

**Atividade Microbiana em Solos de
Várzea e Cerrado Cultivados com
Milho Transgênico Expressando
os genes Cry1Ab e Cry1F de
*Bacillus thuringiensis***



ISSN 1679-0154
Dezembro, 2017

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 159

Atividade Microbiana em Solos de Várzea e Cerrado Cultivados com Milho Transgênico Expressando os genes Cry1Ab e Cry1F de *Bacillus thuringiensis*

Christiane Abreu de Oliveira
Giovanna Moura Calazans
José Edson Fontes Figueiredo
Simone Martins Mendes
Eliane Aparecida Gomes
Rosângela Cristina Marucci
Paulo Afonso Viana
Lucy Seldin
Ivanildo Evódio Marriel

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2017

Esta publicação está disponível no endereço:

<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria Borges Damasceno, Maria Lúcia Ferreira Simeone, Roberto dos Santos Trindade, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro, Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto(s) da capa: Ivanildo Evódio Marriel

1ª edição

Formato digital (2017)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Milho e Sorgo

Atividade microbiana em solos de várzea e Cerrado cultivados com milho transgênico expressando os genes Cry1Ab e Cry1F de *Bacillus thuringiensis* / Christiane Abreu de Oliveira ... [et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2017.

27 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154;159).

1. Microbiologia do solo. 2. Enzima. 3. Bactéria. 4. Rizosfera. I. Oliveira, Christiane Abreu de. II. Calazans, Geovanna Moura. III. Figueiredo, José Edson Fontes. IV. Mendes, Simone Martins. V. Gomes, Eliane Aparecida. VI. Marucci, Rosângela Cristina. VII. Viana, Paulo Afonso. VIII. Seldin, L. IX. Marriel, I. E. X. Série.

CDD 631.46 (21. ed.)

© Embrapa 2017

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	12
Conclusões	21
Agradecimentos	22
Referências	22

Atividade Microbiana em Solos de Várzea e Cerrado Cultivados com Milho Transgênico Expressando os genes Cry1Ab e Cry1F de *Bacillus thuringiensis*

*Christiane Abreu de Oliveira*¹

*Giovanna Moura Calazans*²

*José Edson Fontes Figueiredo*³

*Simone Martins Mendes*⁴

*Eliane Aparecida Gomes*⁵

*Rosângela Cristina Marucci*⁶

*Paulo Afonso Viana*⁷

*Lucy Seldin*⁸

*Ivanildo Evódio Marriel*⁹

Resumo

Em razão das vantagens agronômicas e dos benefícios econômicos, a área de cultivo de culturas geneticamente modificadas (GM) tem aumentado nos últimos anos. Embora vários estudos tenham sido conduzidos para determinar os possíveis efeitos da tecnologia Bt nas comunidades microbianas do solo, os resultados não fornecem respostas conclusivas. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade microbiana em solos rizosférico e não

¹Eng.-Agrôn., D.Sc. em Biologia Vegetal, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424, km 45, Zona Rural, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG, christiane.paiva@embrapa.br

²Eng.-Ambiental, M.Sc. em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos - giovannacalazans@hotmail.com

³Biólogo/Bioquímico, Ph.D. Pesquisador na Embrapa Milho e Sorgo, Rod MG 424 Km 45, Zona Rural, CEP 35701-970 Sete Lagoas - MG, jose.edson@embrapa.br

⁴Eng.-Agrôn., D.Sc. em Entomologia, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424, km 45, Zona Rural, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG, simone.mendes@embrapa.br

⁵Bióloga, DSc. em Genética, Pesquisadora em Microbiologia na Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424, km 45, Zona Rural, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG, eliane.a.gomes@embrapa.br

⁶Eng.-Agrôn., D.Sc. em Entomologia, Professora Adjunta e Pesquisadora da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Av. Doutor Sylvio Menicucci, 1001, Kennedy, CEP 37200-000 Lavras, MG, rosangelac.marucci@ufla.den.br

⁷Eng.-Agrôn., Ph.D. em Entomologia, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424, km 45, Zona Rural, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG, paulo.viana@embrapa.br

⁸Bióloga, D.Sc em Ciências (Microbiologia), Professora Titular da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Av. Pedro Calmon, 550, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ, CEP 21941-901, lseldin@micro.ufrj.br

⁹Eng.-Agrôn., D.Sc. em Biologia Celular, Pesquisador em Microbiologia da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424, km 45, Zona Rural, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG, ivanildo.marriel@embrapa.br

rizosférico de milho transgênico e não transgênicos cultivados em Várzea e Cerrado. Testaram-se dois eventos transgênicos independentes expressando as proteínas Cry1Ab (30F35Y) ou Cry1F (30F35H) e o híbrido original (30F35), não transformado, em delineamento experimental de blocos ao acaso com três repetições. Para determinação da atividade das enzimas urease, arginase, fosfatases ácida/alcalina e diversidade metabólica via sistema Biolog, as amostras de solo foram coletadas no estágio de florescimentos das plantas. Exceto para a enzima fosfatase alcalina, observou-se maior atividade enzimática nas comunidades microbianas de solos rizosféricos e em solos do Cerrado. Não foram observadas alterações significativas na atividade microbiana entre os genótipos de milho com e sem a tecnologia Bt, independentemente do tipo de solo.

