

EFEITO DE ALGUNS AGROTÓXICOS NA SOBREVIVÊNCIA E NA ATIVIDADE RESPIRATÓRIA DE *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* E *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*¹

SONIA DE BARROS OSTIZ², MARIA RAPHAELA MUSUMECI³ e SIU MUI TSAI⁴

RESUMO - A influência do fungicida pentacloronitrobenzeno (PCNB), do herbicida trifluralin e do fungicida metalaxil/mancozeb no crescimento de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (C-05 e C-05 II) e de *Bradyrhizobium japonicum* (29W e SEMIA 587), foi estudada em meio ágar sólido. A estirpe SEMIA 587 de *B. japonicum* foi mais sensível a estes agrotóxicos, e a estirpe C-05 II de *R. leguminosarum* foi a mais resistente, embora tenha-se apresentado sensível ao metalaxil/mancozeb. A atividade respiratória, avaliada através da técnica de radiorrespirometria, demonstrou que a estirpe mutante de *R. leguminosarum* (C-05 II) teve sua atividade respiratória estimulada por todos os agrotóxicos.

Termos para indexação: fungicida, agroquímicos, herbicida.

THE EFFECTS OF AGROCHEMICALS ON SURVIVAL AND RESPIRATORY ACTIVITY OF *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* bv. *PHASEOLI* AND *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*

ABSTRACT - The effects of the fungicides pentachloronitrobenzene, metalaxil/mancozeb and the herbicide trifluralin on the growth of strains of *Bradyrhizobium japonicum* (29W and SEMIA 587), and *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (C-05 and C-05 II), were studied in agar medium. Strain SEMIA 587 of *B. japonicum* was more susceptible to these agrochemicals, and strain C-05 II of *R. leguminosarum* was the most resistant, although it had been susceptible to metalaxil/mancozeb. The respiratory activity, measured by radiorepirometry revealed that the mutant strain of *R. leguminosarum*, (C-05 II) had its respiratory activity enhanced by all the agrochemicals.

Index terms: fungicides, agrochemicals, herbicides.

INTRODUÇÃO

A inoculação de rizóbio em culturas de leguminosas tem sido usada em substituição aos fertilizantes sintéticos e outros tipos de fertilizantes naturais, pelo fato de ser um processo menos dispendioso e também eliminador do risco de contaminação ambiental (De-Polli & Franco 1985). No entanto, a aplicação de agrotóxicos para o controle de doenças e de ervas daninhas nestas culturas pode levar a uma interferência na sobrevivência da bactéria, no processo de infecção, na formação e desenvolvimento dos nódulos, ou na fixação do nitrogênio, prejudicando assim, a ação dessas bactérias (Diatloff 1986).

O objetivo do presente trabalho foi estudar a influência do fungicida pentacloronitrobenzeno (PCNB), do herbicida trifluralin e do fungicida metalaxil/mancozeb no crescimento e na atividade res-

piratória de diferentes estirpes de rizóbio utilizadas como inoculantes em nosso meio, levando-se em consideração a possibilidade de acúmulo destes agrotóxicos devido a aplicações repetidas, ou sua incorporação de forma não homogênea ao solo formando zonas de alta concentração.

MATERIAL E MÉTODOS

Inóculo

Foram utilizadas as bactérias *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (estirpes C-05 e C-05 II) e *Bradyrhizobium japonicum* (estirpes 29W e SEMIA 587), da Seção de Microbiologia de Solos do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), da Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. As bactérias foram cultivadas em meio líquido (Saito et al. 1985) ou acrescidas de ágar (12 g/l).

Agrotóxicos

Utilizaram-se os seguintes agrotóxicos: fungicida metalaxil/mancozeb (formulado com 10% de metalaxil e 48% de mancozeb, i.a.), herbicida trifluralin (grau técnico) e fungicida pentacloronitrobenzeno (PCNB, formulado, 75% i.a.).

Influência dos agrotóxicos no crescimento

Para a determinação da sobrevivência e contagem do número de colônias foram adicionadas ao meio liquefeito de cultura com ágar, soluções etanólicas dos compostos (5 ml etanol/100 ml meio): metalaxil/mancozeb: 1, 5, 10, 20, 50, 100 e 250 ppm; trifluralin: 10, 50, 100, 250 e 500 ppm; PCNB: 10, 50, 100 e 250 ppm; controle: somente etanol.

