6. Distribuição dos esporos germinados de *Scutellospora heterogama* (A), *Glomus etunicatum* (B) e *Gigaspora margarita* (C), por classe de crescimento, cultivados em ágar-água acrescido de doses crescentes de Roundup®

meio, quando obteve desempenho estatisticamente idêntico entre eles e inferior aos demais tratamentos, demonstrando, assim, como na avaliação de germinação, um efeito inibitório do glifosato no crescimento do tubo germinativo dos esporos somente para elevadas doses do herbicida (Tabela 4). Este efeito inibitório é confirmado na análise de frequência de ocorrência dos esporos classificados em categorias de crescimento, dentro de cada concentração do químico. Observa-se alta frequência de esporos categorizados como “4”, ou seja, de elevado crescimento, no tratamento testemunha e nas doses de 25, 50 e 100 μM do princípio ativo, e baixa frequência destes esporos nas doses de 200 e 400 μM . De forma inversa, observa-se um efeito para os esporos categorizados como “1” e “2” (Figura 6C).

Apesar das observações de inibição na germinação e crescimento do tubo germinativo dos esporos das espécies avaliadas, em função da aplicação de dosagens crescentes do glifosato, Beyrle *et al.* (1995), avaliando o crescimento de *Rhizoctonia* spp. “in vitro” na presença de 0,5 e 1,0 mM de glifosato, não observaram efeito significativo do herbicida em nenhuma dose, após 10 dias de cultivo, demonstrando a ocorrência de insensibilidade da espécie para as doses de glifosato aplicadas.

Em estudos de contagens de microrganismos isolados de solos adicionados de glifosato, diversos autores também detectaram uma baixa resposta dos fungos em função das dosagens crescentes do herbicida, como relatado por Roslycky (1982); Gorchach-Lira *et al.* (1997) e Wardle & Parkinson (1990b) avaliando dosagens de 1 a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 1 e 4 ppm e 2 a 200 $\mu\text{g}/\text{g}$ de glifosato, respectivamente. Em outra avaliação, utilizando doses de 100 a 500 ppm, Gorchach-Lira *et al.* (1997) observaram ainda um efeito bacteriostático mais acentuado do que o fungistático, sendo, ambos aumentando de acordo com o aumento da dose do herbicida.

Recentemente, Araújo *et al.* (2003), em contagem do número mais provável entre microrganismos submetido à dosagem de 2,16 mg/kg (13 μ M) de glifosato, observaram um aumento do número de fungos e de actinomicetos após 32 dias de incubação. Contrariando essas observações, Busse *et al.* (2001) constataram uma maior sensibilidade dos fungos, isolados em solos de floresta de pinheiros (*Pinus ponderosa*), em relação às bactérias, para doses de glifosato até 500 mM, ou seja, 100 vezes a recomendada para aplicações de campo, segundo o autor.

Não foram encontrados relatos do efeito do glifosato em fungos micorrízicos arbusculares “*in vitro*”, limitando a discussão dos resultados aos efeitos observados em fungos heterotróficos.

Ao final dos experimentos com *Bradyrhizobium* spp. e FMAs “*in vitro*”, constatou-se um efeito inibitório muito baixo do glifosato no crescimento bacteriano, bem como na germinação e crescimento do tubo germinativo das espécies micorrízicas, para a dose experimental equivalente à concentração do herbicida esperada no solo a campo (7 μ M), conforme proposição de Moorman, (1986), pois excetuando-se a inibição de aproximadamente 6% na germinação e no crescimento do tubo germinativo de esporos de *G. etunicatum*, nenhum outro parâmetro avaliado apresentou inibição superior a 2% em relação à testemunha livre do glifosato.

4.2 Efeito do Roundup® no crescimento, nodulação e colonização micorrízica da soja

A aplicação prévia de doses crescentes de Roundup®, equivalente a até 10 L/ha (22,5 μ M), não teve efeito significativo no crescimento da soja, avaliada em

três épocas diferentes (Tabela 5), sendo os pesos médios aos 17, 31 e 45 DAE iguais a 0,3215; 1,4222 e 4,7759 g, respectivamente.

