



Ministério da Educação – Brasil
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM
Minas Gerais – Brasil
Revista Vozes dos Vales: Publicações Acadêmicas
ISSN: 2238-6424
QUALIS/CAPES – LATINDEX
Nº. 26 – Ano XII – 10/2024
<http://www.ufvjm.edu.br/vozes>

Herbicidas diminuem o crescimento de bactéria benéfica do solo

Dra. Gabriela Madureira Barroso
Doutora em Ciência Florestal e Produção Vegetal pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM/MG - Brasil
Pós-Doutoranda em Produção Vegetal - UFVJM
<http://lattes.cnpq.br/5586388065977636>
E-mail: gabriela.madureira@ufvjm.edu.br

Maehssa Leonor Franco Leite
Formada em Agronomia pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM/MG - Brasil
Agrônoma - UFVJM
<http://lattes.cnpq.br/9994445756788971>
E-mail: maehssa15@gmail.com

Dra. Ivani Teixeira de Oliveira
Doutora em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas- UFPel/RS - Brasil
Professora no Departamento de Agronomia - UFVJM
<http://lattes.cnpq.br/0482260614764136>
E-mail: ivaniton@yahoo.com.br

Dr. Caique Menezes de Abreu
Doutor em Produção Vegetal pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM/MG - Brasil
Pós-Doutorando em Produção Vegetal - UFVJM
<http://lattes.cnpq.br/3336188708516696>
E-mail: abreu.m.caique@gmail.com

Dra. Cláudia Eduarda Borges
Doutora em Produção Vegetal pela Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM/MG - Brasil
Extensionista no Emater - MG
<http://lattes.cnpq.br/9471404808200285>
E-mail: claudia.borges@emater.mg.gov.br

Tayna Sousa Duque
Mestre em Produção Vegetal pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha
e Mucuri - UFVJM/MG - Brasil
Doutoranda em Produção Vegetal - UFVJM
<http://lattes.cnpq.br/0245541371135010>
E-mail: tayna.duque@ufvjm.edu.br

Dr. José Barbosa dos Santos
Doutor em Fitotecnia pela Universidade Federal de Viçosa - UFV/MG - Brasil
Professor Titular do Departamento de Agronomia - UFVJM
<http://lattes.cnpq.br/1948250121809916>
E-mail: jbarbosasantos@ufvjm.edu.br

Resumo: O solo saudável contém vários microrganismos benéficos para as plantas, auxiliando no desenvolvimento e crescimento. Dentre esses microrganismos, as bactérias que fazem a fixação biológica do nitrogênio têm destaque por se associarem a diversas espécies leguminosas em uma relação simbiótica. Essa associação benéfica é utilizada para produção de alimentos, utilizando bactérias do gênero *Bradyrhizobium* com a soja. Entretanto, o uso de agrotóxicos, como os herbicidas, pode diminuir o crescimento desses organismos benéficos em lavouras. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a sensibilidade da bactéria *Bradyrhizobium elkanii* aos herbicidas fluazifop-p-butil e à mistura de glyphosate + s-metolachlor. As bactérias foram ativadas em placas de Petri em meio YMA sólido em BOD a 28°C, em seguida multiplicadas em Erlenmeyers em meio líquido YMA até atingir a densidade ótica (DO) de 10⁸ colônias, em agitador rotatório a 150 RPM a 28°C. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições. Foram três tratamentos contendo bactéria + herbicidas e 1 tratamento controle contendo bactéria + água. Foram feitas leituras da absorbância em espectrofotômetro em placas de Elisa por 120 horas. Posteriormente, os dados de absorbância foram relacionados às Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por meio de diluições seriadas e contagem das colônias em placa. Os dados obtidos foram analisados por meio de análise de variância, regressão linear simples e teste de Tukey a 5% de significância. A taxa de crescimento da bactéria e sua densidade celular máxima foram menores nos tratamentos contendo os herbicidas. *Bradyrhizobium elkanii* foi sensível ao fluazifop-p-butil e à mistura de glyphosate + s-metolachlor.

Palavras-chave: *Bradyrhizobium elkanii*. Fixação biológica de nitrogênio. Fluazifop-p-butil. Glyphosate. S-metolachlor.

Introdução

As bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, que fazem a fixação biológica de nitrogênio, estão dentro de um grupo de bactérias denominadas rizóbios, que estabelecem associação simbiótica com plantas leguminosas. As principais culturas em que essa tecnologia é utilizada são: feijão comum, feijão caupi, amendoim, adubos verdes e leguminosas arbóreas usadas em recuperação de áreas degradadas, sendo aplicada em maior escala na cultura da soja (EMBRAPA, 2011).