Palavras-chave: milho Bt, diversidade funcional, bioindicadores, qualidade do solo, organismos não alvo

Microbial Activity at “Várzea” and “Cerrado” Soils Cultivated with Transgenic Maize Expressing Cry1Ab and Cry1F genes from *Bacillus thuringiensis*

*Christiane Abreu de Oliveira*¹

*Giovanna Moura Calazans*²

*José Edson Fontes Figueiredo*³

*Simone Martins Mendes*⁴

*Eliane Aparecida Gomes*⁵

*Rosângela Cristina Marucci*⁶

*Paulo Afonso Viana*⁷

*Lucy Seldin*⁸

*Ivanildo Evódio Marrie*⁹

Abstract

Due to the agronomic advantages and economic benefits, the area of cultivation of genetically modified (GM) crops has increased in recent years. Although several studies have been conducted to determine the possible effects of Bt technology on soil microbial communities, the results do not provide conclusive answers. Thus, the objective of this work was to evaluate the enzymatic activity of the microbial community in rhizospheric and non-rhizospheric soils of transgenic and non-transgenic hybrids cultivated in Várzea (lowland) and Cerrado soils. Two independent transgenic events expressing the CRY1Ab (30F35Y) or CRY1F (30F35H) and the original non-transformed hybrid (30F35) were used in a randomized block design with three replicates. Rhizospheric soils from plants in the flowering stage were collected to measure the activity of the enzymes urease, arginase and acid and alkaline phosphatase by Biolog method. Except for alkaline phosphatase, it was observed a greater enzymatic activity in the microbial community of both, rhizospheric soils and Cerrado soil. No

significant changes in microbial activity were detected as a function of maize genotypes with and without Bt technology, regardless of soil type.

Key words: Bt maize, functional diversity, bio-indicators, soil quality, non-target organisms

Introdução

O cultivo de plantas geneticamente modificadas (GM) tem apresentado uma rápida expansão nos últimos anos e continua crescendo em vários países, em razão das vantagens agronômicas e dos benefícios econômicos. Em duas décadas, a área global de culturas GM aumentou de 1,7 milhão de hectares, em 1996, para mais de 181,5 milhões de hectares, em 2014 (JAMES, 2014). A área brasileira de milho GM cresceu de 4,9% (5 milhões de hectares) em 2008/2009 para 81,4% em 2013/2014, o que corresponde a 15,83 milhões de hectares (CONAB, 2014). Infelizmente, a rápida expansão de culturas GM em muitos países em desenvolvimento, impulsionada por agricultores, várias vezes contorna os requisitos regulamentares de biossegurança (SINEBO, 2013). Dessa forma, os potenciais efeitos adversos das culturas GM nas comunidades microbianas do solo têm sido uma grande preocupação dentro da comunidade científica (COTTA et al., 2013; SILVA et al., 2014).

Para as culturas geneticamente modificadas com genes de *Bacillus thuringiensis* (Bt) vários estudos têm sido conduzidos para determinar os possíveis efeitos prejudiciais da tecnologia Bt em comunidades bacterianas do solo. No entanto, os resultados são conflitantes e não fornecem respostas conclusivas (BAUMGARTE; TEBBE, 2005; ICOZ; STOTZKY, 2007).

Assim, a incerteza sobre os efeitos das proteínas Cry, secretadas pelas raízes em espécies não alvo no solo, continua sendo um importante argumento contra o plantio de culturas Bt e merece mais estudos.

Microrganismos do solo são os primeiros determinantes da qualidade do solo e da produção agrícola, pela ciclagem de nutrientes, formação do solo, agregação das partículas do solo, fertilidade e biorremediação (SINGH et al., 2013). O crescimento microbiano na rizosfera é altamente estimulado pelos exsudatos da raiz e influencia positivamente na fertilidade do solo (CAVAGLIERI et al., 2009). A variedade de plantas leva à dinâmica das populações microbianas da rizosfera, a qual influencia o crescimento e a saúde da planta e a sustentabilidade do agroecossistema (DUNFIEL; GERMIDA, 2004).

Portanto, pequenas alterações na comunidade microbiana podem afetar a saúde do solo e o funcionamento do ecossistema (DUNFIELD; GERMIDA, 2004). A superexpressão da proteína Bt potencialmente modifica a composição dos exsudatos das raízes das plantas transgênicas e adicionalmente pode exercer um efeito direto nas espécies de microrganismos não alvo no solo (ICOZ; STOTZKY, 2007). Consequentemente, mudanças no processo ecológico e nas funções mediadas pelos microrganismos do solo correspondem a um dos potenciais efeitos ambientais do rápido aumento da área agrícola global cultivada com culturas transgênicas. A situação é crítica no Brasil em razão do escasso número de estudos sobre os efeitos do milho Bt em solos tropicais.

