



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GUILHERME VOLANTE GARCIA

**COMUNIDADE MICROBIANA DA RIZOSFERA DO MILHO Bt
YieldGard VTPRO 2**

GUILHERME VOLANTE GARCIA

**COMUNIDADE MICROBIANA DA RIZOSFERA DO MILHO Bt
YieldGard VTPRO 2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho.

Londrina
2012

Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G216c	<p>Garcia, Guilherme Volante. Comunidade microbiana da rizosfera do milho Bt YieldGard VTPRO 2 / Guilherme Volante Garcia. – Londrina, 2012. 34 f.: il.</p> <p>Orientador: Galdino Andrade Filho. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2012. Inclui bibliografia.</p> <p>1. Microbiologia do solo – Teses. 2. Milho – Teses. 3. Plantas transgênicas – Teses. 4. Solos – Enzimas – Teses. 5. Microorganismos do solo – Teses. I. Andrade Filho, Galdino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 631.461</p>
-------	--

GUILHERME VOLANTE GARCIA

**COMUNIDADE MICROBIANA DA RIZOSFERA DO MILHO Bt
YieldGard VTPRO 2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de mestre em agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Galdino Andrade Filho
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Gerson
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira
INESUL – Londrina - PR

Londrina, 23 de março de 2012.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida, sempre dando-me coragem, força e sabedoria para superar todos os obstáculos de minha caminhada.

Ao meu orientador Galdino Andrade Filho, pela orientação e ajuda na formação de minha opinião crítica no meio acadêmico, mas sobretudo, pela amizade sincera para com a minha pessoa desde o primeiro contato dentro da Universidade.

A Carina, Junior e Flávia, amigos os quais fiz desde a chegada no Laboratório de Microbiologia, e que agradeço imensamente pelo privilégio de conviver intensamente e pelo aprendizado adquirido por tal convívio.

Ao Dr. Dionizio Gazziero, pela amizade, companheirismo e ajuda na atividade acadêmica, ao qual eu sou muito grato.

A Gravena Ltda em nome do professor Santin Gravena e todos colaboradores, assim como ao Dr. Luis Favoretto representando a Monsanto do Brasil, pessoas que me ajudaram para que o trabalho fosse realizado da melhor forma e com agilidade, tenho grande consideração e gratidão.

Em especial, à Monique Ferreira Fengler e Viviana Cely Torres pela consideração, paciência, conselhos, ensinamentos e força transmitidos à minha pessoa, a qual serei eternamente agradecido.

Finalmente à todas as demais pessoas que participaram comigo neste mestrado.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”. (Chales Chaplin).

GARCIA, Guilherme Volante Garcia. **Comunidade microbiana da rizosfera do milho Bt YieldGard VTPRO 2**. 2011. 34 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

O milho YieldGard VTPRO2[®] foi produzido através da transformação do híbrido LH172 mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Esta variedade de milho transgênico produz as proteínas Cry1A105 e Cry2Ab2 derivadas da bactéria de solo *Bacillus thuringiensis*. Estas proteínas são ativas contra lepidóptero-praga importantes na cultura do milho como a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e a lagarta da espiga (*Helicoverpa zea*). Apesar dos benefícios das culturas transgênicas, alguns questionamentos têm sido levantados sobre o risco ambiental de sua utilização em sistemas intensivos. Entre estas preocupações incluem efeitos negativos sobre a dinâmica do solo. Considerando que o solo constitui um ambiente caracterizado por sustentar uma enorme diversidade de organismos que interagem entre si e exercem funções fundamentais à manutenção da fertilidade, à nutrição e proteção das plantas, e que os potenciais impactos das culturas transgênicas teriam uma influência direta sobre este ecossistema; este trabalho teve como objetivo principal, avaliar em campo, a influência do milho transgênico YieldGard VTPRO2[®] sobre alguns indicadores biológicos da qualidade do solo, em relação com a sua variedade parental. O experimento foi instalado em campo no município de Rolândia (PR); com delineamento experimental inteiramente ao acaso. As avaliações foram feitas em três tempos de amostragem (45, 90, 120 dias após a germinação), em cada tempo, a partir do solo rizosférico coletado foram avaliados parâmetros como: populações de grupos funcionais de micro-organismos (bactérias diazotróficas, fungos micorrízicos, protozoários ciliados e flagelados); biomassa microbiana do solo, respiração basal, quociente metabólico (qCO_2) e atividade enzimática (urease, asparaginase, celulase, amilase e fosfatase ácida). Os grupos funcionais de micro-organismos não tiveram diferença significativa entre o milho Bt e a variedade convencional, porém durante o crescimento da planta houve variação na população de ciliado. A respiração basal mostrou diferença significativa somente durante o tempo de 120 dias após emergência, já o coeficiente metabólico apresentou diferenças entre as plantas Bt e convencional e também durante o crescimento da planta do milho. As enzimas do solo apresentaram a mesma atividade na rizosfera do milho Bt e convencional. Apesar da pouca influência significativa do milho Bt sob os parâmetros avaliados, estudos locais em longo prazo são necessários para conclusão dos efeitos positivos ou negativos sobre a microbiota do solo.

Palavras-chave: Milho Bt. Rizosfera. YieldGard. Atividade microbiana. Enzimas do solo. Análise de risco.

GARCIA, Guilherme Volante. **Assessing the impact of GM maize - YieldGard VTPRO2 - on the soil microbiota**. 2011. 34 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

The maize YieldGard VTPRO2® was produced by transforming the hybrid LH172 mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. This variety of transgenic maize produces proteins and Cry1a105 Cry2Ab2 derived from the soil bacterium *Bacillus thuringiensis*. These proteins are active against lepidopteran pests in maize important as the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) and the maize earworm (*Helicoverpa zea*). Despite the benefits of gm crops, some questions have been raised about the environmental risk of their use in large scale. These concerns include negative effects on soil microbes. Considering that soil is an environment characterized by supporting a wide diversity of organisms that interact and play key roles for the maintenance of fertility, nourishment and protection of plants, and the potential impacts of gm crops would have a direct influence on this ecosystem, this study aimed to assess in the field, the influence of transgenic maize YieldGard® VTPRO2 on some biological indicators of soil quality, compared with its parental variety. The field experiment was conducted in the municipality of Rolândia (PR), with completely randomized experimental design. Assessments were made at three sampling times (45, 90, 120 days), each time from the rhizosphere soil collected parameters were evaluated as populations of functional groups of microorganisms (diazotrophic bacteria, mycorrhizal fungi, ciliates and flagellates protozoa), microbial biomass, basal respiration, metabolic quotient (qCO_2) and enzyme activity (urease, asparaginase, cellulase, amylase and acid phosphatase). The functional groups of microorganisms showed no significant difference between the bt variety and conventional, but during the plant growth was variation in the ciliated. The basal respiration showed significant differences only during the time 120 since the coefficient showed metabolic differences between Bt and conventional plants and also during the growth of maize. The soil enzymes showed the same activity at rhizosphere of Bt maize and conventional. Despite the lack of significant effect of Bt corn in the evaluated parameters, local long-term studies are needed to complete the positive or negative effects on soil microbiota.