TABELA 5. Peso da matéria seca da parte aérea de plantas de soja, aos 17, 31 e 45 dias após a emergência (DAE), submetidas aos tratamentos com aplicação de doses crescentes de Roundup®

[Glifosato] L/ha *	Peso seco de parte aérea (g)		
	17 DAE	31 DAE	45 DAE
0	0,3662 a	1,3862 a	5,0552 a
1,25	0,3432 a	1,4238 a	4,9044 a
2,5	0,3126 a	1,2524 a	4,6916 a
5	0,3334 a	1,4732 a	4,8636 a
7,5	0,2870 a	1,6750 a	4,7730 a
10	0,2868 a	1,3526 a	4,3678 a
Pr>Fc	0,22 (ns)	0,42 (ns)	0,34 (ns)
CV(%)	17,96	21,91	10,09

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey a 5%). ns = Não significativo. Pr = Probabilidade; CV = Coeficiente de variação. * Equivalente a 0, 2,8; 5,6; 11,2; 16,8 e 22,5 µM, respectivamente.

Para o peso da matéria seca da raiz (MSR), somente foi observada diferença significativa aos 45 DAE, quando o tratamento testemunha, sem aplicação do herbicida, obteve um rendimento melhor do que o observado nos tratamentos com doses referentes a 2,5 e 10 L/ha. No entanto, para este mesmo parâmetro, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos com aplicação do Roundup®. Para as outras épocas de avaliação a média do peso da matéria seca das raízes foi de 0,2738 e 0,454 g aos 17 e 31 DAE, respectivamente (Tabela 6).

A nodulação só foi avaliada aos 31 e 45 dias, em virtude de os nódulos estarem em processo de formação aos 17 dias. Para as avaliações realizadas aos 31 e 45 DAE, não foram observadas diferenças estatísticas significativas para os tratamentos (Tabela 7). O número médio de nódulos, aos 31 e 45 DAE, foi 41 e 142,8 nódulos por planta, respectivamente, e o peso médio da matéria seca destes, nas mesmas épocas de avaliação, 0,0213 e 0,2875 g. Esses dados indicam que o

Roundup[®], até a dose equivalente a 10 L/ha, aplicado 10 dias antes da semeadura, não interferiu na nodulação de plantas de soja.

TABELA 6. Peso da matéria seca de raiz de plantas de soja, aos 17, 31 e 45 dias após a emergência (DAE), submetidas aos tratamentos com aplicação de doses crescentes de Roundup[®]

[Glifosato] L/ha [*]	Peso seco de raiz (g)		
	17 DAE	31 DAE	45 DAE
0	0,2734 a	0,5134 a	1,3122 a
1,25 (2,8)	0,2582 a	0,4300 a	1,1868 ab
2,5 (5,6)	0,2448 a	0,3654 a	1,0694 b
5 (11,2)	0,2664 a	0,4356 a	1,1202 ab
7,5 (16,8)	0,3052 a	0,4916 a	1,1536 ab
10 (22,5)	0,2946 a	0,4882 a	1,0206 b
Pr>Fc	0,9171 (ns)	0,3182 (ns)	0,0119
CV(%)	34,66	24,05	10,25

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey a 5%). ns = Não significativo. Pr = Probabilidade; CV = Coeficiente de variação. ^{*} Equivalente a 0; 2,8; 5,6; 11,2; 16,8 e 22,5 µM, respectivamente.