¹ Aceito para publicação em 2 de fevereiro de 1989
Auxílio financeiro da FAPESP.

² Bióloga, Bolsista de Aperfeiç. Cient. da FAPESP, Centro de Radioisótopos, Inst. Biol., Caixa Postal 7119, CEP 04014, São Paulo, SP.

³ Biol., Dra., Centro de Radioisótopos, Inst. Biol., SP.

⁴ Enga. - Agra., Dra., CENA/USP, Seção de Microbiol. de Solos, CEP 13400 Piracicaba, SP.

A partir de cultura previamente crescida, com a concentração aproximada de 10^9 cel/ml, procedeu-se ao plaqueamento. As placas foram então incubadas por um período de 7 a 9 dias em estufa a 30°C, após o qual comprovou-se presença ou ausência de crescimento em relação ao controle (sem agrotóxico), e contagem do número de colônias.

Influência dos agrotóxicos na atividade respiratória

A influência dos agrotóxicos na atividade respiratória das estirpes estudadas foi medida em dois experimentos, através da técnica de radiorrespirometria (Mayaudon 1971, Freitas et al. 1979). Foi usada, como substrato para radiorrespirometria, a D-glicose- ^{14}C , uniformemente marcada, (Amersham, Inglaterra) com atividade específica de 12,3 GBq/ μmol (333 m Ci/ μmol), na concentração de 3,7 kBq/ml (0,1 $\mu\text{Ci/ml}$) de atividade, acrescida de glicose não marcada (2,5 $\mu\text{mol/ml}$).

Experimento 1

Foram selecionadas para esta etapa as estirpes C-05 II e SEMIA 587 cultivadas em meio líquido. Na concentração aproximada de 10^9 cel/ml, 1 ml foi adicionado a 9 ml de meio líquido, contidos em Erlenmeyers de 50 ml. Na fase exponencial do crescimento (três dias para C-05 II e cinco dias para SEMIA 587) as culturas receberam 100 μl de solução etanólica dos compostos: metalaxil/mancozeb (10 e 20 ppm); trifluralin (250 e 500 ppm); PCNB (100 e 250 ppm), e controle (etanol).

A atividade respiratória da bactéria foi avaliada adicionando-se 100 μl da solução estoque de glicose- ^{14}C , e os Erlenmeyers tamponados com rolhas de borracha contendo um frasco com 0,5 ml de etanolamina, para captura do $^{14}\text{CO}_2$ evoluído. Após 24 horas de incubação, retirou-se o frasco com etanolamina e o $^{14}\text{CO}_2$ evoluído foi contado em cintilador de amostra líquida (Beckmann LS 100), utilizando-se o método de razão de canal com fonte externa (Musumeci & Ruegg 1984).

O $^{14}\text{CO}_2$ evoluído foi calculado segundo Freitas et al. (1979).

Experimento 2

Neste experimento, a solução de agrotóxico foi adicionada simultaneamente à inoculação da bactéria, para acompanhar o efeito na atividade respiratória durante todo desenvolvimento da cultura. Para este experimento, selecionou-se a estirpe C-05 II.

RESULTADOS

Crescimento

As estirpes ensaiadas foram sensíveis ao metalaxil/mancozeb nas concentrações utilizadas, sendo a C-05 II a estirpe mais resistente, por apresentar na

concentração de 10 ppm deste fungicida um crescimento 50% maior em relação ao observado no controle. As concentrações estudadas de trifluralin não ocasionaram inibição nas estirpes, apresentando-se estas como resistentes ao herbicida até mesmo na concentração de 250 ppm. O fungicida PCNB, nas concentrações ensaiadas, não inibiu o crescimento de C-05 II, no entanto a partir das concentrações de 50 e 250 ppm, as estirpes 29W e SEMIA 587 tiveram o crescimento inibido em mais de 50%.