A soja (*Glycine max*) é uma das commodities agrícolas mais importantes do mundialmente, utilizada na alimentação humana e animal e como matéria prima para diversos produtos na indústria. O Brasil é o seu maior produtor no mundo, com 125.552,3 mil toneladas e o grão ocupa a maior área cultivada do país com 41.452,0 mil hectares (CONAB, 2021; OLIVERIA E HECHT, 2016).

A soja demanda 80 kg de nitrogênio para cada 1000 kg de grãos produzidos, devido ao alto teor de proteína presente nos grãos. Considerando que a eficiência dos fertilizantes nitrogenados dificilmente é maior que 50%, esse nutriente acrescido ao solo apenas na forma de fertilizante químico, impossibilitaria ou dificultaria muito a produção da cultura pelo seu alto custo (HUNGRIA ET AL., 2007; GAZZONI, 2018).

De acordo com Alves et al (2003), de 70 a 85% do nitrogênio requerido pela soja, em áreas bem manejadas, é resultante da fixação biológica. A elevada produtividade da cultura e as vantagens que traz para a economia brasileira, são em grande parte consequências da seleção de linhagens adequadas de *Bradyrhizobium* e o vínculo de grãos com a fixação biológica de nutrientes (FBN).

Entretanto, vários produtos utilizados nas lavouras podem ser tóxicos para microrganismos do solo, diminuindo o seu crescimento e, consequentemente, a fixação biológica de nitrogênio. Dentre os produtos utilizados, os agrotóxicos, especialmente os herbicidas, podem ter impacto negativo sobre bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (Barroso et al., 2020). Os herbicidas são utilizados em larga escala para controlar plantas daninhas nos cultivos e correspondem a mais de 50% de todos os agrotóxicos usados em lavouras (FAO, 2024).

Os herbicidas fluazifop-p-butil (Fusilade®) e a mistura de glyphosate + s-metolachlor (Sequence®) são registrados para a cultura da soja, sendo o fluazifop-p-

butil para controle de gramíneas em pós-emergência e o glyphosate + s-metolachlor para controle de gramíneas e folhas largas em pré-emergência e pós-emergência de variedades tolerantes ao glyphosate (MAPA/Agrofit, 2024). Ambos são utilizados como opções para controle de plantas daninhas resistentes ao glyphosate isolado. Porém, avaliações quanto aos impactos negativos destes herbicidas em bactérias fixadoras de nitrogênio ainda são escassos.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos herbicidas fluazifop-p-butil (Fusilade®) e a mistura de glyphosate + s-metolachlor (Sequence®) sobre o crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* BR029.

Material e Métodos

Localização

O trabalho foi realizado nos Laboratórios de Fitopatologia do Departamento de Agronomia, de Microbiologia do Departamento de Engenharia Florestal e no de Imunologia do Centro Integrado de Pesquisa e Saúde da UFVJM. O experimento foi esquematizado em um delineamento inteiramente casualizado com oito repetições.

Ensaio de crescimento bacteriano

A bactéria isolada *Bradyrhizobium elkanii* (BR 29) é um isolado da Embrapa Agrobiologia, foi adquirida da Universidade Federal de Lavras e foram ativadas em meio YMA sólido, em placas de Petri, mantidas em BOD a 28°C. As bactérias foram multiplicadas em meio líquido YMA contendo (sacarose, K₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄, NaCl, extrato de levedura, KOH, azul de bromotimol), e incubadas em Erlenmeyer em BOD, durante 120 horas em agitador rotatório 150 RPM. O meio de cultura utilizado para crescimento em Erlenmeyer, até alcançar a densidade ótica (DO) ideal de 10⁸ UFC ml⁻¹, foi YMA líquido, contendo sacarose, K₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄, NaCl, extrato de levedura, azul de bromotimol.

Os tratamentos foram compostos pelo meio de cultura contendo a solução de bactérias e a solução de herbicidas. Houve também um tratamento controle sem herbicida.