Keywords: Maize Bt. Rhizosphere. YieldGard. Microbial community. Soil enzymes. Risk Analysis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Avaliações microbiológicas na rizosfera de milho convencional e milho transgênico (Bt) durante um ciclo da cultura. (A) População de bactérias diazotróficas; (B) Colonização micorrízica; (C) População de protozoários flagelados; (D) População de protozoários ciliados. Barras seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de t ($p < 0.05$).....32
- Figura 2** – Biomassa e atividade microbiana na rizosfera de milho convencional e milho transgênico (Bt) durante um ciclo da cultura. (A) Carbono da biomassa; (B) Respiração basal; (C) Quociente metabólico. Barras seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de t ($p < 0,05$). DMS: Diferença mínima significativa pelo teste de t ($p < 0.05$)33
- Figura 3** – Atividade enzimática na rizosfera de milho convencional e milho transgênico durante um ciclo da cultura. (A) Urease; (B) Asparaginase; (C) Celulase; (D) Amilase; (E) Fosfatase ácida. DMS: Diferença mínima significativa pelo teste de t ($p < 0.05$)34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 CULTURAS TRANSGÊNICAS.....	12
2.2 INDICADORES BIOLÓGICOS DA QUALIDADE DO SOLO	14
2.3 PARÂMETROS BIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS	15
2.3.1 Grupos Funcionais de Micro-Organismos.....	15
2.3.2 Biomassa Microbiana do Solo	16
2.3.3 Respiração Basal do Solo.....	16
2.3.4 Quociente Metabólico (qCO_2).....	17
2.3.5 Atividade Enzimática	17
3 REFERÊNCIAS	19
4 ARTIGO: ESTUDO DA DINÂMICA DA RIZOSFERA DO MILHO TRANSGÊNICO YIELDGARD VTPRO 2	22
REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

No Brasil são produzidas em média, 56 milhões de toneladas de grãos de milho (*Zea mays*) por ano, provenientes de aproximadamente 57% da área nacional ocupada com cultivo de cereais. Por ser uma fonte barata de carboidratos, proteínas e óleo, com uma ampla distribuição geográfica, o milho não somente é utilizado de forma direta na dieta humana e de animais, como também possui alto valor industrial para produção de bebidas, medicamentos, tintas, plásticos, explosivos, etc.

Assim, considerada como uma importante cultura para as necessidades atuais da sociedade moderna, a demanda de consumo e de mercado de milho, vem sofrendo contínuo aumento, tanto em níveis nacionais como mundiais. A própria elevação do consumo de derivados de aves e suínos exige indiretamente aumento na disponibilidade de milho, devido à sua incorporação nas rações de crescimento. Para enfrentar tal situação com auto-suficiência e independência tecnológica, é necessário incrementar a produtividade da cultura por área plantada, tanto com estratégias de redução de custos quanto com incorporação de novas tecnologias ao processo de produção, neste contexto, torna-se fundamental o desenvolvimento de germoplasma mais produtivo e adaptado aos diversos sistemas de cultivo, bem como a condições edafo-climáticas marginais, sujeitas a inúmeros fatores bióticos e abióticos de estresse à cultura.

Dentre os fatores bióticos, as pragas podem reduzir o rendimento e qualidade da produção na cultura do milho. Destaca-se nesse contexto, a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), a lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea*) e a broca-do-colmo (*Diatraea saccharalis*) estimando que essas três espécies causam danos de até 34% na produção de grãos de milho.

A espécie bacteriana de solo *Bacillus thuringiensis*, muito conhecida pela sua forma abreviada Bt, é de ocorrência cosmopolita, sendo encontrada nos mais diversos ecossistemas do planeta. O gênero *Bacillus* possui uma fase de esporulação característica no seu desenvolvimento, na qual o esporo bacteriano e cristais protéicos são simultaneamente formados.

Inseticidas à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), têm sido usados em muitas regiões do mundo para eliminar pragas de lepidópteros em hortaliças e culturas, e mais recentemente, para o controle de besouros e larvas de

mosquitos vetores de doenças. O sucesso das formulações com Bt baseia-se na alta eficácia e diversidade de proteínas inseticidas que são ativas contra uma gama de pragas, a toxicidade restrita sobre insetos-alvo, facilidade de produção em massa a um custo relativamente baixo, adaptabilidade à formulação convencional e a tecnologia de aplicação.

O primeiro gene da toxina Bt foi clonado em meados da década de 80, o que levou rapidamente para o desenvolvimento das primeiras plantas transgênicas Bt. Desde então, a maioria das principais culturas que sofrem danos econômicos substanciais por pragas como as lagartas e/ou besouro estão sendo modificadas geneticamente para produzir toxinas Bt para o controle desses insetos-pragas.

Raças adaptadas da lagarta-do-cartucho (*S. frugiperda*) compõem uma das mais importantes pragas que afetam genótipos tropicais de milho. Tradicionalmente, o controle de tal praga é realizado com base em inseticidas químicos, que, intrinsecamente, podem trazer conseqüências colaterais negativas em termos de toxicidade ao homem, animais e ao meio-ambiente em geral. Historicamente, o uso abusivo e impróprio desses produtos sintéticos nos últimos 40 anos causou vários problemas ambientais e de saúde, ameaçando a sustentabilidade do sistema de produção agrícola convencional.

O milho híbrido com a Tecnologia YieldGard VTPRO2[®], da Monsanto, designado MON 89034 que expressa as proteínas Bt Cry1A105 e Cry2Ab2 tem como característica, resistência durante todo o ciclo da cultura a algumas espécies de insetos praga da Ordem Lepidóptera, promovendo o controle eficaz contra a *S. frugiperda* e proteção significativa sobre *H. zea* (lagarta-da-espiga).

O modo de ação das proteínas Cry difere completamente dos modos de ação dos conhecidos inseticidas químicos sintéticos, fazendo com que essas proteínas sejam elementos chaves para auxiliar no manejo integrado de pragas por meio de sua aplicação foliar sobre as plantas ou, como mais recentemente, pela expressão dessas toxinas em plantas transgênicas.

As proteínas Cry apresentam ação extremamente tóxica para larvas de várias ordens como Lepidóptera, Coleóptera, Díptera, Himenóptera, Homóptera, Ortóptera e algumas espécies das ordens Nematoda, Protozoa e Acari.

Plantas transgênicas podem liberar essas novas proteínas no ecossistema do solo proporcionando a interação da microbiota do solo com o produto dos transgenes.

Portanto, este trabalho teve como objetivo principal avaliar a campo, a influência do milho transgênico sobre os grupos funcionais de micro-organismos do solo, em relação a sua variedade parental.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CULTURAS TRANSGÊNICAS

A agricultura é a atividade econômica mais antiga e importante do planeta. Desde seus primórdios, há aproximadamente 10 mil anos, baseia-se na interferência do homem no ecossistema, inicialmente visando à maior extração e coleta de materiais essenciais à sobrevivência e, atualmente, à produção de alimentos e materiais de valor econômico (EL FEKY, 2000).

Dentre os cereais cultivados no Brasil, o milho é o mais expressivo, com cerca de 56 milhões de toneladas de grãos produzidos em uma área de aproximadamente 13,7 milhões de hectares (CONAB, 2011) referente a duas safras, normal e safrinha.

Estima-se que apesar dos 2,5 milhões de toneladas de defensivos agrícolas aplicados na agricultura mundial, mais de 40% do potencial de produção foram perdidos no campo em razão do ataque de insetos, plantas daninhas e patógenos (PAOLETTI, 2001).

Ao longo de décadas, importantes resultados foram obtidos pelos processos de produção agrícola, porém com elevado impacto ambiental em virtude do desmatamento e manejo inadequado do solo, como o superpastejo, salinização, compactação, erosão, perda de fertilidade e a contaminação com agroquímicos (TILMAN et al., 2001). Para reverter esse cenário, faz-se necessária a incorporação constante de avanços científicos e tecnológicos na agricultura, assim como mudanças políticas (HUANG et al., 2002). Desta forma, buscam-se alternativas que atendam os princípios básicos da sustentabilidade e que, ao mesmo tempo, garantam a produção do ponto de vista econômico, social e ecológico (TILMAN et al., 2002).

A descoberta das leis da hereditariedade, bem como a natureza química e a decifração do material genético, foi imprescindível para o advento da biotecnologia moderna. Na esfera agrícola, utiliza-se principalmente a tecnologia do DNA recombinante para a obtenção de plantas geneticamente modificadas (OGM) (MANN, 1999). Esta técnica constitui uma alternativa para as limitações impostas por estresses bióticos e abióticos, especialmente em áreas de baixa produtividade

(HERRERA-ESTRELLA, 2000), além de ampliar o poder de manipulação dos organismos.

A técnica do DNA recombinante estabeleceu novos horizontes na utilização da variabilidade genética natural, pois incorpora genes de uma espécie no genoma de outra sem a necessidade da reprodução sexual. Esta metodologia constitui um processo mais rápido e mais preciso que o melhoramento convencional, pois permite a introdução de um único gene e a modificação de uma característica específica (THE ROYAL SOCIETY, 2002).