TABELA 7. Número e peso da matéria seca de nódulos presentes em raiz de plantas de soja, aos 17, 31 e 45 dias após a emergência (DAE), submetidas aos tratamentos com aplicação de doses crescentes de Roundup[®]

[Glifosato] L/ha [*]	Números de nódulos		Matéria seca de nódulos (g)	
	31 DAE	45 DAE	31 DAE	45 DAE
0	41,0 a	142,8 a	0,0213 a	0,2875 a
1,25 (2,8)	46,2 a	98,6 a	0,0227 a	0,2711 a
2,5 (5,6)	40,0 a	137,4 a	0,0183 a	0,2603 a
5 (11,2)	44,4 a	121,2 a	0,0239 a	0,2730 a
7,5 (16,8)	55,4 a	141,0 a	0,0281 a	0,2695 a
10 (22,5)	52,2 a	126,8 a	0,0202 a	0,2070 a
Pr>Fc	0,4875 (ns)	0,3616 (ns)	0,4989 (ns)	0,5255 (ns)
CV(%)	15,32	13,60	35,73	25,97

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey a 5%). ns = Não significativo. Pr = Probabilidade; CV = Coeficiente de variação. ^{*} Equivalente a 0; 2,8; 5,6; 11,2; 16,8 e 22,5 µM, respectivamente.

A colonização micorrizica das raízes das plantas de soja também não foi influenciada pela aplicação de Roundup[®] (Tabela 8). A colonização média das

raízes por FMAs foi elevada, sendo, em média, de 44, 77 e 80% aos 17, 31 e 45 DAE, respectivamente.

TABELA 8. Porcentagem de colonização micorrizica em raiz de plantas de soja, aos 17, 31 e 45 dias após a emergência (DAE), submetidas aos tratamentos com aplicação de doses crescentes de Roundup®

[Glifosato] L/ha	Colonização micorrizica (%)		
	17 DAE	31 DAE	45 DAE
0	38 a	73 a	79 a
1,25 (2,8)	47 a	78 a	83 a
2,5 (5,6)	37 a	80 a	76 a
5 (11,2)	55 a	78 a	78 a
7,5 (16,8)	41 a	76 a	83 a
10 (22,5)	46 a	76 a	82 a
Pr>Fc	0,1471 (ns)	0,9327 (ns)	0,6383 (ns)
CV(%)	16,57	11,37	9,56

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey a 5%). ns = Não significativo. Pr = Probabilidade; CV = Coeficiente de variação.

Os resultados observados para a peso da matéria seca da parte aérea e da raiz corroboram as observações de Chakravarty & Chatarpaul (1990), que avaliando, em condição de casa-de-vegetação, o peso da matéria seca da parte aérea (MSPA), da matéria seca da raiz (MSR) e da matéria seca total MSTotal de *Pinus resinosa*, em função da aplicação de doses relativas a 0,54 e 3,23 kg i.a./ha (3,1 e 18,6 µM), não observaram diferença estatística entre os tratamentos. Morandi (1989), avaliando a aplicação de dose equivalente a 0,5 µg/mL (2,9 µM) de glifosato em plantas de soja com 2 semanas de crescimento, observou uma redução no crescimento das plantas. No entanto, é importante ressaltar que a aplicação do herbicida realizada por Morandi se deu após o plantio da soja, ou seja, com a planta compondo o sistema na época da aplicação, o que pode ter influenciado para a ocorrência da redução do peso das plantas, em função da pronta disponibilidade da molécula para a absorção radicular. Martensson (1992) também observou uma

diminuição na produção de matéria seca das plantas de trevo vermelho (*Trifolium pratense* cv. Britta) crescidas “in vitro”, quando foi realizada uma aplicação radicular de 10; 40 e 60 mg/L (59,1 e 591,6 μ M) de glifosato.