A variedade de métodos desenvolvidos para mensurar a atividade biológica do solo fornece informações úteis sobre a situação ecológica do solo (FAKRUDDIN; MANNAN, 2013; STEFANOWICZ, 2006). Dentre eles, Biolog e métodos enzimáticos são bastante simples, rápidos e fornecem resultados reprodutíveis (UTOBO; TEWARI, 2015). O uso de carbono disponível é um fator-chave que modula o crescimento microbiano no solo (GARLAND; MILLS, 1991). Assim, o uso de um método biológico padronizado para realizar testes de utilização de fontes de carbono pelos microrganismos do solo, como o Biolog, fornece informações valiosas sobre a diversidade funcional dos microrganismos (STEFANOWICZ, 2006; ZAK et al., 1994). Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o possível impacto do milho Bt em comunidades microbianas do solo em agrossistemas tropicais.

Material e Métodos

O estudo foi conduzido em dois ambientes distintos (Cerrado e Várzea) na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, localizada na cidade de Sete Lagoas (19° 27' 57" S; 44° 14' 49" W), Estado de Minas Gerais, Brasil. O clima é caracterizado por verões quentes e úmidos e invernos secos, tipo savana, de acordo com a classificação de Köppen-Geiger (PEEL et al., 2007), com precipitação média anual de 350,6 mm e temperatura média anual entre 22 °C e 27 °C.

Amostragem do Solo, Híbridos e Delineamento Experimental

As amostras de solo foram coletadas em dois ambientes durante o estágio de floração do milho, nos ambientes Cerrado

(Latossolo Vermelho Escuro distrófico, com textura argilosa) e Várzea (hidromórfico com textura argilosa). Avaliaram-se três híbridos de milho, sendo dois transgênicos expressando a proteína Cry1Ab (30F35Y) e Cry1F (30F35H) e o original, não transgênico (30F35).

Em cada ambiente, as coletas de solo foram realizadas dentro de cada parcela contendo tratamentos dispostos em delineamento em blocos ao acaso, com quatro repetições. Cada amostra de solo, rizosférico e não rizosférico, foi composta por três subamostras (três plantas por parcela), coletadas no estágio de floração e analisadas quanto à diversidade metabólica e enzimática, utilizadas como métricas ou atributos da qualidade do solo nestes ambientes (Cerrado, Várzea) e rizosfera de genótipos transgênicos e não transgênicos.

Atividade Enzimática

A atividade da urease foi determinada usando o método proposto por Kandeler e Gerber (1988), o qual envolve a medição da amônia liberada a partir da hidrólise da ureia ao longo do período de incubação do solo. A atividade da arginase foi determinada medindo a amônia liberada durante a incubação do solo com arginina, conforme o método colorimétrico desenvolvido por Alef e Kleiner (1986). A determinação da atividade da fosfatase foi realizada de acordo com o método descrito por Alef et al. (1995). Para a análise da fosfatase ácida, o pH das amostras foi ajustado para 6,5 com HCl 1M e, para a atividade da fosfatase alcalina, o pH foi corrigido para 11 com NaOH 1M. A quantidade de p-nitrofenol (PNP) formada foi determinada em espectrofotômetro (Labsystems, MultSkan, MS, EUA) a 440 nm.

Diversidade Metabólica – Sistema Biolog

A diversidade funcional da comunidade bacteriana foi determinada pelo método desenvolvido por Zak et al. (1994), utilizando-se microplacas ECOPLATE[®] (Biolog, Inc. HAYWARD; A; USA). Cada microplaca contém 31 fontes de carbono, repetidas três vezes. Resumidamente, cinco gramas de cada amostra de solo foram colocados em 45 mL de solução salina 0,85% (p/v) e agitados por 30 minutos a 150 rpm em temperatura ambiente. Uma alíquota de 120 µL da diluição 10⁻² foi inoculada em cada poço da microplaca e incubada no escuro e temperatura ambiente, por 72h. As reações positivas foram analisadas por medição da absorbância a 590 nm no espectrofotômetro Labsystems Multiskan microplate reader (MS, USA). Com base nas leituras de absorbância, foram estimados e analisados os seguintes parâmetros de atividade e diversidade funcional/metabólica (GARLAND; MILLS, 1991; LI et al., 2014): índice médio de desenvolvimento de cor – AWCD – atividade metabólica total; índice de diversidade de Shannon (H); riqueza de substrato (S); equidade ou índice de similaridade (E); e a atividade total (soma da absorbância de todos substratos)

Análise Estatística

Os dados de atividade metabólica foram padronizados pela média de desenvolvimento de cor (AWCD), em cada microplaca, para remover os efeitos da densidade de inóculos (GARLAND; MILLS, 1991; FRAC et al., 2012). Os resultados das análises de atividade enzimática e os gerados pelo Biolog foram analisados por ANOVA (análise de variância) e as médias dos tratamentos foram submetidas ao teste de média Tukey, ao nível de probabilidade de 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo software *Statistica* versão 10.0.