A transgenia vegetal pode ser realizada de forma direta, por processos físico-químicos como eletroporação, microinjeção e bombardeamento com micropartículas, ou indireta, quando o DNA exógeno é inserido no genoma vegetal por meio de um vetor biológico como plasmídeo de bactérias do solo *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes*. A resistência das plantas transgênicas a insetos, patógenos ou herbicidas possibilitou a redução no uso de defensivos agrícolas e, conseqüentemente, menor gasto de produção por parte do agricultor (THE ROYAL SOCIETY, 2002). Outras vantagens da transgenia incluem: maior variedade de produtos, maior disponibilidade dos mesmos ao longo do ano, menores preços para os consumidores e a produção de culturas enriquecidas com nutrientes. O aumento do rendimento *per hectare* também pode impedir novas conversões de áreas naturais em campos agrícolas (JAMES, 2003; STOTZKY, 2006).

Tomando o milho Bt como exemplo, entre 1996 e 2010, a redução do uso de ingredientes ativos foi da ordem de 2,0 milhões Kg de inseticidas nessa cultura geneticamente modificada resistente a insetos (CELERES AMBIENTAL, 2011). Os benefícios gerados pelas culturas Bt têm revolucionado a agricultura (SHELTON et al., 2002). Os genes *cry* oriundos de *B. thuringiensis* têm sido introduzidos com sucesso nas principais culturas utilizadas na alimentação humana e animal.

O milho YieldGard VTPRO2[®] designado Milho MON 89034 foi produzido através da transformação do híbrido LH172, mediado por *A. tumefaciens* utilizando o plasmídeo binário PV-ZMIR245 contendo os genes Cry1A.105 e Cry2Ab2, os quais são bastante conhecidos e caracterizados como proteínas inseticidas derivadas da bactéria de solo *B. thuringiensis*. Estas proteínas são ativas contra lepidóptero-praga importantes na cultura do milho tais como a lagarta-do-

cartucho (*S. frugiperda*) durante a safra, e a lagarta-da-espiga (*H. zea*). O milho MON 89034 transgênico teve a liberação do cultivo comercial no Brasil em outubro de 2009 (CTNBIO, 2011). Contudo, as considerações do impacto relacionadas às proteínas sobre insetos e organismos do solo não alvo foram baseadas em estudos feitos com a proteína Cry1Ab produzida pelo milho MON 810.

Apesar dos benefícios das culturas transgênicas, inúmeros questionamentos têm sido levantados sobre o risco ambiental de sua utilização em grande escala (WILLIAMSON, 1992). Estas preocupações, muitas das quais referentes ao milho Bt, incluem a seleção de pragas Bt resistentes, impactos sobre organismos não-alvo e/ou de interesse econômico (HEAD et al., 2002), efeitos negativos sobre a microbiota do solo e o escape dos transgenes para as culturas parentais selvagens (SIQUEIRA et al., 2004).

2.2 INDICADORES BIOLÓGICOS DA QUALIDADE DO SOLO

O solo sustenta uma enorme diversidade de organismos que interagem entre si e exercem funções fundamentais à manutenção da fertilidade do solo, à nutrição e proteção das plantas. Constitui um ambiente heterogêneo, descontínuo e caracterizado por uma vasta e diversa comunidade biológica composta por bactérias, fungos, algas, partículas virais e organismos macroscópicos (TORSVIK e OVREÅS, 2002), com complexas interações ecológicas essenciais ao funcionamento dos ecossistemas terrestres, sendo a sua preservação uma das principais bases da sustentabilidade ambiental. A quantidade e variedade do número de organismos no solo são variáveis de acordo com as diferenças regionais, as técnicas de amostragem, microsítios dentro de um mesmo ecossistema e evidentemente pelo tipo de uso do solo. Este complexo emaranhado de relações entre microflora, fauna, condições ambientais, substrato e material orgânico disponível é o que permite a colonização do solo por inúmeros organismos, sendo que a exclusão ou eliminação de um ou outro grupo traz prejuízos a toda a cadeia trófica estabelecida (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

A comunidade microbiana do solo tem papel essencial na ciclagem de nutrientes, e o estudo dos grupos funcionais busca elucidar os processos biogeoquímicos e sua relação com o desenvolvimento de plantas (ANDRADE, 2004; LEMINTH et al., 2005; THOMAS e KEVAN, 1993). Os micro-organismos possuem

papel indispensável ao equilíbrio do ecossistema e constituem importantes bioindicadores de qualidade de solo devido à sua capacidade de fornecer informações precisas e imediatas referentes a pequenas alterações impostas ao ambiente (DICK e TABATABAI, 1993, VARGAS e SCHOLLES, 2000; VELASQUEZ et al., 2007).

Os bioindicadores microbiológicos podem ser úteis para determinar os efeitos positivos e negativos sobre a qualidade do solo e a sustentabilidade das práticas agrícolas. Por isso, constituem uma importante ferramenta no esclarecimento dos possíveis efeitos das plantas transgênicas sobre o ambiente, estudo necessário para o estabelecimento de práticas menos impactantes à saúde ambiental e humana. Alguns dos parâmetros biológicos e bioquímicos usados na avaliação da qualidade do solo são: grupos funcionais de microorganismos, biomassa microbiana do solo, respiração basal do solo, quociente metabólico e atividade enzimática.

2.3 PARÂMETROS BIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

2.3.1 Grupos Funcionais de Micro-organismos

Os grupos funcionais de micro-organismos do solo estão presentes em diversos ambientes e interagem diretamente com as raízes das plantas participando de seu crescimento e nutrição. Os micro-organismos são um dos indicadores mais sensíveis e úteis na avaliação de ambientes quanto a seu nível de degradação, uma vez que a diversidade pode ser afetada rapidamente em função de estresses no ecossistema. A alta diversidade da microbiota do solo está geralmente associada à elevada estabilidade da comunidade microbiana, onde cada população desempenha um papel funcional que determina a manutenção dos fluxos de matéria e de energia em cada nível trófico de um ecossistema (LEMINTH et al., 2005). Os micro-organismos do solo podem ser classificados em grupos funcionais de acordo com os processos biológicos que realizam no ecossistema, desta forma são separados considerando a sua capacidade de transformar compostos orgânicos, assim como na utilização de formas inorgânicas.

Alguns dos grupos funcionais de micro-organismos mais importantes no solo são: i) relacionados ao ciclo do N (amonificadores, proteolíticos, fixadores de

nitrogênio, desnitrificantes, nitratores e nitritadores); ii) relacionados ao ciclo do C (celulolíticos, amilolíticos) e iii) relacionados ao ciclo do fósforo (solubilizadores de fosfato e fungos micorrízicos). Outro grupo importante para a dinâmica do solo são os protozoários. Os protozoários podem ser classificados em três grupos, flagelados, amebas e ciliados, mesmo que o papel dos protozoários no solo seja ainda pouco conhecido, sabe-se que estes são importantes na manutenção da disponibilidade de nitrogênio para as plantas através de processos de mineralização e também desempenham uma importante função no controle de populações bacterianas, os protozoários podem consumir 150-900 g de bactérias $m^{-2} \text{ano}^{-1}$, isto significa que através da depredação de bactérias ajudam na manutenção da dinâmica de absorção e mineralização do nitrogênio no ambiente (ANDRADE, 2004).

2.3.2 Biomassa Microbiana do Solo

Definida como a parte viva da matéria orgânica do solo, incluindo bactérias, actinomicetos, fungos, protozoários, algas e microfauna (JENKINSON; LADD, 1981). A biomassa microbiana do solo é uma estimativa da massa microbiana viva total, com base na concentração de algum elemento químico ou alguma substância intracelular e pode ser relacionada com outros atributos como a atividade respiratória ou enzimática do solo, facilitando a interpretação da condição funcional da biomassa microbiana (ZILLI et al., 2003). Este é considerado um componente instável da matéria orgânica, que tem a atividade influenciada pelas condições bióticas e abióticas, podendo ser boa indicadora das alterações resultantes do manejo do solo (BALOTA, et al., 1998).