A não interferência do glifosato na nodulação da soja diverge das observações de Mallik & Tesfai (1985), segundo os quais o número e o peso dos nódulos foram significativamente reduzidos com a aplicação do herbicida, na dose recomendada e cinco vezes essa concentração (1,12 e 5,6 kg/ha [7 e 35 μ M]). No entanto, é importante ressaltar que no trabalho de Mallik & Tesfai (1985) a aplicação do glifosato ocorreu 17 dias após o plantio da soja, ou seja, diferentemente das condições impostas no presente estudo. Eberbach & Douglas (1989), aplicando concentrações de 0; 2; 5; 10 e 20 mg ia/L (11,8 a 118,3 μ M) de glifosato ao meio de cultura, também observaram um decréscimo linear no número de nódulos em plantas de trevo crescidas em meio artificial. Em outra avaliação, o inóculo de *R. trifolii* TA1 lavado uma ou várias vezes em solução salina, após crescimento em meio de cultura acrescido de glifosato, nas suas várias concentrações, mostrou um decréscimo na habilidade de nodular plantas de trevo. Em estudo da iniciação do processo de formação dos nódulos, Martensson (1992) concluiu que doses de 10; 40 e 60 mg/L (59,1 e 591,6 μ M) de glifosato em meio de cultura não interferiram na deformação, induzida por bactéria, do pêlo radicular de trevo vermelho (*Trifolium pratense* cv. Britta). No entanto, a nodulação foi afetada pelo aumento das concentrações do químico no meio.

Trabalhando com plantas de soja geneticamente modificadas para tolerar o glifosato, King *et al.* (2001) observaram resultados divergentes, em função da época de avaliação e plantio, constatando redução, aumento ou nenhum efeito no número e no peso dos nódulos quando se aplicou 1,68 kg i.a./ha (10,5 μ M) do herbicida.

Avaliando o desenvolvimento ectomicorrízico de *Paxillus involutus* em *Pinus resinosa*, Chakravarty & Chatarpaul (1990) constataram, após dois meses de crescimento da planta em solo com aplicação de glifosato, tanto em condição de casa de vegetação como de campo, que o desenvolvimento da simbiose não foi afetado, em nenhuma das doses do herbicida testado (0,54 e 3,23 kg i.a./ha [3,1 e 18,6 µM]), sendo observada ainda uma elevada taxa, tanto para a colonização espontânea em condição de campo, variando de 74 a 86%, quanto em condição de inoculação em casa-de-vegetação e campo, quando a colonização foi de aproximadamente 99% em todas as concentrações do herbicida. Morandi (1989), estudando a aplicação de dose equivalente a 0,5 µg/mL (2,9 µM) de glifosato, observou aumento da colonização micorrízica nas raízes de soja por *Glomus mosseae* entre a testemunha e o tratamento com aplicação do herbicida. Segundo o autor, o glifosato promoveu o acúmulo do isoflavonóide gliceolin nas raízes, o que favoreceu a micorrização. Contrariamente, Beyrle *et al.* (1995) observaram uma falha na iniciação da micorrização de espécies de *Rhizoctonia* em protocormos de orquídea (*Orchis morio*) quando da adição de 1 mM de glifosato ao meio de cultivo.

5 CONCLUSÕES

1. O Roundup® mostrou-se inibitório ao crescimento de *Bradyrhizobium* spp. e a fungos micorrízicos arbusculares em meio de cultura, sendo esse efeito dependente da dose aplicada e espécie ou estirpe avaliada.
2. A inibição no crescimento de *Bradyrhizobium* spp. e na germinação e crescimento do tubo germinativo dos fungos micorrízicos arbusculares só ocorreu em concentração muito superior àquelas normalmente esperadas em condições reais de campo.
3. Em função da DI_{50} pôde-se constatar sensibilidade diferenciada no crescimento das estirpes bacterianas avaliadas, decrescente na seguinte ordem: BR 86 > INPA 80A > INPA 553A > BR 29.
4. A germinação, bem como o crescimento dos tubos germinativos dos esporos das espécies avaliadas, proporcionaram uma inibição diferenciada decrescendo na seguinte ordem: *Glomus etunicatum* > *Scutellospora heterogama* > *Gigaspora margarita*.
5. A aplicação de Roundup® no solo, até a dose equivalente a 10 L/ha e 10 dias antes da semeadura da soja, não influenciou a nodulação e a colonização micorrízica da soja.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AISLABIE, J.; LLOYD-JONES, G. A review of bacterial degradation of pesticides. **Australian Journal of Soil Research** 33: 925-942. 1995.
- 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.
- ASPELIN, A.L. Pesticide industry sales and usage: 1994 and 1995 market estimates. U.S. EPA. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Office of Pesticide Programs. Biological and Economic Analysis Division. Washington, D.C., 1997.
- BAIRD, D. D. et al. Introduction of a new broad spectrum postemergence herbicide class with utility for herbaceous perennial weed control. **Proc. North Cent. Weed Contr. Conf.**, v. 26, p. 64-68, 1971.
- BALTHAZOR, T. M.; HALLAS, L. E. Glyphosate-degrading microorganisms from industrial activated sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 432-434, 1986.
- BEYRLE, H. F. et al. Colonization of *Orchis morio* protocorms by a mycorrhizal fungus: effects of nitrogen nutrition and glyphosate in modifying the responses. **Canadian Journal Botany**, v. 73, p. 1128-1140, 1995.
- BOLLICH, P. K.; DUNIGAN, E. P.; JADI, A. W. M. Effects of seven herbicides on N₂ (C₂H₂) fixation by soybeans. **Weed Science**, v. 33, p. 427-430, 1985.
- BUSSE, M. D. et al. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 1777-1789, 2001.
- CAROLINE COX Glyphosate Factsheet **Journal of Pesticide Reform** v.108, n.3 Fall98 rev. 2000