As soluções de herbicidas foram realizadas pela diluição dos produtos comerciais em água destilada, conforme as doses recomendadas ($0,5 \text{ L ha}^{-1}$ para fluazifop-p-butil e $2,5 \text{ L ha}^{-1}$ para glyphosate + s-metolachlor) e filtradas utilizando filtro de 30 mm de diâmetro, com membrana PES de $0,22 \mu\text{m}$, antes da adição ao meio de cultura. A leitura do crescimento bacteriano foi efetuada em placas de Elisa com 96 células e capacidade de $300 \mu\text{L}$, contendo $180 \mu\text{L}$ de inóculo com bactéria e $60 \mu\text{L}$ de herbicida. No tratamento controle foi adicionado água esterilizada no lugar do herbicida. Após isso, as placas de Elisa foram colocadas em agitação, e a avaliação de crescimento foi feita durante 120 horas em espectrofotômetro, pela absorbância, no comprimento de onda de 550 nm.

Os valores de absorbância foram transformados em Log e correlacionados às unidades formadoras de colônias (UFC), obtidas por contagem em placas, precedidas da diluição seriada da solução de Densidade Ótica (DO) conhecida. As unidades formadoras de colônias foram estimadas com a equação: $y = -5 \cdot 10^8 \cdot x^2 + 1 \cdot 10^9 \cdot x - 2 \cdot 10^8$.

Análise estatística

Os dados de crescimento bacteriano foram submetidos à análise de variância a 5% de significância. Quando significativos, o crescimento bacteriano foi analisado por meio de regressão linear simples e os dados de densidade celular máxima diferenciados por meio de teste Tukey, ambos a 5% de significância.

Resultados e Discussão

Todos os tratamentos apresentaram um ajuste de modelo quadrático, com aumento do crescimento entre 70 e 80 horas e decréscimo de crescimento a partir deste momento (Figura 1).

O *Bradyrhizobium* é um gênero utilizado em associação com a soja a muitos anos, com eficiência na fixação biológica de nitrogênio (FBN) (HUNGRIA E MENDES, 2015). Agrotóxicos afetam o crescimento e funcionalidade de bactérias diazotróficas (BANKS et al., 2014; BARROSO et al., 2020). A identificação de herbicidas menos tóxicos a essas bactérias é fundamental para a promoção do

manejo sustentável de plantas daninhas e garantindo o suprimento de nitrogênio pela FBN.

O comportamento de crescimento normal de uma bactéria geralmente é explicado por um modelo sigmoidal, que corresponde às fases de crescimento (BUKHMANN et al., 2015). Esses modelos caracterizam as fases Lag (de latência), exponencial (multiplicação celular), estacionária (população constante) e de morte celular (PANDEY et al., 2016). Nossos resultados foram melhores ajustados ao modelo quadrático e isso aconteceu, possivelmente, devido ao intervalo de quatro horas entre a primeira e segunda avaliação neste experimento, não sendo suficiente para identificar a fase de latência. A fase Lag pode durar apenas minutos, dificultando sua identificação e gerando a necessidade de utilizar outros modelos lineares (PELEG et al., 2011), como o quadrático.

O herbicida fluazifop-p-butil diminui a taxa de crescimento bacteriano ao longo das 120 horas de avaliação quando comparado ao tratamento controle, sem herbicida (Figura 1).

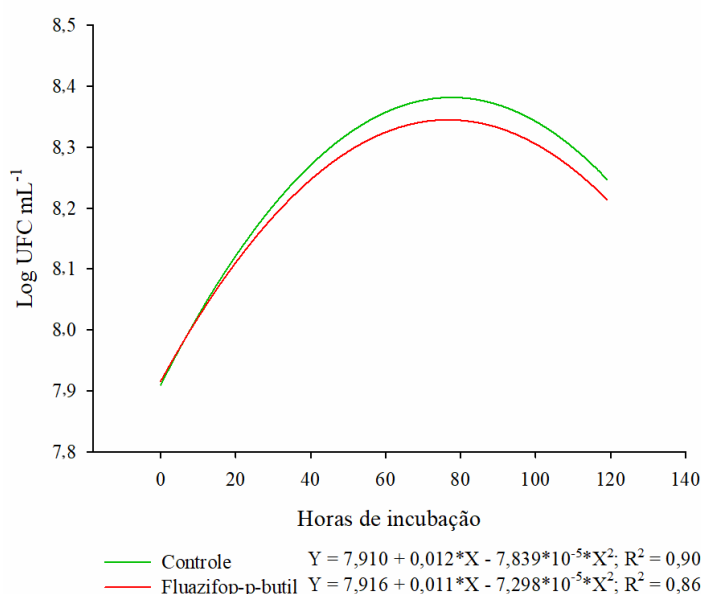


Figura 1. Curva de crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* (Log UFC mL⁻¹) ao longo do tempo (horas) em tratamento contendo herbicida fluazifop-p-butil e tratamento controle.