Resultados e Discussão

Atividade da Urease e Arginase

Os resultados dos ensaios de atividade enzimática para a atividade da urease variaram entre 184,55 e 523,26 $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ substrato (Figura 1) e a variação da atividade da arginase foi entre 16,22 e 78,14 $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ solo (Figura 2). Entretanto, nenhuma diferença significativa ($p < 0,05$) foi encontrada entre os genótipos Bt e não Bt.

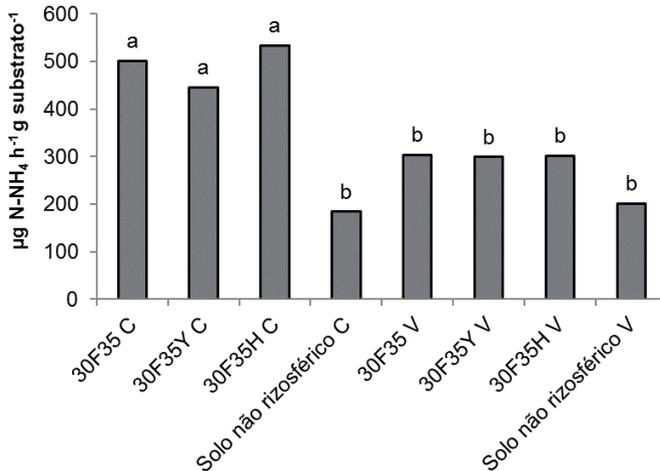


Figura 1. Atividade da urease ($\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$.substrato) em solo rizosférico e não rizosférico de milho híbrido não transgênico (30F35) e suas isolinhas Bt (30F35Y e 30F35H, expressando as proteínas Cry1Ab e Cry1F de *B. thuringiensis*, respectivamente), cultivado em solo tropical Latossolo vermelho escuro de Cerrado (C) e em solo hidromórfico de Várzea (V). Valores médios que apresentam a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

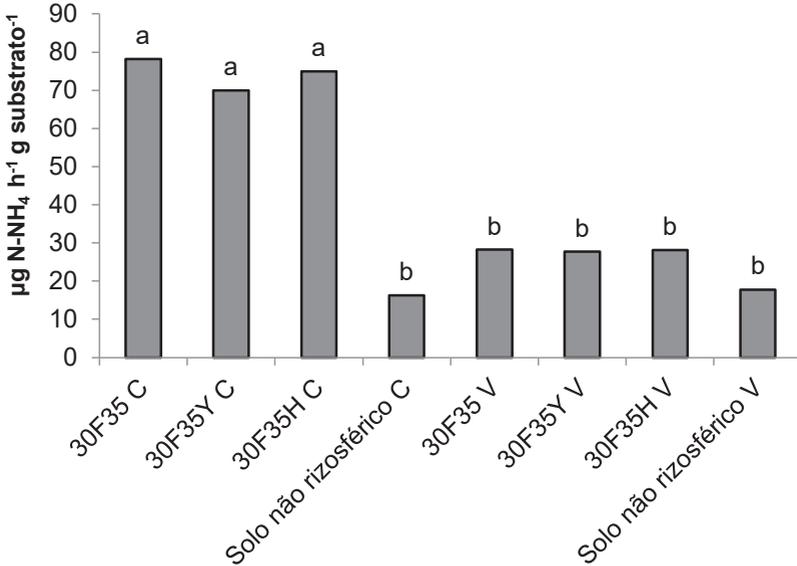


Figura 2. Atividade da arginase ($\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ substrato) em solo rizosférico e não rizosférico de milho híbrido não transgênico (30F35) e suas isolinhas Bt (30F35Y e 30F35H, expressando as proteínas Cry1Ab e Cry1F de *B. thuringiensis*, respectivamente), cultivado em solo tropical Latossolo vermelho escuro de Cerrado (C) e em solo hidromórfico de Várzea (V). Valores médios que apresentam a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Diferenças nas atividades de ambas as enzimas (urease e arginase) foram detectadas entre amostras de solo não rizosférico e rizosférico de Cerrado. A maior atividade microbiana em solo rizosférico de Cerrado foi provavelmente por causa da presença de mais material orgânico complexo, como a planta, detritos de raiz e a liberação de exsudatos da raiz (FRAC et al., 2012). Esse resultado corrobora pesquisas anteriores mostrando que as atividades enzimáticas são

particularmente elevadas na rizosfera, onde os exsudatos das raízes sustentam uma maior biomassa microbiana e atividade bioquímica em comparação com solos não rizosféricos.