CHAKRAVARTY, P.; CHATARPAUL, L. Non-target effect of herbicides: II. The influence of glyphosate on ectomycorrhizal symbiosis of red pine (*Pinus resinosa*) under greenhouse and field conditions. *Pesticide Science*, v. 28, p. 243-247, 1990.

CHARUDATTAN, R. Controle biológico de plantas daninhas através de fitopatógenos. Jabotical: FCAVJ/UNESP, 1993. 34 p.

CHRISTY, S. L.; KARLANDER, E. P.; PAROCHETTI, J. V. Effects of glyphosate on the growth rate of *Chlorella*. *Weed Science*, v. 29, n. 1, p. 5-7, 1981.

COMES, R. D.; BRUNS, V. F.; KELLEY, A. D. Residues and persistence of glyphosate in irrigation water. *Weed Science*, v. 24, n. 1, p. 47-50, 1976.

COMES, R.D., V.F. BRUNS, AND A.D. KELLEY.. Residues and persistence of glyphosate in irrigation water. *Weed Science* v. 24(1) p. 47-50. 1976.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Safra brasileira de soja. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 2003.

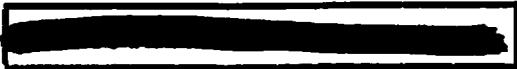
CORNISH, P. S. Glyphosate residues in a sandy soil affect tomato transplants. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, v. 32, p. 395-399, 1992.

DICK, R. E.; QUINN, J. P. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnology*, v. 43, p. 545-550, 1995.

DUNIGAN, E. P. et al. Herbicidal effects on the nodulation of *Glycine max* (L.) Merril. *Agronomy Journal*, v. 64, p. 806-808, 1972.

EBERBACH, P. L.; DOUGLAS, L. A. Effect of the herbicide residues in a sandy loam on the growth, nodulation and nitrogenase activity (C_2H_2/C_2H_4) of *Trifolium subterraneum*. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 131, p. 67-76, 1991.

EBERBACH, P. L.; DOUGLAS, L. A. Herbicide effects on the growth and nodulation potential of *Rhizobium trifolii* with *Trifolium subterraneum* L. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 119, p. 15-23, 1989.



EBERBACH, P. L.; DOUGLAS, L. A. Persistence of glyphosate in a sandy loam. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 15, n. 14, p. 485-487, 1983.

FAIZAH, A. W.; BROUGHTON, W. J.; JOHN, C. K. Rhizobia in tropical legumes – XI. Survival in the seed environment. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 12, p. 219-227, 1980.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. *Programas e Resumos...* São Carlos: UFSCAR, 2000. p. 255-258.