2.3.3 Respiração Basal do Solo

Considerada como a soma total de todas as funções metabólicas na qual o CO_2 é produzido, sendo as bactérias e os fungos responsáveis pela maior liberação de CO_2 via degradação da matéria orgânica. Este método permite verificar se as condições climáticas, o manejo do solo e a presença de elementos poluentes influenciam a atividade microbiana durante a oxidação e a mineralização do carbono no solo (SILVEIRA, et al., 2004).

2.3.4 Quociente Metabólico (qCO_2)

É a razão entre a respiração basal do solo por unidade de biomassa microbiana do solo e o tempo, e tem sido usado para acessar a eficiência do uso de substrato pelos micro-organismos do solo (ANDERSON; DOMSCH, 1989), ele pode ser utilizado como sensível indicador de estresse quando a biomassa microbiana do solo é afetada. Altos valores de qCO_2 podem indicar que i) há grande quantidade de substratos orgânicos de fácil degradação, ou que ii) a comunidade microbiana se encontra em condições de estresse metabólico e apresenta baixa eficiência na obtenção de energia para a manutenção celular, precisando respirar mais para manter a mesma unidade de biomassa (ANDERSON; DOMSCH, 1993a e 1993b).

2.3.5 Atividade Enzimática

As enzimas têm participação essencial nos processos relacionados à qualidade do solo, pois é através delas que os micro-organismos degradam moléculas orgânicas complexas em moléculas simples que podem ser assimiladas. Além de permitir que os micro-organismos tenham acesso à energia e nutrientes presentes em substratos complexos, as enzimas extracelulares são responsáveis pela decomposição e mineralização de nutrientes (NAYAK et al., 2007). A escolha das enzimas a serem analisadas para avaliar a qualidade do solo, baseia-se na sensibilidade ao manejo do solo, na decomposição da matéria orgânica e na operacionalidade da análise. As enzimas mais comumente analisadas são as hidrolases ligadas aos ciclos dos principais elementos do solo como C, N, P e S. Enzimas como amilase e celulase, relacionadas ao ciclo do C, atuam na hidrólise de amido e celulose respectivamente, disponibilizando os monômeros destas moléculas como fontes de energia e carbono para os micro-organismos (DOYLE et al., 2006).

Outras enzimas que atuam no ciclo do N, como as asparaginases e ureases são responsáveis pela mineralização do nitrogênio orgânico, disponibilizando-o para as plantas e micro-organismos na forma de NH_4^+ (TABATABAI; BREMNER, 1972). Enzimas relacionadas ao ciclo do fósforo, como as fosfatases, hidrolisam formas orgânicas de fósforo liberando formas minerais para plantas e micro-organismos. As fosfatases são fundamentais na mineralização do fósforo e, conseqüentemente, na ciclagem deste nutriente no ambiente (TRASAR;

CARBALLAS, 1991). De acordo com o seu pH ótimo de ação podem ser classificadas como ácidas (pH 6,5) ou alcalinas (pH 11).

Estes indicadores da qualidade do solo devem ser utilizados em conjunto com outros atributos, físicos, químicos e biológicos, já que a funcionalidade e sustentabilidade dos diversos sistemas são determinadas pela interação destes atributos.

3 REFERÊNCIAS

ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K. H. The metabolic quotient (qCO_2) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 393-395, 1993a.

ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K. H. Ratios of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 21, n. 4, p. 471-479, 1989.

ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K. H. The metabolic quotient from CO_2 (qCO_2) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 393-395, 1993b.

ANDRADE, G. Role of functional groups of microorganisms on the rhizosphere microcosm dynamics. In: VARMA A., ABBOTT L., WERNER, D., HAMPP, R. (Org.). **Plant Surface Microbiology**. Springer-Verlag, Berlin, p. 57-69, 2004.

BALOTA, E. L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D. S.; HUNGRIA, M. Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 22, p. 641-649, 1998.

CELERES. – **Consultoria Céleres Ambiental**. 2011 Disponível em: <http://www.celeres.com.br/1/PressRelease2010_Ambiental-REV-3.pdf>. Acesso em: 01 ago. 2011.

CONAB. - **Companhia Nacional de Abastecimento**. 2011 Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/estudo_safra.pdf>. Acesso em: 01 ago. 2011.

CTNBIO. – **Comissão Técnica Nacional de Biossegurança**. 2011 Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/14254.html>>. Acesso em: 01 ago. 2011.

DICK, W. A., TABATABAI, M. A. Significance and potential uses of soil enzymes. In: BLAIN, F.J., (Ed.), **Soil Microbial Ecology Application in Agricultural and Environmental Management**, Marcel Dekker, New York, p. 95–127, 1993.

DOYLE, J.; PAVEL, R.; BARNES, G.; STEINBERGER, Y. Cellulase dynamics in a desert soil. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 38, n. 2, p. 371-376, 2006.

EL FEKY, S. Survey of agriculture and technology: growing pains. **The Economist**, London, p. 1-16, 25 mar. 2000.

HEAD, G.; SURBER, J.; WATSON, J.; MARTIN, J.; DUAN, J. (2002) No detection of Cry1Ac protein in soil after multiple years of transgenic Bt Cotton (Bollgard) use, **Environ. Entomol.** 31: 30-36.

HERRERA-ESTRELLA, L. R. Genetically modified crops and developing countries. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 124, p. 923-925, 2000.

HUANG, J.; ROZELLE, S.; PRAY, C.; WANG, Q. Plant biotechnology in China. **Science**, Washington, DC, v. 295, p. 674-676, 2002.

JAMES, R. R.; MILLER, J. C. LIGHTHART, B. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* affects a beneficial insect, the Cinnabar moth (Lepidoptera, Arctiidae). **Journal Economy Entomology**, v. 86, 334–339. 1993.

JENKINSON, D. S.; LADD, J. N. Microbial biomass in soil: Measurement and turnover. In: PAUL, E. A.; LADD, J. N., (Ed.). **Soil Biochemistry**. New York: Marcel Dekker, v. 5, p. 415-471, 1981.

LEMENIH, M.; KARLTUN, E.; OLSSON, M. Assessing soil chemical and physical property responses to deforestation and subsequent cultivation in smallholders farming system in Ethiopia. Agriculture, **Ecosystems and Environment**, v. 105, p. 373–386, 2005.

MANN, C. C. Crop scientists seek a new revolution. **Science**, Washington, DC, v. 283, p. 310-314, 1999.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 626 p, 2002.

NAYAK, D. R., BABU, J. Y., ADHYA, T. K. Long-term application of compost influences microbial biomass and enzyme activities in a tropical Aeris Endoaquept planted with rice under flooded condition. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, p. 1897–1906, 2007.

PAOLETTI, M. G. **Impact of genetically modified organisms**. Italy, 2001. 14 p. Disponível em: <<http://www.els.net/elssamplematerial/html>>. Acesso em: 02 mar. 2010.

SHELTON, A. M.; ZHAO, J.-Z.; ROUSH, R. T. Economic, ecological, food safety and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. **Annual Review Entomology**, v. 47, p. 845-881, 2002.

SILVIERA, R. B.; MELLONI, R.; PEREIRA, E. G. Atributos microbiológicos como indicadores da recuperação de áreas degradadas, no sul de Minas Gerais. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 2, n. 2, p. 21-29, 2004a.

SIQUEIRA, J. O.; TRANNIN, I. C. B.; RAMALHO, M. A. P.; FONTES, E. M. G. Interferences in the agrisystem and environmental risks of herbicide tolerant and insect protected transgenic crops. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 21, n. 1, p. 11-81, 2004b.

STOTZKY, G. Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, especially from transgenic plants. **Plant and Soil**, v. 266, p. 77–89, 2004.

TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Assay of urease activity in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 4, p. 479–487, 1972.

The Royal Society of London. Genetically modified plants for food use and human health: an update. London, 19 p. Policy document 4/02. 2002.

THOMAS, V. G.; KEVAN, P. G. Basic principles of agroecology and sustainable agriculture. **Journal of Agricultural Environment and Ethnology**, v. 5, p. 1-18, 1993.

