



TOXICIDADE DE HERBICIDAS SOBRE ESTIRPES DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO ASSOCIADAS AO FEIJÃO-CAUPI

NUNES, A. R. S. (UFV, Rio Paranaíba/MG – antonio.nunes@ufv.br), MONTEIRO, F. P.R. (UFT, Gurupi/TO, mestreuft@gmail.com), CHAGAS JUNIOR, A. F. (UFT, Gurupi/TO, chagasjraf@uft.edu.br), WALPERES, C. K. (UFV, Rio Paranaíba/MG – kellem.walperes@ufv.br), SANTOS, G. R. (UFT, Gurupi/TO, gilrsan@uft.edu.br), REIS, R. M. (UFV – CRP, Rio Paranaíba/MG – ronaldo.reis@ufv.br), REIS, M. R. (UFV – CRP, Rio Paranaíba/MG – marceloreis@ufv.br)

RESUMO: Objetivou-se neste trabalho avaliar os possíveis efeitos de herbicidas utilizados na cultura do feijão-caupi sobre estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio *in vitro*. Foi avaliada a toxicidade dos herbicidas às estirpes bacterianas fixadoras de nitrogênio, INPA 03-11B, BR 3299 e BR 3277, pela determinação do halo de inibição às 24, 72 e 96 horas após aplicação dos produtos. Os herbicidas utilizados foram: bentazon, clethodim, fomesafen, fluazifop-p-butil, fomesafen + fluazifop-p-butil, pendimethalin, s-metolachlor e trifluralin em doses recomendadas e dobro da dose recomendada para a cultura do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*). A estirpe de *Bradyrhizobium* INPA 03-11B apresenta resistência a todos os herbicidas aplicados na dose recomendada após 24, 72 e 96 horas de exposição. E, as estirpes BR 3299 e BR 3277 foram sensíveis ao s-metolachlor, trifluralin, pendimethalin, fomesafen, clethodim e fomesafen+fluazifop-p-butil até 72 horas após a aplicação.

Palavras-chave: resistência, sensibilidade, doses

INTRODUÇÃO

O uso de herbicidas constitui hoje uma das principais ferramentas para um bom programa de manejo integrado das plantas daninhas. No entanto, na cultura da feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), a inexistência de herbicidas registrados no Brasil para o controle de plantas daninhas, torna-se um limitante na recomendação e uso destes produtos no campo (Silva et al., 2009).

Todavia, os herbicidas recomendados para diferentes leguminosas podem apresentar efeitos deletérios ao processo de fixação do nitrogênio pela simbiose leguminosa-rizóbio. Há indicações de que diferentes herbicidas podem provocar intoxicação em estirpes de rizóbio e, também, podem prejudicar a nodulação em leguminosas (King et

al., 2001; Jacques et al., 2010). Sabe-se que a fixação biológica de nitrogênio (FBN) é reconhecidamente eficiente em feijão-caupi que, quando bem nodulado, pode atingir altos níveis de produtividade (Chagas Jr. et al., 2010).

Diante o exposto, objetivou-se neste trabalho avaliar os efeitos de diferentes herbicidas nas estirpes bacterianas fixadoras de nitrogênio do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.)) em ensaio de laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em laboratório na Universidade Federal do Tocantins, no campus de Gurupi-TO, com a estirpe de rizóbio INPA 03-11B obtida junto ao Laboratório de Microbiologia de Lavras, e para comparação as estirpes BR 3299 e BR 3277 obtidos na Embrapa Agrobiologia.

A análise de resistência das estirpes a herbicidas foi realizada por disco de difusão em ágar como descrito por Bauer et al. (1966), onde ocorre a difusão do pesticida na superfície do ágar, previamente inoculado, a partir de um disco contendo o herbicida.

Discos de papel de filtro qualitativo (90 mm e 80 g cm²) em branco com 1 cm de diâmetro foram impregnados com herbicidas puro e diluídos em calda na proporção de 160 L ha⁻¹ nas doses [bentazon (1,2 e 2,4 L ha⁻¹), clethodim (0,4 e 0,8 L ha⁻¹), fomesafen (1,0 e 2,0 L ha⁻¹), fluazifop-p-butil (2,0 e 4,0 L ha⁻¹), fomesafen + fluazifop-p-butil (1,0 e 2,0 L ha⁻¹), pendimethalin (3,0 e 6,0 L ha⁻¹), s-metolachlor (1,25 e 2,5 L ha⁻¹) e trifluralin (2,4 e 4,8 L ha⁻¹)] recomendadas e dobro da dose recomendada para a cultura do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), respectivamente, após terem sido filtrados com filtro de seringa com membrana 0,45 µm (modelo Swinnex-25 da Millipore®).