FISCHER, R. S. et al. Comparative action of glyphosate as a trigger of energy drain in eubacteria. *Journal of Bacteriology*, v. 168, n. 3, p. 1147-1154, 1986.

FORLANI, G. et al. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 31, p. 991-997, 1999.

FRANZ, J.E. In: *The Herbicide Glyphosate* (Grossbard E., & Atkinson, D., Eds.) Boston, MA: Butterworth: p. 3-17. 1985.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. *Laboratory manual of general microbiology*. New York: McGraw-Hill Book, 1928. 143 p.

GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil wet sieving and decanting. *Transactions of British Mycological Society*, Cambridge, v. 46, n. 2, p. 235-244, Apr. 1963.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on roots. *New Phytologist*, Oxford, v. 84, n. 3, p. 489-500, 1980.

GLASS, R. L. Adsorption of glyphosate by soils and clay minerals. *Journal Agricultural Food Chem.*, v. 35, p. 497-500, 1987.

GORLACH-LIRA, K. et al. The response of forest soil microflora to the herbicide formulations Fusilade and Roundup. *Microbiological Research*, v. 152, p. 319-329, 1997.

- GREAVES, M. P. Long-term effects of herbicides on soil microorganisms. *Proceedings of the Association of Applied Biologists*, v. 91, n. 1, p. 129-132, 1979.
- 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*, v. 53, p. 123-127, 1988.
- HANCE, R. J. Adsorption of glyphosate by soils. *Pesticide Science*, v. 7, p. 363-366, 1976.
- HANEY, R. L. et al. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Science*, v. 48, p. 89-93, 2000.
- HOAGLAND, R. E.; DUKE, S. O. Biochemical effects of glyphosate [*N*-(phosphonomethyl)glycine]. In: MORELAND, D. E.; JOHN, J. B. S.; HESS, F. D. (Ed.). *Biochemical responses induced by herbicides*. ACS Symposium Series, n. 181, p. 175-205, 1982.
- JACQUES, R. J. S. et al. Efeito das diferentes formulações do herbicida glifosato no crescimento do rizóbio da soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29., 2003, Ribeirão Preto. *Anais... Ribeirão Preto, CBCS*, 2003. CD-Rom.
- JACQUES, R. J. S. et al. Efeito do herbicida glifosato potássico no crescimento de *Bradyrhizobium* sp. em meio de cultura. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, 1., 2002, Rio de Janeiro. *Resumos... Rio de Janeiro*, 2002.
- JAWORSKI, E. G. Mode of action of *N*-Phosphonomethylglycine: inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. *Journal Agricultural Food Chem.*, v. 20, n. 6, p. 1195-1198, 1972.
- JONGE, H.; JONGE, L. W. Influence of pH and solution composition on the sorption of glyphosate and prochloraz to a sandy loam soil. *Chemosphere*, v. 39, n. 5, p. 753-763, 1999.

KAWATE, M.K. AND A.P. APPLEBY. Effect of soil pH on availability of glyphosate in soil to germinating ryegrass seedlings. *J. Appl. Seed Prod.* v. 5 p. 45-49. 1987.

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. p. 179-186, 2001.

KISHORE, G. M.; JACOB, G. S. Degradation of glyphosate by *Pseudomonas* sp. PG2982 via a sarcosine intermediate. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 262, n. 25, p. 12164-12168, Sept. 1987.

KRZYSKO-LUPICKA, T.; ORLIK, A. The use of glyphosate as the sole source of phosphorus or carbon for the selection of soil-borne fungal strains capable to degrade this herbicide, *Chemosphere*, v. 34, n. 12, p. 2601-2605, 1997.

LAMBAIS, M. R.; CARDOSO, E. J. B. N. Germinação de esporos e crescimento do tubo germinativo de fungos micorrizicos vesículo arbusculares em diferentes concentrações de alumínio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 13, p. 151-154, 1989.

LIU, C.-M. et al. Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family *Rhizobiaceae*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n. 6, p. 1799-1804, 1991.