O herbicida fluazifop-p-butil tem como mecanismo de ação em plantas a inibição da enzima Acetil-CoA carboxilase (ACCase), interferindo assim na síntese

de ácidos graxos, evitando a produção de fosfolípidos necessários para o crescimento celular (MENDES E SILVA, 2023). Com a falta de lipídeos tem-se a despolarização da membrana celular (MENDES E SILVA, 2023). A ACCase é vital para a biossíntese de ácidos graxos, que é necessária para a formação da membrana celular bacteriana e para o crescimento geral da célula (CHENG et al., 2009), desta forma, sua inibição pode ter causado a diminuição do crescimento de *B. elkanii*.

A taxa de crescimento da bactéria *Bradyrhizobium elkanii* foi menor no tratamento contendo a mistura dos herbicidas glyphosate + s-metolachlor do que no tratamento controle durante o período de tempo analisado (Figura 2).

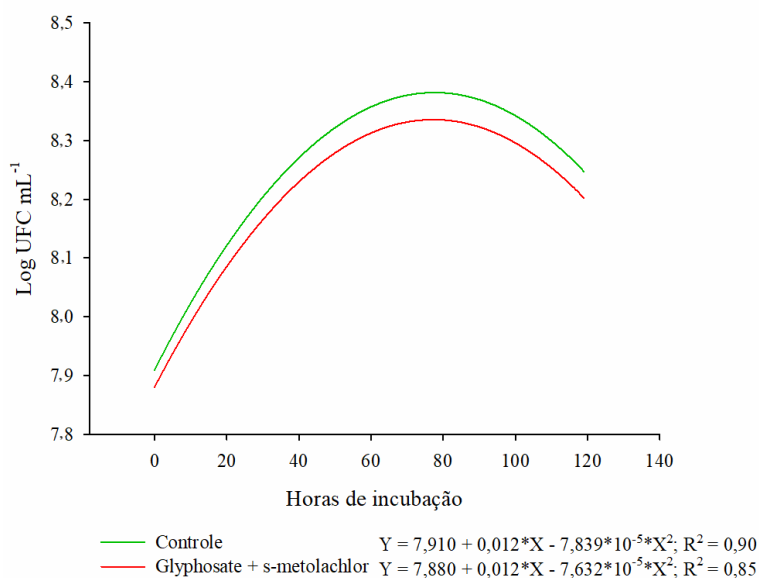


Figura 2. Curva de crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* (Log UFC mL⁻¹) ao longo do tempo (horas) em tratamento contendo herbicidas glyphosate + s-metolachlor e tratamento controle.

A menor taxa de crescimento bacteriano com a mistura de glyphosate + s-metolachlor também pode ser explicada devido ao mecanismo de ação do herbicida. O glyphosate bloqueia a ação da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) em plantas, uma enzima que participa da rota do chiquimato, a qual também é encontrada em bactérias (TOHGE et al., 2013). Esse herbicida já foi relatado como inibidor dessa via metabólica em *Bradyrhizobium* (SANTOS et al., 2005). Quando o glyphosate afeta processos comuns entre plantas e

microrganismos, há um risco elevado de intoxicação (GONZALEZ et al., 1996), o que pode prejudicar o crescimento microbiano. A inibição da EPSPS em microrganismos causa a interrupção da produção de proteínas (ARISTILDE et al., 2017) e diminui os níveis da proteína DnaA, que é responsável por iniciar a replicação do DNA bacteriano, processo necessário para a divisão celular (LEONARD E GRIMWADE, 2011).

O Mecanismo ação s-metolachlor em plantas está relacionado à inibição do crescimento inicial, por meio do impedimento da síntese de ácidos graxos de cadeia muito longa (MENDES E SILVA, 2023). O s-metolachlor inibe o crescimento e prejudica a atividade respiratória de bactérias (PEREIRA et al., 2009), o que pode ter afetado o crescimento de *Bradyrhizobium elkanii*.

A densidade celular máxima de *Bradyrhizobium elkanii* ao final das 120 horas foi menor nos tratamentos contendo fluazifop-p-butil e glyphosate + s-metolachlor do que no tratamento controle (Figura 3).