Microrganismos são as principais fontes de urease no solo, e a atividade da urease é positivamente e significativamente correlacionada com a biomassa microbiana (KLOSE; TABATABAI, 1999). Essa enzima tem sido utilizada para detectar mudanças na qualidade do solo em diferentes agroecossistemas (KLOSE; TABATABAI, 1999). Como a atividade da arginase depende da atividade metabólica das células microbianas, a atividade enzimática associada a outros parâmetros microbiológicos tem sido considerada como um bom indicador da concentração e especiação de nitrogênio no solo (ALEF; KLEINER, 1987). Neste estudo, a atividade da arginase foi estatisticamente diferente entre os solos de Várzea e de Cerrado, indicando que ela foi um sensível indicador para solo tropical.

Em relação a ambas as enzimas, os ensaios indicaram que não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre solos cultivados com milho transgênico e não transgênico (Figuras 1 e 2). Em um estudo com algodão Bt, Yang et al. (2012) mostraram que a proteína Bt não se acumulou continuamente no solo e concluíram que ela não influencia significativamente na atividade da urease nem provoca um impacto significativo no conteúdo de matéria orgânica, nitrogênio total, e na disponibilidade de nitrogênio em solo rizosférico. No entanto, o tipo de solo parece ter influenciado a atividade de ambas as enzimas, em que se observou um aumento da atividade em solo de Cerrado.

Como esperado, neste estudo as atividades enzimáticas foram particularmente maiores na rizosfera. A rizosfera é uma zona microecológica com uma direta proximidade da raiz da planta e é diretamente influenciada pelas secreções da raiz (SYLVIA et al., 2005). As raízes das plantas e os resíduos, a liberação de exsudatos das raízes, da microbiota e de animais do solo sustentam uma maior biomassa microbiana e biológica na rizosfera em comparação com o solo não rizosférico (LI et al., 2014). De acordo com Sylvia et al. (2005), até 15% da área da superfície da raiz é coberta com microrganismos rizosféricos específicos provenientes de várias interações biológicas.

As atividades de ambas as enzimas, urease e arginase, estão diretamente correlacionadas com a capacidade do solo em converter nitrogênio orgânico em nitrogênio mineral e sua disponibilidade de nitrogênio para as plantas (ALEF; KLEINER, 1987; KANDELER; GERBER, 1988). A urease em solos é notavelmente estável, e diferentes solos têm diferentes níveis de atividade da urease determinados por mecanismos de proteção enzimática do solo contra a degradação microbiana e outros processos que levam à inativação enzimática (BURNS et al., 1972; ZANTUA; BREMMER, 1977). Em climas temperados, a atividade da urease no solo é persistente por longos períodos secos, baixas temperaturas e condições estéreis (BURNS et al., 1972). Entretanto, as condições ambientais nas regiões tropicais são especialmente diferentes no verão, que apresenta excesso de água e elevadas temperaturas. Neste estudo, a atividade da urease sugeriu que outros mecanismos de proteção enzimática podem existir em solos tropicais.

A atividade enzimática da urease foi aproximadamente seis vezes maior que a observada para a arginase. Esse

resultado era esperado porque, ao contrário da urease, que pode permanecer estável por um tempo relativamente longo complexada com partículas do solo e matéria orgânica, a enzima arginase mostra baixa estabilidade no solo, e sua atividade é criticamente dependente da existência de microrganismos metabolicamente ativos (ALEF; KLEINER, 1987). Além disso, em solo com alto teor de matéria orgânica, alto potencial de decomposição e baixa relação C/N, a arginina, o substrato da arginase, pode ser utilizada como fonte de C pela biomassa microbiana (ALEF; KLEINER, 1987).

Nestes casos, a baixa atividade da arginase é em razão da falta de substrato, mesmo que a população de microrganismos aumente ou a atividade metabólica das células seja alta. Em contraste, em solos onde a matéria orgânica é abundante e existe alta relação C/N, o N liberado pela reação da arginase pode ser assimilado pela microbiota, resultando novamente em baixa atividade enzimática. Em conjunto, essas condições podem explicar, pelo menos em parte, a baixa atividade da arginase nas amostras de solo analisadas. A mineralização da arginina é útil para estimar a biomassa microbiana do solo e a estrutura da comunidade microbiana. Alef e Kleiner (1987) sugeriram que, sobre condições específicas, a taxa de amonificação da arginina foi proporcional à biomassa microbiana do solo.

Atividade da Fosfatase

A atividade enzimática do solo é um potencial indicador da qualidade do solo em razão da sua alta sensibilidade a fatores externos e facilidade de mensuração (UTOBO; TEWARI, 2015). A atividade enzimática em geral cresce com o aumento do

teor da matéria orgânica no solo, e maior atividade enzimática indica maior quantidade de comunidades microbianas e maior estabilidade de enzimas adsorvidas em materiais húmicos (MARINARI; ANTISARI, 2010).

Neste estudo, considerando as enzimas fosfatases, não foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os três genótipos plantados em ambos os tipos de solo (Figura 3).

Os valores observados para a fosfatase ácida variaram entre 5,35 e 14,78 $\mu\text{g pNPP ml}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ substrato, e a fosfatase alcalina variou entre 2,92 e 6,63 $\mu\text{g pNPP ml}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ substrato. Dessa forma, a ciclagem do fósforo em milho rizosférico não foi influenciada pelas proteínas Bt secretadas no solo. A atividade da fosfatase alcalina foi significativamente menor apenas para a amostra de solo não rizosférico de Cerrado.