LUND-HØIE, K.; FRIESTAD, H. O. Photodegradation of the herbicide glyphosate in water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 36, p. 723-729, 1986.

MALIK, J., BARRY, G., AND KISHOORE, G. The herbicide glyphosate. *Biofactors* v. 2(1) p. 17-25. 1989.

MALLIK, M. A. B.; TESHAI, K. Compatibility of *Rhizobium japonicum* with commercial pesticides *in vitro*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 31, p. 432-437, 1983.

MALLIK, M. A. B.; TESHAI, K. Pesticidal effect on soybean -rhizobia symbiosis. *Plant and 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. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 5, n. 2, p. 121-126, 1993.
- MARTENSSON, A. M. Effects of agrochemicals and heavy metals on fast-growing rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 435-445, 1992.
- McBRIDE, M.; KUNG, K. Complexation of glyphosate and related ligands with iron (III). **Soil Science Soc. Am. Journal**, v. 53, p. 1668-1673, 1989.
- McCONNELL, J. S.; HOSSNER, L. R. pH-Dependent adsorption isothermes of glyphosate. **J. Agricultural Food Chem.**, v. 33, p. 1075-1078, 1985.
- MILES, A. A.; MISRA, S. S. The estimations of the bactericidal power of the blood. **Journal of Hygiene**, Cambridge, v. 38, n. 6, p. 732-749, 1938.
- MOORE, J. K.; BRAYMER, H. D.; LARSON, A. D. Isolation of a *Pseudomonas* sp. which utilizes the phosphonate herbicide glyphosate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 316-320, 1983.
- MOORMAN, T. B. Effects of herbicides on the survival of *Rhizobium japonicum* strains. **Weed Science**, v. 34, p. 628-633, 1986.
- MOORMAN, T. B. et al. Production of hydroxybenzoic acids by Bradyrhizobium japonicum strains after treatment with glyphosate. **Journal Agricultural Food Chem.**, v. 40, p. 289-293, 1992.
- MORANDI, D. Effect of xenobiotics on endomycorrhizal infection and isoflavonoid accumulation in soybean roots. **Plant Physiology Biochem.**, v. 27, n. 5, p. 697-701, 1989.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**, Lavras: UFLA, 2002. 626 p.
- MÜLLER, M. M. et al. Fate of glyphosate and its influence on nitrogen-cycling in two finnish agriculture soils. **Bull. Environm. Contam. Toxicol.**, v. 27, p. 724-730, 1981.

- NEMEC, S.; TUCKER, D. Effects of herbicides on endomycorrhizal fungi in florida citrus (*Citrus* spp.) soils. **Weed Science**, v. 31, p. 427-431, 1983.
- NOMURA, N. S.; HILTON, H. W. The adsorption and degradation of glyphosate in five Hawaiian sugarcane soils. **Weed Research**, v. 17, p. 113-121, 1977.
- NOVO, M. C. S. S. et al. 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.
- PHILLIPIS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.55, n.1, p.158-161, Aug. 1970.
- PICCOLO, A.; CELANO, G.; CONTE, P. Adsorption of glyphosate by humic substances. **Journal Agricultural Food Chem.**, v. 44, p. 2442-2446, 1996.
- PIPKE, R.; AMRHEIN, N. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate by *Arthrobacter atrocyaneus* ATCC 13752. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1293-1296, 1988.
- PRATA, F. et al. Influência da matéria orgânica na sorção e dessorção do glifosato em solos com diferentes atributos mineralógicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 24, p. 947-951, 2000.
- QUINN, J. P.; PEDEN, J. M. M.; DICK, R. E. Glyphosate tolerance and utilization by the microflora of soils treated with the herbicide. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 511-516, 1988.
- RENNIE, R. J.; DUBETZ, S. Effect of fungicides and herbicides on nodulation and N₂ fixation in soybean fields lacking indigenous *Rhizobium japonicum*. **Agronomy Journal**, v. 76, p. 451-454, 1984.
- RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 4.ed. Londrina: [s.n.], 1998. 648 p.
- ROSLYCKY, E. B. Glyphosate and the response of the soil microbiota. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 14, p. 87-92, 1982.