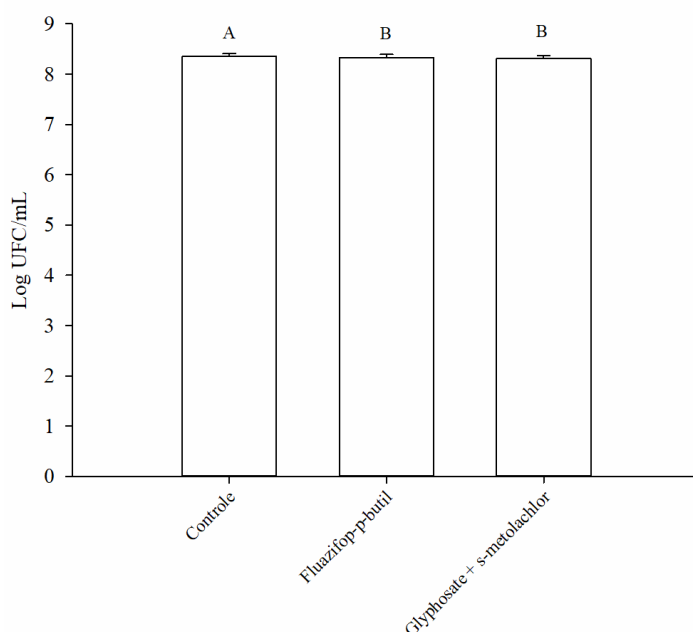


Figura 3. Densidade Celular Máxima de *Bradyrhizobium elkanii* (Log UFC mL⁻¹) em tratamentos contendo os herbicida fluazifop-p-butil e glyphosate + s-metolachlor e tratamento controle. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A menor densidade máxima celular em ambos os tratamentos com herbicidas pode ser relacionado ao estresse causado por substâncias químicas. A aplicação de herbicidas pode causar efeitos negativos aos microrganismos do solo (SANTOS et al, 2005), isto porque as condições de estresse provocadas por um composto químico reduzem a eficiência do uso de carbono e energia devido à utilização de parte da energia disponível para manter mecanismos de tolerância molecular e bioquímica nos microrganismos (SCHIMEL et al, 2007).

Procópio et al (2011) descreve em seu trabalho a redução da atividade de crescimento de *Azospirillum brasiliense* em tratamentos com glyphosate e a mistura trifloxysulfuron + ametryn. Além dos efeitos negativos causados pelos ingredientes ativos puros, alguns adjuvantes, surfactantes ou outros produtos adicionados ao produto comercial, podem interferir negativamente no crescimento de microrganismo (MULLIN et al., 2016).

A tolerância de algumas bactérias aos herbicidas pode estar relacionada à atividade de enzimas específicas, que ao quebrar a molécula do herbicida resulta em algum subproduto que as bactérias podem utilizar como fonte de carbono e nitrogênio, mantendo ou aumentando o seu crescimento (BARROSO et al. 2020). Os herbicidas diuron, sulfentrazone e 2,4-D foram utilizados como fonte de carbono para *Bradyrhizobium* BR 3901 e oxifluorfen como fonte de carbono e nitrogênio (BARROSO et al. 2020).

Conclusão

Os herbicidas fluazifop-p-butil e glyphosate + s-metolachlor diminuíram o crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* ao longo do tempo e a densidade celular máxima *in vitro*. Logo, pode-se considerar que essa bactéria é sensível à presença dos herbicidas em meios para seu crescimento.

Como implicação prática, o impacto negativo dos herbicidas avaliados sobre o crescimento de *Bradyrhizobium elkanii*, pode levar a uma diminuição da fixação biológica do nitrogênio em cultivos de soja que forem usados fluazifop-p-butil e glyphosate + s-metolachlor.

Referências

ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. *Plant and Soil*, v. 252, n. 1, p. 1-9, 2003.

ARISTILDE, L.; REED, M. L.; WILKES, R. A.; YOUNGSTER, T.; KUKURUGYA, M. A.; KATZ, V.; SASAKI, C. R. Glyphosate-induced specific and widespread perturbations in the metabolome of soil *Pseudomonas* species. *Frontiers in Environmental Science*, v. 5, p. 34, 2017.

BANKS, M. L.; KENNEDY, A. C.; KREMER, R. J.; EIVAZI, F. Soil microbial community response to surfactants and herbicides in two soils. *Applied Soil Ecology*, v. 74, p. 12-20, 2014.