TILMAN, D.; FARGIONE, J.; WOLFF, B.; D'ANTONIO, C.; DOBSON, A.; HOWARTH, R.; SCHINDLER, D.; SCHLESINGER, W. H.; SIMBERLOFF, D.; SWACKHAMER, D. Forecasting Agriculturally driven global environmental change. **Science**, Washington, DC, v. 292, p. 281–284, 2001.

TILMAN, D.; CASSMAN, K. G.; MATSON, P. A.; NAYLOR, R.; POLASKY, S. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, London, v. 418, p. 671-677, 2002.

TORSVIK, V.; OVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 5, p. 240- 245, 2002.

TRASAR, C. M. C.; CARBALLAS, T. Liming and the phosphatase activity and mineralization of phosphorus in an Andic soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 23, n. 3, p. 209-215, 1991.

VARGAS, L. K.; SCHOLLES, D. Biomassa microbiana e produção de CO₂ e N mineral de um Podzólico Vermelho-Escuro submetido a diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira da Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, n. 1, p. 35-42, 2000.

VELASQUEZ, E.; LAVELLE, P.; ANDRADE, M. GISQ. A multifunctional indicator of soil quality. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 39, p. 3066-3080, 2007.

WILLIAMSON, E. Environmental risks from the release of genetically modified organisms (GMOS) the need for molecular ecology. **Molecular Ecology**, v. 38, 1992.

ZILLI, J. E., RUMJANEK, N. G., XAVIER, G. R., COUTINHO, H. L. C., NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Ciência e Tecnologia**, v. 20, p. 391–411, 2003.

4 ARTIGO

ESTUDO DA DINÂMICA DA RIZOSFERA DO MILHO TRANSGÊNICO YIELDGARD VTPRO 2

Resumo

O milho Bt é uma variedade de milho transgênico que expressa as proteínas Cry1A 105 e Cry2Ab2. A avaliação do impacto das culturas transgênicas sob os micro-organismos é de grande importância devido a seu papel no equilíbrio do ecossistema. Neste trabalho foram avaliadas as populações de alguns grupos de micro-organismos (bactérias diazotróficas, protozoários e colonização micorrízica), a atividade microbiana (respiração basal, q CO₂ e biomassa microbiana) e a atividade enzimática (enzimas da mineralização do C, N e P) em condições de campo. Não foram observadas diferenças significativas desses parâmetros entre a rizosfera do milho convencional e o milho Bt. Estes resultados constituem um aporte positivo ao entendimento do impacto desta variedade transgênica sob a microbiota do solo, nos solos da região.

Introdução

O milho Bt é o milho (*Zea mays* L) foi modificado geneticamente para expressar a proteína bioinseticida (Cry) provenientes do *Bacillus thuringiensis* (Bt), tornando-o resistente a alguns grupos de insetos. O Bt é uma bactéria gram-positiva, aeróbica que produz um cristal proteico durante a esporulação na fase estacionária do crescimento. Esta inclusão pode conter um o mais tipos de proteínas inseticidas (Cry) possuem atividade frente a alguns insetos praga de diferentes culturas. Estas toxinas são classificadas em cinco famílias (I-V), quatro classes (A-D) e três subclasses (a-c) em razão a sua estrutura, genes que as codificam, entre outras características. Até hoje têm sido identificadas cerca de 60 proteínas Cry (Saxenta et al., 2010). As proteínas Cry1 e Cry2b são especificamente tóxicas para insetos do gênero Lepidoptera; já o grupo Cry2A tem toxicidade para Lepidoptera e Diptera; e as do grupo Cry3 para Coleoptera (Stotzky, 2004). O milho Bt YieldGard VTPRO2® denominado (MON 89034) produz as toxinas Cry1A 105 e Cry2Ab2 que o tornam resistente a duas espécies de inseto praga, *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa zea*.

Assim como para outras culturas transgênicas, as avaliações de risco das culturas Bt incluem efeitos ambientais adversos. São considerados efeitos

ambientais adversos a seleção de pragas Bt resistentes, impactos sobre organismos não-alvo ou de interesse econômico (Head et al., 2002), assim como efeitos negativos sobre a microbiota do solo. Em áreas de lavoura as proteínas Bt podem ser incorporadas ao solo através dos resíduos vegetais após colheita ou pela liberação em exsudados da raiz (Clarck, et al., 2005).

A liberação de toxinas Cry em exsudados da raiz de plantas transgênicas foi reportada por Saxenta & Stotzky (2000). No solo, os micro-organismos são dominantes, não somente em termos de biomassa, mas também em atividade; eles estão envolvidos em numerosos processos, incluindo a decomposição da matéria orgânica, mineralização de nutrientes, controle de fitopatógenos e manutenção da estrutura do solo.

Contudo, a estreita e dinâmica relação entre as culturas e os processos mediados por micro-organismos, leva ao contato direto destes com as proteínas Cry liberadas pelas plantas Bt, tornando possíveis eventuais alterações na dinâmica microbiológica, biodiversidade e as funções essenciais que a microbiota desempenha no ecossistema (Icoz & Stotzky, 2008).

Desde o surgimento das culturas transgênicas Bt, há existido esta preocupação e vários estudos em nível de laboratório e campo têm sido desenvolvidos com o objetivo de determinar a magnitude destes potenciais impactos. Entretanto, tendo em conta que o solo é um ecossistema complexo e com uma alta variabilidade de suas características físicas, químicas e biológicas é necessária uma avaliação a nível local para cada nova variedade de planta Bt. Tendo em conta que existem poucas avaliações neste sentido em solos brasileiros o presente trabalho teve como objetivo avaliar o impacto do milho Bt (MON 89034) sob os micro-organismos, a atividade microbiana e enzimática do solo em condições de campo.

Materiais e Métodos

Desenho experimental e amostragem

O experimento foi conduzido em condições de campo na estação experimental da Gravena no município de Rolândia (PR) - latitude de 23°17' Sul e longitude de 51°21' Oeste - com altitude aproximada de 713 m. De acordo com a

classificação climática de Köppen, o clima da região é do tipo Cfa (verão quente e chuvoso, com precipitação média anual de 1600 mm), sendo o solo da região classificado como latossolo vermelho eutroférico (EMBRAPA, 2009).

Foram considerados como tratamentos a cultura do milho transgênico (Bt) AG 7000 YieldGard VTPRO2[®] (MON 89034) e seu parental isolinha (convencional). O desenho experimental foi inteiramente ao acaso com três repetições por tratamento. As avaliações microbiológicas e bioquímicas foram feitas em três épocas durante o ciclo da cultura (45 DAE, 90 DAE e 120 DAE), a partir de amostras de solo rizosférico. A análise estatística dos resultados foi feita mediante análise de variância (ANOVA) e teste t (0.05%) utilizando o programa estatístico Statistica for Windows Version 7.0.

Análises Microbiológicas

Neste estudo foram avaliados os efeitos da cultura do milho Bt (MON 89034) sob a colonização micorrízica, as populações de bactérias diazotróficas e protozoários ciliados e flagelados, assim como, na biomassa microbiana total. Para determinação da colonização micorrízica, amostras de raízes finas foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 1 cm e submetidas ao procedimento de coloração das estruturas micorrízicas segundo Phillips & Hayman (1970). A porcentagem de colonização micorrízica foi estimada através do método de interseções em grid-line (Giovanetti & Mosse, 1980). As populações de bactérias diazotróficas e protozoários foram avaliadas pelo método NMP com cinco diluições e quatro repetições, para cada amostra. Para as bactérias diazotróficas alíquotas de 50 μ L das diluições 10^{-3} até a 10^{-7} foram incubadas em frascos contendo 5 mL de meio NFB (Dobereiner & Day, 1976) semi-sólido, após os frascos foram incubados a 28 °C por 5 dias; na avaliação foi considerado o crescimento negativo ou positivo de bactérias em cada uma das diluições inoculadas pela mudança de cor do indicador do meio. Para os protozoários flagelados e ciliados o procedimento de NMP foi feito em placas de 24 poços contendo 1.8 mL de extrato de solo, em cada poço foram inoculadas alíquotas de 200 μ L de cada diluição. Posteriormente as placas foram incubadas por quatro dias em BOD a 28 °C no escuro. A leitura foi realizada em microscópio invertido observando-se a presença ou ausência de protozoários ciliados e flagelos (Woomer, 1994).