ROSLYCKY, E. B. Response of soil microbiota to selected herbicide treatments. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 23, p. 426-433, 1977.

RUEPPEL, M. L. et al. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *Journal Agricultural Food Chem.*, v. 25, n. 3, p. 517-528, 1977.

SANTOS, A.; FLORES, M. Effects of glyphosate on nitrogen fixation of free-living heterotrophic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, v. 20, p. 349-352, 1995.

SILVA JÚNIOR, J. P.; SIQUEIRA, J. O. Colonização micorrízica e crescimento da soja com diferentes fungos e aplicação do isoflavonóide formononetina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 33, n. 06, p.[s.n.], 1998.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS (SINDAG). Disponível em: <<http://www.sindag.com.Br>>. Acesso em 20 dez. 2003.

SMITH, A. E.; AUBIN, A. J. Degradation of ¹⁴C-glyphosate in Saskatchewan soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 50, p. 499-505, 1993.

SOUZA, A. P. et al. Efeito do oxyfluorfen, 2,4-D e glyphosate na atividade microbiana de solos com diferentes texturas e conteúdos de matéria orgânica. *Planta Daninha*, v. 14, n. 1, p. 55-65, 1996.

SPRANKLE, P. et al. Separation of glyphosate and possible metabolites by thin-layer chromatography. *Weed Science*, v. 26, n. 6, p. 673-674, 1978.

SPRANKLE, P.; MEGGITT, W. F.; PENNER, D. Absorption, action and translocation of glyphosate. *Weed Science*, v. 23, n. 3, p. 229-234, 1975b.

SPRANKLE, P.; MEGGITT, W. F.; PENNER, D. Adsorption, mobility, and microbial degradation of glyphosate in the soil. *Weed Science*, v. 23, n. 3, p. 235-240, 1975c.

SPRANKLE, P.; MEGGITT, W. F.; PENNER, D. Rapid inactivation of glyphosate in the soil. *Weed Science*, v. 23, n. 3, p. 224-228, 1975a.

TOMLIN, C.. A World Compendium - The Pesticide Manual. Farnhem: British Crop Protection Council.1994..

TORSTENSSON, N. T. L.; AAMISEPP, A. Detoxification of glyphosate in soil. Weed Research, v. 17, p. 209-212, 1977.

TU, M.; HURO, C.; RANDALL, J. M. The nature conservancy. Weed Control Methods Handbook, nov. 2001.

WARDLE, D. A.; PARKINSON, D. Effect of three herbicides on soil microbial biomass and activity. Plant and Soil, Dordrecht, v. 122, p. 21-28, 1990a.

WARDLE, D. A.; PARKINSON, D. Influence of the herbicide glyphosate on soil microbial community structure. Plant and Soil, Dordrecht, v. 122, p. 29-37, 1900b.

WARDLE, D. A.; PARKINSON, D. Relative importance of the effect of 2,4-D, glyphosate, and environmental variables on the soil microbial biomass. Plant and Soil, Dordrecht, v. 134, p. 209-219, 1991.

WIRÉN-LEHR, S. von. et al. Mineralization of [14C] glyphosate and its plant-associated residues in arable soils originating from different farming systems. Pesticide Science, v. 51, p. 436-442, 1997.

ANEXO

ANEXO 1: Composição do meio de cultura YMA (Fred & Waksman, 1928)

Constituintes	Quantidades
Manitol	10 g
Solução de K ₂ HPO ₄ (10%)	1 mL
Solução de KH ₂ PO ₄ (10%)	4 mL
Solução de MgSO ₄ . 7 H ₂ O (10%)	2 mL
Solução de NaCl (10%)	1 mL
Extrato de Levedura	10 mL ou 0,4 g
Azul de Bromotimol KOH (0,5% - 0,2 N)	5 mL
Ph	6,8 - 7,0