Adicionalmente, a atividade da fosfatase ácida foi significativamente menor em solo de várzea. No Brasil, esse solo é exposto ao excesso de água e inundações durante a estação chuvosa. Em solo inundado, a água substitui a maior parte do ar nos poros do solo, resultando em uma redução drástica no conteúdo de oxigênio e na capacidade de troca gasosa (BELL et al., 1998). Assim, os solos inundados são predominantemente ambientes anaeróbicos, o que limita o acesso microbiano à matéria orgânica e reduz a taxa de decomposição (SRIDEVI et al., 2013).

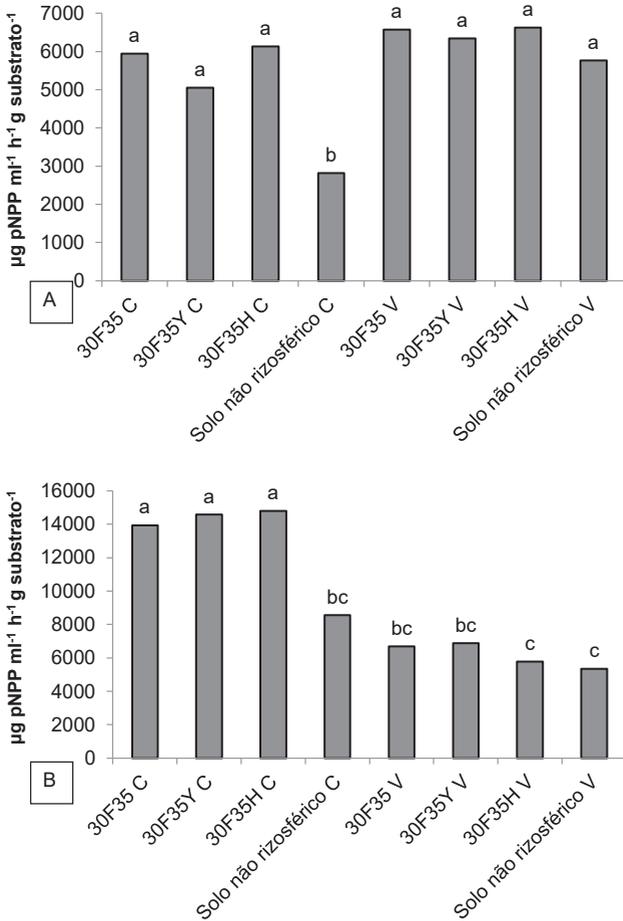


Figura 3. Atividade da fosfatase alcalina (A) e fosfatase ácida (B) ($\mu\text{g pNPP ml}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ substrato}$), em solo rizosférico e não rizosférico, de milho híbrido não transgênico (30F35) e suas isolinhas Bt 30F35Y e 30F35H, expressando as proteínas Cry1Ab e Cry1F de *B. thuringiensis*, respectivamente, cultivados em solo tropical Latossolo vermelho escuro de Cerrado (C) e em solo hidromórfico de Várzea (V). Valores médios que apresentam a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Estudos também demonstraram que o tipo de solo e a textura são os fatores mais importantes para modular a atividade da comunidade microbiana associada à raiz, independentemente do sistema de colheita (CHIARINI et al., 1998; COTTA et al., 2014). Os solos brasileiros de várzea têm alto nível de argila, com baixa capacidade de drenagem e aeração e uma alta tendência para inundações no período de verão, que compreende os meses de novembro a março (COTTA et al., 2013). Esta condição única pode explicar o resultado em que a atividade da fosfatase ácida foi menor no solo de Várzea em comparação com o solo de Cerrado.

Padrão de Atividade Metabólica da Comunidade Microbiana

A atividade metabólica da comunidade microbiana do solo não variou significativamente entre os genótipos transgênicos e não transgênicos, em solo de Várzea e solo de Cerrado (Tabela 1). A utilização dos substratos foi calculada pelo índice de diversidade de Shannon, o parâmetro S (número total de substratos utilizados) e atividade total (AWCD), às 72 horas de incubação (Tabela 1). Ocorreu diferença significativa apenas com relação à atividade metabólica dos microrganismos presentes em solo não rizosférico. Com base nos parâmetros estudados, concluiu-se que os genótipos de milho Bt que expressam proteínas Cry não impactaram negativamente a diversidade da atividade funcional do solo tropical.

Tabela 1. Atividade total da população microbiana (AWCD), número de substratos usados (S) e diversidade metabólica (índice de diversidade de substrato de Shannon - H) medidos pelo ensaio Biolog, 72 horas após a incubação de amostras não rizosférica e rizosférica e de genótipos de milho transgênico e não transgênicos cultivados em solos de Várzea (V) e em Latossolo vermelho escuro de Cerrado (C).