O carbono da biomassa microbiana foi determinado pelo método de fumigação-extração de Vance et al. (1987). Após 24 horas de fumigação, foi realizada a extração com K_2SO_4 (0.5 M). O carbono orgânico no extrato de solo foi quantificado pela oxidação do dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) e posterior titulação do remanescente com sulfato ferroso amoniacal (Anderson & Ingram, 1993).

Atividade Microbiana

A atividade microbiana do solo rizosférico do milho transgênico (Bt) e convencional foi avaliada pelos métodos de respirometria e cálculo do quociente metabólico $q(CO_2)$. A respirometria consiste na estimativa da respiração basal do solo através da quantificação do dióxido de carbono (CO_2) liberado. A determinação do CO_2 foi feita pelo método de Alef (1995), no qual CO_2 é capturado por uma solução de hidróxido de sódio (NaOH 0.5M) e posteriormente quantificado por titulação com uma solução de HCl (0.5 M). O $q(CO_2)$ foi calculado pela razão entre a quantidade de CO_2 desprendida por hora e a biomassa microbiana de cada amostra (Anderson & Domsch, 1993).

Atividade Enzimática

Foi avaliada a atividade de enzimas relacionadas aos ciclos biogeoquímicos do carbono (celulase e amilase), do nitrogênio (uréase, asparaginase) e do fósforo (fosfatase ácida). A atividade das enzimas amilase e celulase foi avaliada pelo método de incubação de 10 g de solo da amostra em umidade de campo por 24 horas em 15 mL de tampão acetato de sódio (2 M) pH 5.5, na presença do substrato (amido e celulose respectivamente) a 37° C. Os açúcares redutores produto da atividade enzimática foram quantificados pelo método colorimétrico segundo Schinner & Von Mersi (1990). Para a avaliação da atividade enzimática da urease (Tabatabai & Bremner, 1972) e asparaginase (Frankenberger & Tabatabai, 1991), 1 g de cada amostra foi incubado a 37° C por 2 horas em tampão TAM (0,05M) com pH 10 na presença do substrato para cada enzima [ureia (0.2 M) e L- asparagina (0.5M) respectivamente]. Após a incubação o N amoniacal foi extraído com KCl-AgSO₄ e quantificado por destilação a vapor, com 0,2 g de óxido de magnésio (MgO) por 4 minutos em uma solução ácida a qual foi titulada com H₂SO₄

(0,5 M). A fosfatase ácida foi avaliada segundo Tabatabai & Bremner (1969), pela quantificação do p-nitrofenol produzido pela ação da enzima sob o substrato p-nitrofenilfosfato de sódio (pH 6.5) após a incubação da amostra em tampão MUB por 20 minutos a 37° C.

Resultados

Análises Microbiológicas

As bactérias diazotróficas não apresentaram grandes variações no seu tamanho populacional nos três tempos de amostragem, apresentando valores entre 4.3 – 5.2 log NMP g⁻¹, a colonização micorrízica teve o mesmo comportamento mantendo valores próximos aos 70% de colonização. A população de protozoários flagelados foi maior do que a dos protozoários ciliados tanto na rizósfera de milho Bt como na do milho convencional. Em relação às variações durante o ciclo da cultura, a população de protozoários flagelados teve uma redução em relação ao tempo, sendo maior aos 45 dias (1.9 log NMP g⁻¹) quando comparada com a população observada aos 90 e 120 dias, que não tiveram diferenças entre si. Por outro lado, a população de protozoários ciliados não apresentou diferenças significativas entre os três tempos avaliados. As análises microbiológicas realizadas nas três épocas de coleta não apresentaram diferenças significativas entre o milho convencional e o Bt (Fig. 1).

Atividade Microbiana

A respiração do solo foi maior aos 90 dias apresentando valores de 0.99 e 1.17 µg CO₂ g⁻¹ h⁻¹, para o milho convencional e o milho Bt respectivamente. A menor liberação de CO₂ g⁻¹ h⁻¹ foi observada aos 45 dias, no início do ciclo da cultura. Por outro lado, a biomassa microbiana diminuiu aos 90 dias em relação aos valores apresentados aos 45 e 120 dias. Não foi observada diferença significativa entre a biomassa microbiana total e a respiração entre as duas culturas, convencional e Bt. Porém, o quociente metabólico (qCO₂) teve diferenças significativas entre o milho Bt e convencional, sendo maior na rizosfera do milho Bt aos 90 e 120 dias (Fig. 2).

Atividade Enzimática

A atividade das enzimas do Nitrogênio aparentemente foi influenciada pelo crescimento da cultura. Aos 45 dias de crescimento o milho convencional teve uma maior atividade da urease ($129.80 \mu\text{g N g}^{-1}$) quando comparada com o milho Bt ($96.71 \mu\text{g N g}^{-1}$), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p = 0.01$). Já aos 90 dias a atividade desta enzima foi igual para as duas variedades. Aos 120 dias a atividade da urease decresceu significativamente, mas não houve diferença entre o milho Bt e convencional. Por outro lado, a atividade da asparaginase decresceu durante o crescimento do milho, mas não foi observadas diferenças entre o milho convencional e o milho Bt. A atividade da celulase e amilase (enzimas do ciclo do C) também foi influenciada pelo crescimento do milho. A celulase teve uma atividade baixa no começo do ciclo da cultura e sua maior atividade foi observada aos 90 dias, logo após este período a atividade desta enzima decresceu. Já a amilase apresentou um aumento da sua atividade durante o crescimento do milho. A atividade da celulase e a amilase apresentaram o mesmo padrão de atividade no milho convencional e Bt. Os resultados da atividade da fosfatase ácida foram inversos aos observados para a celulase, sendo menor aos 90 dias e maior aos 120 dias. A atividade da fosfatase ácida foi igual entre as duas variedades de milho (Fig.3).

Discussão

Os parâmetros microbiológicos e bioquímicos avaliados neste estudo não foram influenciados significativamente pela cultura de milho transgênico Bt. Em estudos similares do impacto de milho Bt sob a microfauna do solo, Saxena et al. (2001) observou que o número de bactérias cultiváveis, fungos e protozoários não tiveram nenhuma alteração após da adição de resíduos vegetais de milho transgênico Bt. Em outro estudo Brusseti et al. (2004), não observou efeito dos exudados radiculares de milho Bt sob a estrutura das comunidade microbiana, mas encontrou que os exsudatos de milho Bt e convencional tinham composição diferente, devido a presença de proteína Bt.

Variações na estrutura da comunidade microbiana associada à rizosfera de milho Bt também foram observadas através do uso de ferramentas

moleculares por Castaldini et al. (2005) e Xue et al. (2005). Segundo Blackwwod & Buyer (2004), mesmo após não ter observado diferenças significativas na microbiota do solo, em experimentos de curta duração, não é possível avaliar o verdadeiro impacto das proteínas Cry sob a microbiota do solo, pois alterações podem ser amplificadas no campo ao longo do tempo.

Os fungos micorrizicos são considerados, um grupo de micro-organismos muito importantes no solo pela sua relação com a absorção mais eficiente de fosfatos pelas plantas, e o efeito das culturas transgênicas Bt sob sua efetividade na colonização e na sua permanência no solo tem sido avaliada em vários estudos. Ferreira et al. (2003) avaliaram o efeito da asperção de cristais proteicos produzidos por *Bacillus thuringiensis* sob a porcentagem de colonização micorrizica na soja, não observando nenhuma alteração significativa. Nos resultados obtidos no presente trabalho também não foi observada nenhuma diferença na colonização micorrizica do milho convencional e o Bt, porém, os fungos micorrizicos estabeleceram a colonização aos 45 dias, e mantiveram o mesmo índice de infecção até os 120 dias. Devido as raízes do milho estarem com 70% de colonização aos 45 dias é relevante já que normalmente a infecção chega ao seu ápice após este tempo. Vários fatores podem ter influenciado neste resultado, tal como o potencial de inóculo do solo, ou a afinidade dos esporos nativos pelo milho.