O número de colônias C-05 e C-05 II (Tabela 1) em meio de cultura contendo metalaxil/mancozeb, foi drasticamente reduzido na concentração de 20 ppm. A SEMIA 587 apresentou-se bastante sensível, com redução no número de colônias até nas concentrações de 5 e 1 ppm de metalaxil/mancozeb. O herbicida trifluralin praticamente não alterou a multiplicação das estirpes 29W e C-05, e ativou a multiplicação de C-05 II, porém, a estirpe SEMIA 587 apresentou redução gradual na quantidade de colônias com o aumento da concentração do herbicida (Tabela 1). O fungicida PCNB não ocasionou alterações consideráveis no crescimento das colônias de C-05, ocorrendo ativação da estirpe C-05 II. A SEMIA 587, porém, teve redução do número de colônias quando o PCNB na concentração elevada de 250 ppm foi adicionado ao meio.

Influência na atividade respiratória

A presença do fungicida metalaxil/mancozeb no meio de cultura provocou aumento da atividade respiratória de C-05 II, e o trifluralin, na concentração de 50 ppm, inibiu a atividade respiratória desta estirpe. No entanto, o *B. japonicum* teve sua atividade respiratória ativada pela presença deste agrotóxico. A adição do fungicida PCNB provocou drástica redução da atividade respiratória de SEMIA 587 (Tabela 2).

O efeito dos agrotóxicos na atividade respiratória do *R. leguminosarum* C-05 II foi também verificado nos experimentos em que a bactéria ficou em contacto com a solução de agrotóxico desde o momento da inoculação até o prazo de 72 horas. Todas as soluções destes compostos ativaram a respiração da bactéria no período de 24 horas de incubação. O decréscimo que ocorreu posteriormente não produziu inibição na atividade respiratória com nenhuma das concentrações de agrotóxicos ensaiadas (Tabela 3).

TABELA 1. Número de colônias de estirpes de *R. leguminosarum* bv *phaseoli* e *B. japonicum* em meio sólido de ágar, acrescido de diferentes concentrações de agrotóxicos.

Agrotóxico	(ppm)	<i>R. leguminosarum</i> bv <i>phaseoli</i>		<i>B. japonicum</i>	
		(C-05) x 10 ⁷	(C-05 II) x 10 ⁸	(29 W) x 10 ⁷	(SEMIA 587) x 10 ⁷
Controle	0	1.140 ± 210	560 ± 110	1.540 ± 200	980 ± 100
Metalaxil/ mancozeb	1	1.350 ± 150	540 ± 170	1.710 ± 350	450 ± 80
	5	890 ± 23	420 ± 210	400 ± 0	40 ± 30
	10	ND ^a -	426 ± 28	161 ± 7	5 ± 3
	20	54 ± 15	2 ± 0	ND ^b -	ND ^b -
Trifluralin	100	1.080 ± 90	790 ± 280	1.360 ± 490	910 ± 180
	250	900 ± 60	740 ± 140	1.430 ± 150	770 ± 80
	500	910 ± 170	700 ± 160	1.400 ± 310	600 ± 130
PCNB	50	1.080 ± 30	690 ± 120	980 ± 500	690 ± 40
	100	1.160 ± 180	690 ± 140	1.440 ± 180	840 ± 370
	250	1.080 ± 230	800 ± 210	1.040 ± 550	260 ± 70

ND^a = não determinado, multiplicação excessiva.

ND^b = não determinado, ausência de multiplicação.

TABELA 2. ¹⁴CO₂ (μmol/ml/h) evoluído das culturas C-05 II de *R. leguminosarum* bv *phaseoli* e SEMIA 587 de *B. japonicum*, em meio líquido, acrescido de diferentes concentrações de agrotóxicos.

Agrotóxico	(ppm)	(C-05 II)	(SEMIA 587)
Controle	0	0,8138	0,3210
Metalaxil/ mancozeb	10	1,0395	0,3307
	20	1,1850	0,3495
Trifluralin	250	0,7010	0,3951
	500	0,4030	0,8891
PCNB	100	0,6716	0,0433
	200	0,4848	0,0332

DISCUSSÃO

O fungicida metalaxil/mancozeb foi introduzido recentemente no mercado brasileiro, em 1982, para controle de fungos dos Oomicetos, patógenos de diversas culturas, sendo recomendado nas aplicações foliares, em dosagens de 10 ppm. Em nossos experimentos, concentrações de 1 e 5 ppm foram suficientes para inibir o crescimento das diferentes estirpes de rizóbio.