Amostra*	Atividade total (AWCD**)	S (Número de substratos)	H (Índice de Shannon)
30F35 C	14,46 a	26 a	3,08 a
30F35Y C	13,83 a	29 a	3,18 a
30F35H C	15,64 a	27 a	3,13 a
Solo não rizosférico C	3,88 b	9 b	1,82 b
30F35 V	11,51 a	26 a	3,05 a
30F35Y V	8,40 a	27 a	3,08 a
30F35H V	10,85 a	26 a	3,07 a
Solo não rizosférico V	6,18 b	22 b	2,63 b

*Híbrido de milho não transgênico (30F35) e suas isolinhas Bt 30F35Y e 30F35H que expressam as proteínas Cry1Ab e Cry1F de *B. thuringiensis*, respectivamente. As médias de três repetições seguidas pela mesma letra não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

**AWCD – média de desenvolvimento total de cor, atividade total de utilização de substratos, 590 nm.

O método da análise do perfil metabólico também possui limitações, tais como: somente a fração cultivável da comunidade é capaz de crescer sob condições experimentais (GARLAND; MILLS, 1991); microrganismos de crescimento rápido são dominantes no meio de cultura (YAO et al., 2000); a densidade do inóculo pode afetar diretamente os resultados

(GARLAND; MILLS, 1991) e o método reflete o potencial, não a diversidade metabólica *in situ* (FAKRUDDIN; MANNAN, 2013; GARLAND; MILLS, 1991).

Atualmente, todos os métodos utilizados para avaliar a diversidade e atividade microbiana do solo apresentam limitações técnicas. Isso dificulta o desenvolvimento de um método padrão que pode ser usado em qualquer laboratório para estudar os efeitos da proteína Bt na comunidade microbiana do solo (KOSTOV et al., 2014).

Por enquanto, o uso de mais de um método para avaliar a diversidade e atividade microbiana do solo permite superar as dificuldades de cada um. Além disso, os possíveis efeitos negativos das proteínas Cry, secretadas pelas raízes das culturas Bt em espécies não alvo no solo, ainda não estão claros. Os resultados com os atuais métodos disponíveis são contrastantes mostrando os efeitos negativos e nulos das culturas Bt na diversidade e atividade microbiana do solo.

Os aparentes resultados contraditórios sobre os efeitos das proteínas Bt na microbiota do solo podem refletir a complexidade biológica e ambiental de cada solo e as limitações de cada método. Assim, diferentes resultados podem representar um estado transitório de uma comunidade microbiana particular para cada solo e ambiente analisado.

Conclusão

No presente estudo, não houve alteração na atividade microbiana do solo em função dos genótipos de milho Bt, independentemente do tipo de solo e dos parâmetros avaliados.

Na comparação de ambientes, exceto para fosfatase alcalina, observou-se maior atividade da comunidade microbiana no Cerrado e em amostras de solo rizosférico. No entanto, considerando a existência de muitos tipos diferentes de solos em áreas tropicais onde o milho é plantado, os estudos futuros precisam ser estendidos a outras áreas de cultivo de milho para melhorar a visão dos efeitos do milho Bt sobre a atividade da comunidade microbiana dos ecossistemas agrícolas tropicais.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela Embrapa Milho e Sorgo; pelo Projeto Lac Biosafety; pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig).

Referências

ALEF, K.; KLEINER, D. Applicability of arginine ammonification as indicator of microbial activity in different soils. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 5, p. 148-151, 1987.

ALEF, K.; KLEINER, D. Arginine ammonification, a simple method to estimate microbial activity potentials in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 18, n. 2, p. 233-235, 1986.

ALEF, K.; NANNIPIERI, P.; TRAZAR-CEPEDA, C. Enzyme activities: phosphatase activity. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995. p. 335-344.

BAUMGARTE, S.; TEBBE, C. C. Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab *Bt*-toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 2539-2551, 2005.

BELL, M. J.; MOODY, P. W.; CONNOLLY, R. D.; BRIDGE, B. J. The role of active fractions of soil organic matter in physical and chemical fertility of ferrosols. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v. 36, n. 5, p. 809-820, 1998.

BURNS, R. G.; PUKITE, A. H.; MCLAREN, A. D. Concerning the location and persistence of soil urease. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 36, n. 2, p. 308-311, 1972.

CAVAGLIERI, L.; ORLANDO, J.; ETCHEVERRY, M. Rhizosphere microbial community structure at different maize plant growth stages and root locations. **Microbiological Research**, Jena, v. 164, n. 4, p. 391-399, 2009.

CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; NACAMULLI, C.; TABACCHIONI, S. Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 8, n. 1/3, p. 11-18, 1998.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: 2014**. Brasília, DF, 2014.

COTTA, S. R.; DIAS, A. C. F.; MARRIEL, I. E.; ANDREOTE, F. D.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. D. Different effects of transgenic maize and nontransgenic maize on nitrogen-

transforming archaea and bacteria in tropical soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 80, n. 20, p. 6437-6445, 2014.