O fato de não haver diferenças entre o milho Bt e o convencional é bastante positivo, pois demonstra que a inserção dos gens não alteraram a produção das moléculas sinais como os flavonóides nem as moléculas de superfície da raiz responsável pelo reconhecimento entre o fungo micorrizico arbuscular e a planta. A população de bactérias diazotróficas também não sofreu alteração nem pela transgenia nem pelo crescimento do milho, isto pode estar relacionado com o nível de colonização das raízes pelo fungo MA. Vários autores observaram que as bactérias diazotróficas são altamente influenciadas pela colonização micorrizica, já que os fungos MA alteram a produção de exudados qualitativa e quantitativamente.

As duas populações de protozoários ciliados e flagelados apresentam diferente comportamento. Os flagelados diminuíram significativamente a população a partir dos 90 dias de crescimento da planta, fato não observado na população de ciliados. Os protozoários são preferencialmente predadores de bactérias, apesar da população de diazotróficas não sofrer variação, outros grupos de bactérias podem ter diminuído, mas não foram avaliados, como por exemplo as

bactérias heterotróficas. Isto pode ser observado pela diminuição da biomassa microbiana total neste mesmo período. Com relação as duas tecnologias de milho Bt e convencional, igualmente as demais avaliações microbiológicas as populações de protozoários flagelados e ciliados não apresentaram diferenças significativas, como já foi observado por Griffiths et al. (2005).

A atividade microbiana avaliada neste trabalho através da respiração basal, teve uma variação de acordo com o crescimento do milho, isto pode estar relacionado a disponibilidade de compostos de carbono na rizosfera produto do metabolismo da planta e o crescimento radicular. O qCO_2 teve um incremento significativo aos 90 e 120 dias no milho Bt, este fato está relacionado com a diminuição da biomassa microbiana total a os 90 dias e um aumento na respiração basal no mesmo período.

A dinâmica da atividade enzimática parece estar influenciada pelo crescimento do milho o que condiciona a disponibilidade de substratos sob os quais estas atuam. Quanto a comparação entre o milho Bt e o convencional a maioria das enzimas avaliadas neste trabalho não apresentaram diferença entre eles, este comportamento também foi observado por Wei et al. (2008).

Os resultados deste trabalho não mostraram uma influência altamente significativa do milho Bt sob os parâmetros avaliados. No entanto, é importante ressaltar que estudos locais a longo prazo são necessários para poder concluir que realmente as culturas Bt não influenciam a dinâmica biológica do solo e que o uso prolongado destas culturas não terão efeitos adversos ao ambiente.

REFERÊNCIAS

- ALEF, K. (1995). **Soil respiration**. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P.. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic Press, London. pp 214-219.
- ANDERSON, J.; INGRAM, J. (1993) **Tropical soil biology and fertility: a handbook of methods**. Oxford University Press, USA. p. 171.
- BLACKWOOD, C.; BUYER, J. (2004) **Soil microbial communities associated with Bt and non-Bt corn in three soils**. J. Env. Qual. 33: 832-836.
- BRUSETTI, L.; FRANCIA, P.; BERTOLINI, C.; PAGLIUCA, A.; BORIN, S.; SORLINI, S.; ABRUZZESE, A.; SACCHI, G.; VITI, C.; GIOVANNETTI, L.; GIUNTINI, E.; BAZZICALUPA, M.; DAFFONCHIO, D. (2004) **Bacterial communities associated with the rhizosphere of transgenic Bt 176 maize (*Zea mays*) and its non-transgenic counterpart**. Plant. Soil. 266:11- 21.
- CASTALDINI, M.; TURRINI, A.; SBRANA, C.; BENEDETTI, A.; MARCHIONNI, M.; MOCALI, S.; FABIANI, A.; LANDI, S.; SANTOMASSIMO, F.; PIETRANGELI, B.; NUTI, M.; MICLAUS, N.; GIOVANNETTI, M. (2005) **Impact of Bt corn on rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms**. Appl. Env. Microbiol. 71: 6719-6729.
- CLARK, B.; PHILLIPS, T.; COATS, J. (2005) **Environmental fate and effects of *Bacillus thuringiensis* (Bt) proteins from transgenic crops: a review**. J. Agric. Food Chem. 53: 4643-4653.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J. (1976) **Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganism and nitrogen-fixing sites**. Washington, 1976, Newton W, NYMAN C, (Org.). First international symposium on nitrogen fixation, pp. 518-538.
- EMBRAPA**, Centro Nacional de Pesquisa de Solos (2009), Sistema Brasileiro de classificação de solos, Rio de Janeiro, p 412.
- FRANKENBERGER, W.; TABATABAI, M. (1991) **L-Asparaginase activity of soils**, Biol. Fert. Soil.11: 6-12.
- GIOVANETTI, M.; MOSSE, B. (1980) **Evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular micorrhizal infections in roots**. New. Phytol. 84:489-500.
- GRIFFITHS, B.; CAUL, S.; THOMPSON, J.; BIRCH, A.; SCRIMGEOUR, C.; ANDERSEN, M.; CORTET, J.; MESSEAN, A.; SAUSSE, C.; LACROIX, B.; KROGH, P. (2005). **A comparison of soil microbial community structure, protozoa, and nematodes in field plots of conventional and genetically modified maize expressing the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin**. Plant Soil. 275:135-146.
- HEAD, G.; SURBER, J.; WATSON, J.; MARTIN, J.; DUAN, J. (2002) **No detection of Cry1Ac protein in soil after multiple years of transgenic Bt Cotton (Bollgard) use**, Environ. Entomol. 31: 30-36.

ICOZ, I.; STOTZKY, G. (2008) **Fate and effects of insect-resistant Bt crops in soil ecosystems**, *Soil. Biol. Bioch.* 40: 559-586.

PHILLIPS, J.; HAYMAN, D. (1970) **Improved producers for clearing roots and vesiculararbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection**, *Br. Mycol. Soc.* 55:158-160.

SAXENA, D.; PUSHALKAR, S.; STOTZKY, G. (2010) **Fate and effects in soil of Cry proteins from *Bacillus thuringiensis*: influence of physicochemical and biological characteristics of soil**, *Open. Toxinol. J.* 3:151-171.

SAXENA, D.; STOTZKY, G. (2000) **Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn in vitro and in situ**, *FEMS Microbiol. Ecol.* 33: 35-39.

SAXENA, D.; STOTZKY, G. (2001) ***Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil**, *Soil. Biol. Bioch.* 33: 1225-1230.

SCHINNER, F.; VON MERSE, W. (1990) **Xylinase-activity, cm-cellulase-activity and invertase activity in soil-an approved method**, *Soil. Biol. Bioch.* 22: 511-515.

STOTZKY, G. (2004) **Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis***, especially from transgenic plants, *Plant Soil.* 266:77-89.

TABATABAI, M.; BREMNER, J. (1972) **Assay of urease activity in soils**, *Soil. Biol. Bioch.* 4: 479-487.

TABATABAI, M. A.; BREMNER, M. (1969) **Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity**, *Soil. Biol. Bioch.* 1:301-307.

VANCE, E.; BROOKES, P.; JENKINSON, D. (1987) **An extraction method for measuring soil microbial biomass C**, *Soil Biol. Biochem.* 19:703-707.

WEI, L.; HAO HAO, L.; WEIXIANG, W.; QI KUN, W.; YING, X.; JANICE, E. (2008) **Transgenic Bt rice does not affect enzyme activities and microbial composition in the rhizosphere during crop development**, *Soil. Biol. Bioch.* 40:475-486.

WOOMER, P. (1994) **Most probable number counts**. In: WEAVER, R.; ANGLE, S.; BOTTOMLEY, P.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, A.; WOLLUM, A.; (Org.). *Methods of Soil Analysis, Part 2, Microbiological and Biochemical Properties*, Soil Science Society of America, Madison, pp 59-79.