A adição deste fungicida ao meio de cultura influenciou o crescimento do *B. japonicum* de forma negativa, porém, de acordo com Diatloff (1986), o metalaxil, na dose por ele utilizada (0,3%/kg de semente), não inibiu o crescimento de *B. japonicum* em ensaios de difusão em ágar. Assim, a sensibilidade do *B. japonicum* ao metalaxil, detectada em nossos experimentos, poderia ser atribuída à metodologia empregada, ou, ainda, às estirpes ensaiadas, que diferem nos dois casos, e principalmente à formulação do fungicida utilizado, que contém alta porcentagem de mancozeb, não sendo unicamente devida ao metalaxil, como no ensaio de Diatloff (1986).

O *B. japonicum* teve seu crescimento inibido pelo herbicida trifluralin. Este herbicida também exerceu ligeiro efeito depressor na multiplicação da estirpe C-05 de *R. leguminosarum*. Lopes et al. (1971) constataram que o herbicida trifluralin não alterava o crescimento deste inoculante, porém, deve-se notar que além da diferença nas estirpes ensaiadas, as concentrações por nós utilizadas foram bastante elevadas em relação às doses recomendadas (aproximadamente 1 ppm) para as culturas de feijão e soja. Entretanto, Campanhola et al. (1982) verificaram ausência de homogeneidade desse herbicida na incorporação ao solo. Esta falta de homogeneidade, assim como as repetidas aplicações, podem levar ao surgimento de áreas de concentrações, influenciando de forma negativa o inoculante.

As concentrações do PCNB não tiveram efeito considerável no crescimento das estirpes ensaiadas,

TABELA 3. $^{14}\text{CO}_2$ evoluído ($\mu\text{mol/ml/h}$) da cultura de *R. leguminosarum* C-05 II, incubada com diferentes concentrações de agrotóxicos.

Agrotóxico	(ppm)	Tempo (horas)				
		0	6	24	48	72
Controle	0	0,772	0,768	0,682	0,561	0,503
Metalaxil/ mancozeb	10	0,925	0,762	1,101	0,524	0,615
	20	0,646	0,665	1,050	0,365	0,441
Trifluralin	250	0,608	0,535	1,449	0,781	0,712
	500	0,462	0,614	1,248	0,708	0,666
PCNB	100	0,510	0,585	1,427	0,683	0,609
	250	0,454	0,458	1,018	0,764	0,461

sendo que elas excederam as doses de aplicação recomendadas de, aproximadamente, 60 ppm. No entanto, a atividade respiratória de SEMIA 587 foi altamente inibida por este agrotóxico, devendo-se levar em consideração, segundo Parr (1974), a possibilidade de ocorrência de regiões com concentrações acima das doses recomendadas, em decorrência de dificuldades de incorporação homogênea ao solo.

Observou-se, ainda, que o *R. leguminosarum* bv *phaseoli*, de crescimento mais rápido que o *B. japonicum*, foi mais resistente aos agrotóxicos. Relatos de Gillberg (1972) também evidenciaram maior resistência a herbicidas por estirpes de *R. meliloti*, de rápido crescimento.

Conforme Tesfai & Mallik (1986), as consideráveis variações entre as diferentes espécies de estirpes podem determinar respostas diferentes quando ensaiadas com diferentes agrotóxicos, o que coincide com as variações observadas nos experimentos aqui relatados. Por outro lado, não ocorreu inibição da atividade respiratória do *R. leguminosarum* ou do *B. japonicum* pela adição do metalaxil/mancozeb a meio líquido de cultura.

Embora alguma inibição respiratória do *R. leguminosarum* se tenha verificado quando as adições do trifluralin e do PCNB ocorreram na fase exponencial de crescimento da bactéria, não se constatou inibição quando a adição foi feita adrede a fase "lag", ocorrendo provavelmente uma adaptação da população bacteriana aos agrotóxicos ou uma utilização destes pela bactérias, demonstrando, assim, a possibilidade de resposta diferenciada, conforme o estágio de crescimento da cultura e a aplicação do agrotóxico. Por sua vez, Dunigan et al. (1970), citados por Hill

& Wright (1978), constataram ligeira inibição da atividade respiratória de *B. japonicum* pelo trifluralin.