BARROSO, G. M.; SANTOS, J. B.; OLIVEIRA, I. T.; NUNES, T. K. M. R.; FERREIRA, E. A.; PEREIRA, I. M.; SILVA, D. V.; SOUZA, M. F. Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. BR 3901 to herbicides and their ability to use these pesticides as a nutritional source. *Ecological Indicators*, v. 119, 2020.

BUKHMAN, Y. V.; DIPIAZZA, N. W.; PIOTROWSKI, J.; SHAO, J.; HALSTEAD, A. G.; BUI, M. D.; SATO, T. K. Modeling microbial growth curves with GCAT. *BioEnergy Research*, v. 8, p. 1022-1030, 2015.

CHENG, C. C.; SHIPPS JR, G. W.; YANG, Z.; SUN, B.; KAWAHATA, N.; SOUCY, K. A.; BLACK, T. Discovery and optimization of antibacterial AccC inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 19, n. 23, p. 6507-6514, 2009.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: grãos. Safra 2021/22, 12º Levantamento. V. 9, n. 12.

EMBRAPA. Adubação Verde: Utilização de leguminosas contribui no fornecimento de nitrogênio para culturas de interesse comercial e protege solo da erosão. Seropédica, RJ: Embrapa, 2011.

FAO - Food and Agriculture Organization. Acesso em 16 de maio de 2024. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data>.

GAZZONI, D. L. A soja no Brasil é movida por inovações tecnológicas. *Ciência e Cultura*, v. 70, n. 3, p. 16-18, 2018.

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

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? *Biological Nitrogen Fixation*, p. 1009-1024, 2015.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007.

LEONARD, A. C.; GRIMWADE, J. E. Regulation of DnaA assembly and activity: taking directions from the genome. *Annual Review of Microbiology*, v. 65, p. 19-35, 2011.

MAPA/Agrofit. Ministério da Agricultura e Pecuária. Acesso em 16 de maio de 2024. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.

MENDES, K. F.; DA SILVA, A. A. Plantas daninhas: herbicidas. São Paulo: Oficina de Textos, 2023.

MULLIN, C. A.; FINE, J. D.; REYNOLDS, R. D.; FRAZIER, M. T. Toxicological risks of agrochemical spray adjuvants: organosilicone surfactants may not be safe. *Frontiers in Public Health*, v. 4, p. 92, 2016.

OLIVEIRA, G.; HECHT, S. Sacred groves, sacrifice zones and soy production: globalization, intensification and neo-nature in South America. *The Journal of Peasant Studies*, v. 43, n. 2, p. 251-285, 2016.

PANDEY, P. P.; JAIN, S. Analytic derivation of bacterial growth laws from a simple model of intracellular chemical dynamics. *Theory in Biosciences*, v. 135, p. 121-130, 2016.

PELEG, M.; CORRADINI, M. G. Microbial growth curves: what the models tell us and what they cannot. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 51, p. 917-945, 2011.

PEREIRA, S. P.; FERNANDES, M. A.; MARTINS, J. D.; SANTOS, M. S.; MORENO, A. J.; VICENTE, J. A.; JURADO, A. S. Toxicity assessment of the herbicide metolachlor: comparative effects on bacterial and mitochondrial model systems. *Toxicology In Vitro*, v. 23, n. 8, p. 1585-1590, 2009.

PROCÓPIO, S. D. O.; FERNANDES, M. F.; TELES, D. A.; SENA FILHO, J. G.; CARGNELUTTI FILHO, A.; VARGAS, L.; SANT'ANNA, S. A. C. Toxicidade de herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar à bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense*. *Planta Daninha*, v. 29, p. 1079-1089, 2011.

SANTOS, J. B.; FERREIRA, E. A.; KASUYA, M. C. M.; DA SILVA, A. A.; PROCÓPIO, S. O. Tolerance of *Bradyrhizobium* strains to glyphosate formulations. *Crop Protection*, v. 24, n. 6, p. 543-547, 2005.

SCHIMEL, J. P.; BALSER, T. C.; WALLENSTEIN, M. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology*, v. 88, n. 6, p. 1386-1394, 2007.

TOHGE, T.; WATANABE, M.; HOEFGEN, R.; FERNIE, A. R. Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. *Frontiers in Plant Science*, v. 4, p. 62, 2013.

Processo de Avaliação por Pares: (*Blind Review* - Análise do Texto Anônimo)

Revista Científica Vozes dos Vales - UFVJM - Minas Gerais - Brasil

www.ufvjm.edu.br/vozes

QUALIS/CAPES - LATINDEX: 22524

ISSN: 2238-6424