XUE, K.; LUO, H.; QI, H.; ZHANG, H. (2005) **Changes in soil microbial community structure associated with two types of genetically engineered plants analyzing by PLFA**. *J. Env. Sci.* 17:130-134.

Figura 1 – Avaliações microbiológicas na rizosfera de milho convencional e milho transgênico (Bt) durante um ciclo da cultura. (A) População de bactérias diazotróficas; (B) Colonização micorrízica; (C) População de protozoários flagelados; (D) População de protozoários ciliados. Barras seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de t ($p < 0.05$).

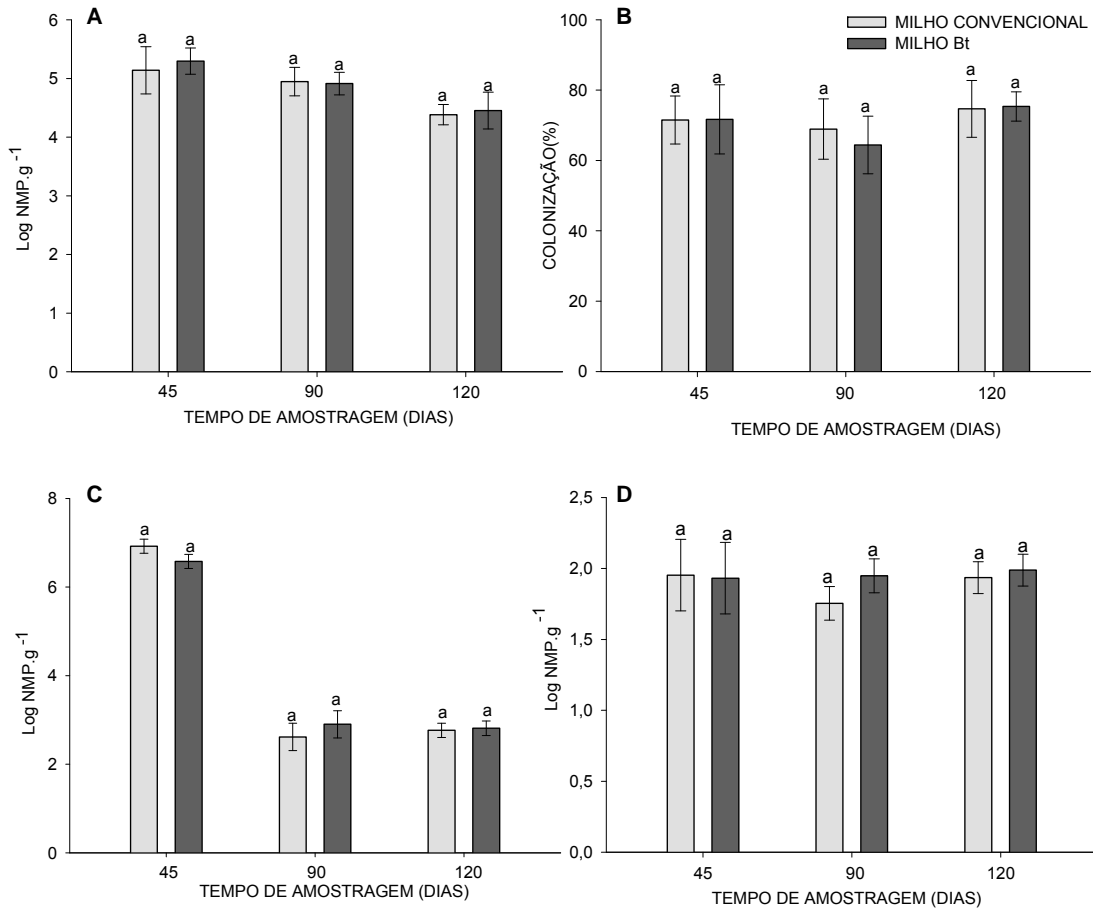


Figura 2 – Biomassa e atividade microbiana na rizosfera de milho convencional e milho transgênico (Bt) durante um ciclo da cultura. (A) Carbono da biomassa; (B) Respiração basal; (C) Quociente metabólico. Barras seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de t ($p < 0,05$). DMS: Diferença mínima significativa pelo teste de t ($p < 0,05$).

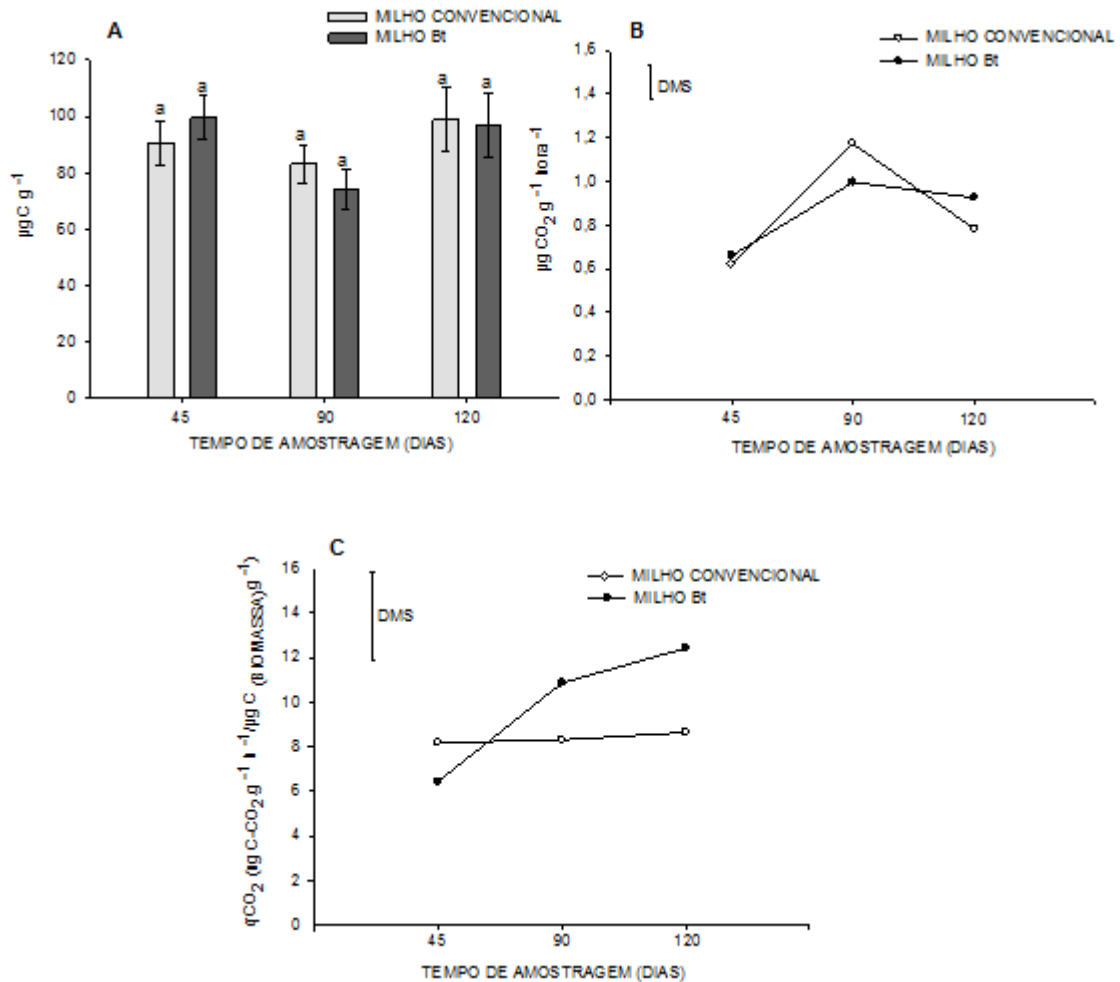


Figura 3 – Atividade enzimática na rizosfera de milho convencional e milho transgênico durante um ciclo da cultura. (A) Urease; (B) Asparaginase; (C) Celulase; (D) Amilase; (E) Fosfatase ácida. DMS: Diferença mínima significativa pelo teste de t ($p < 0.05$).