COTTA, S. R.; DIAS, A. C. F.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; VAN ELSAS, J. D.; SELDIN, L. Temporal dynamics of microbial communities in the rhizosphere of two genetically modified (GM) maize hybrids in tropical agrosystems. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 103, n. 3, p. 589-601, 2013.

DUNFIELD, K. E.; GERMIDA, J. J. Impact of genetically modified crops on soil- and plant-associated microbial communities. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33, n. 3, p. 806-815, 2004.

FAKRUDDIN, M.; MANNAN, K. S. B. Methods for analyzing diversity of microbial communities in natural environments. **Ceylon Journal of Science**, Colombo, v. 42, n. 1, p. 19-33, 2013.

FRAC, M.; OSZUST, K.; LIPIEC, J. Community Level Physiological Profiles (CLPP): characterization and microbial activity of soil amended with dairy sewage sludge. **Sensors**, v. 12, n. 3, p. 3253-3268, 2012.

GARLAND, J. L.; MILLS, A. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis or patterns of community level sole carbon source utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 8, p. 2351-2359, 1991.

ICOZ, I.; STOTZKY, G. Cry3Bb1 protein from *Bacillus thuringiensis* in root exudates and biomass of transgenic corn

does not persist in soil. **Transgenic Research**, London, v. 17, n. 4, p. 609-620, 2007.

JAMES, C. **Global status of commercialized Biotech/GM crops**. Ithaca: ISAAA, 2014. 250 p. (ISAAA. Brief n. 49).

KANDELER, E.; GERBER H. Short term assay of soil urease activity using colorimetric determination ammonium. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 6, n. 1, p. 68-72, 1988.

KLOSE, S.; TABATABAI, M. A. Urease activity of microbial biomass in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 31, n. 2, p. 205-211, 1999.

KOSTOV, K.; KROGH, P. H.; DAMGAARD, C. F.; SWEET, J. B.; HENDRIKSEN, N. B. Are soil microbial endpoints changed by *Bt* crops compared with conventional crops? A systematic review protocol. **Environmental Evidence**, v. 3, p. 1-11, 2014.

LI, X.; RUI, J.; MAO, Y.; YANNARELL, A.; MACKIE, R. Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 68, p. 392-401, 2014.

MARINARI, S.; ANTISARI, L. V. Effect of lithological substrate on microbial biomass and enzyme activity in brown soil profiles in the Northern Apennines (Italy). **Pedobiologia**, Jena, v. 53, n. 5, p. 313-320, 2010.

PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Sciences**, v. 11, p. 1633-1644, 2007.

SILVA, D. A. F.; COTTA, S. R.; VOLLÚ, R. E.; JURELEVICIUS, D. A.; MARQUES, J. M.; MARRIEL, I. E.; SELDIN, L. Endophytic microbial community in two transgenic maize genotypes and in their near-isogenic non-transgenic maize genotype. **BMC Microbiology**, v. 14, p. 1-9, 2014.

SINEBO, W. **Adoption processes and regulatory challenges for genetically modified crops in developing countries: lessons for Africa**. Ouagadougou: NEPAD, 2013. (Policy Brief. Agricultural Biosafety, 1).

SINGH, D.; JAIN, P.; GUPTA, A.; NEMA, R. Soil diversity: a key for natural management of biological and chemical constituent to maintain soil health & fertility. **International Journal Bio-Science and Bio-Technology**, v. 5, p. 41-50, 2013.

SRIDEVI, A.; RAMANKRISHNAN, B.; SANDY, A.; NARASIMHA, G. Bacterial population and their metabolic activities in flooded rice soil. **Annals of Biological Research**, v. 4, n. 6, p. 111-118, 2013.

STEFANOWICZ, A. The biológ plates technique as a tool in ecological studies of microbial communities. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n. 5, p. 669-676, 2006.

SYLVIA, D.; FUHRMANN, J.; HARTEL, P.; ZUBERER, D. **Principles and applications of soil microbiology**. New Jersey: Pearson Education, 2005.

UTOBO, E. B.; TEWARI, L. Soil enzymes as bioindicators of soil ecosystem status. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 13, p. 147-169, 2015.

YANG, W.; ZHANG, M.; DING, G. Effect of transgenic *Bt* cotton on bioactivities and nutrients in rhizosphere soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 43, n. 4, p. 689-700, 2012.

YAO, H.; HE, Z.; WILSON, M. J.; CAMPBELL, C. D. Microbial biomass and community structure in a sequence of soils with increasing fertility and changing land use. **Microbial Ecology**, New York, v. 40, n. 3, p. 223-237, 2000.

ZAK, J. C.; WILLIG, M. R.; MOORHEAD, D. L.; WILDMAN, H. G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 26, n. 9, p. 1101-1108, 1994.

ZANTUA, M. I.; BREMNER, J. M. Stability of urease in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 9, n. 2, p. 135-140, 1977.

Embrapa

Milho e Sorgo

CGPE - 14320



MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