De acordo com Fisher & Hayes (1981), a influência de um agrotóxico ensaiado em ágar não reflete necessariamente o comportamento em campo da estirpe estudada, podendo ocorrer, então, sensibilidade ou resistência alteradas nessas estirpes, quando da aplicação destes agrotóxicos em experimentos de campo.

CONCLUSÕES

1. O fungicida metalaxil/mancozeb inibiu o crescimento das estirpes SEMIA 587 de *B. japonicum* e C-05 II de *R. leguminosarum* bv *phaseoli*.
2. A estirpe C-05 II foi, em geral, mais resistente aos agrotóxicos do que a estirpe C-05, da qual é originada; e a estirpe SEMIA 587 foi a mais sensível a todos os agrotóxicos ensaiados.
3. Os agrotóxicos ensaiados estimularam a atividade respiratória da estirpe C-05 II.

REFERÊNCIAS

- CAMPANHOLA, C.; BROMILOW, R.H.; LORD, K.A.; RÜEGG, E.F. Comportamento do metribuzin e trifluralin no solo e na sua absorção por soja. *Pesq. agropec. bras.*, 17(4):565-71, 1982.
- DE-POLLI, H. & FRANCO, A.A. **Inoculação de sementes de leguminosas.** s.l. EMBRAPA-UAPNPBS, 1985. (EMBRAPA-UAPNPBS. Circular Técnica, 1)
- DIATLOFF, A. Compatibility of systemic and non-systemic fungicides with *Rhizobium japonicum* applied to soybean seed. *Soil Biol. Biochem.*, 18:121-22, 1986.

- FISHER, D.J. & HAYES, A.L. Effects of some fungicides used against cereal pathogens on the growth of *Rhizobium trifolii* and its capacity to fix nitrogen in white clover. **Ann. Appl. Biol.**, **98**:101-07, 1981.
- FREITAS, J.R.; NASCIMENTO FILHO, V.F.; VOSE, P.B.; RUSCHEL, A.P. Estimativa da atividade da microflora heterotrófica em solo de terra roxa estruturada usando respirometria com glicose - ^{14}C . **Energ. Nucl. Agric.**, **1**:123-30, 1979.
- GILLBERG, B.O. On the effects of some pesticides on *Rhizobium* and isolation of pesticide resistant mutants. **Arch. Mikrobiol.**, **75**:203-208, 1972.
- HILL, I.R. & WRIGHT, S.J.L. ed. **Pesticide microbiology**. New York, Acad. Press, 1978. p.325.
- LOPES, E.S.; DEUBER, R.; FOSTER, R.; GARGANTINI, H.; BULISANI, E.A. Influência dos herbicidas EPTC e trifluralin e da inoculação das sementes com *Rhizobium phaseoli* na nodulação e produção de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Bragantia**, **30**:109-116, 1971.
- MAYAUDON, J. Use of radiorespirometry in soil microbiology and biochemistry. In: McLAREN, A.D. & SKUGINS, S.J., ed. **Soil Biochemistry**. New York, USA. Ed. Marcel Dekker, 1971. p.202-55.
- MUSUMECI, M.R. & RUEGG, E.F. Influência dos fungicidas carbendazin e metalaxil na atividade biológica de solos. **Ci. Cult.**, **36**:618-621, 1984.
- PARR, J.F. Effects of pesticides on microorganisms in soil and water. In: GUENZI, W.D., ed. **Pesticides in Soil and Water**. Wisconsin, Soil Science Society of America, Inc. 1974. p.315-40.
- SAITO, S.M.T.; ARAUJO, J.M.; BARAIBAR, A.; GALLI, L.V. Survival of *Rhizobium* in the carrier. In: REUNIÃO DE INOCULANTES PARA RHIZOBIUM-LÉGUMINOSAS. Porto Alegre, 1985. p.22-5
- TESFAI, K. & MALLIK, M.A. B. Effect of fungicide application on soybean-rhizobia symbiosis and isolation of fungicide-resistant strains of *Rhizobia japonicum*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, **39**:819-826, 1986.