O inóculo foi obtido através da multiplicação bacteriana em meio YM (estrato de levedura e manitol) e mantidos em agitação (120 rpm) por 48 h. A inoculação foi realizada em placa de Petri contendo meio YMA (estrato de levedura, manitol e agar) (Vincent, 1970). Após secagem do excesso, foram adicionados os discos de papel com herbicidas, estabelecendo-se quatro discos por placa, sendo três repetições do herbicida e um disco de papel em branco (controle). As placas foram envolvidas por filme plástico de PVC e mantidas em estufa de crescimento bacteriológico a 28° C por 96 horas. Foram feitas três avaliações (24, 72 e 96 horas) determinando-se o halo de inibição. Foram considerados resistentes os isolados que apresentaram halo de inibição menor ou igual a 10 mm e sensíveis os demais segundo metodologia de Santos et al. (2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estirpe de *Bradyrhizobium* INPA 03-11B apresentou resistência a todos os herbicidas aplicados na dose recomendada após 24, 72 e 96 horas de exposição (Tabela 1).

Tabela 1. Resistência e sensibilidade de estirpes de rizóbio a diferentes herbicidas na dosagem recomendada e no dobro da dosagem recomendada do produto¹.

Herbicida	Bactéria	Doses recomendada				Dobro da dose recomendada			
		Halo 24 h (mm)	Halo 72 h (mm)	Halo 96 h (mm)	Sens.	Halo 24 h (mm)	Halo 72 h (mm)	Halo 96 h (mm)	Sens.
bentazon (Basagran 600)	BR 3299	**	**	**	R1	13,0	11,0	8,0*	R3
	BR 3277	**	**	**	R1	**	**	**	R1
	INPA 03-11B	**	**	**	R1	**	**	**	R1
clethodim (Select)	BR 3299	12,3	14,0	17,00	S	14,0	12,0*	10,0*	R3
	BR 3277	14,0	10,0*	7,0*	R2	17,7	15,7*	12,7*	S
	INPA 03-11B	**	**	**	R1	**	**	**	R1
fluazifop-p-butil (Fusilade)	BR 3299	**	**	**	R1	**	**	**	R1
	BR 3277	12,0	10,5	10,5	S	**	**	**	R1
	INPA 03-11B	**	**	**	R1	**	**	**	R1
fomesafen (Flex)	BR 3299	22,7	24,7	21,7	S	21,0	21,0	22,0	S
	BR 3277	22,0	20,0*	12,0*	S	**	**	**	R1
	INPA 03-11B	**	**	**	R1	**	**	**	R1
pendimethalin (Herbadox)	BR 3299	12,0	13,0	13,7	S	15,7	16,0	16,7	S
	BR 3277	14,3	16,0	13,0*	S	20,7	21,0	16,0*	S
	INPA 03-11B	**	**	**	R1	**	**	**	R1
fomesafen + fluazifop-p-butil (Robust)	BR 3299	18,0	20,7	21,3	S	23,0	25,0	32,3	S
	BR 3277	32,0	22,0*	17,0*	S	27,3	20,0*	15,0*	S
	INPA 03-11B	**	**	**	R1	**	**	**	R1
s-metolachlor (Dual Gold)	BR 3299	11,3	15,0	10,0*	R3	14,0	13,0	12,3	S
	BR 3277	10,0	10,7	8,0*	R3	12,0	11,3	8,3*	R3
	INPA 03-11B	**	**	**	R1	**	**	**	R1
trifluralin (Trifluralin)	BR 3299	9,0	14,0	14,0	S	17,5	18,5	18,5	S
	BR 3277	9,7	12,0	10,0*	R3	15,5	19,3	15,3*	S
	INPA 03-11B	**	**	**	R1	**	**	**	R1

¹ Doses recomendadas para a cultura do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*); * Diminuição do halo de inibição pela formação de colônias no halo; ** Não houve formação de halo de inibição.

Sens. Sensibilidade: R – Resistente; R1 - Resistência em 24 horas; R3 - Resistência em 96 horas; S - Sensível.

Todavia, as estirpes BR 3299 e BR 3277 foram sensíveis ao s-metolachlor, trifluralin, pendimethalin, fomesafen, clethodim e robust até 72 horas em contato com os herbicidas. Após 96 horas, houve resistência aos herbicidas s-metolochlor, trifluralin e cletodin para a estirpe BR 3277 e s-metolachlor para a estirpe BR 3299. Observou-se redução do halo de inibição para estas estirpes em contato com os demais herbicidas, porém, com halos de inibição superiores a 10 mm, caracterizando-as como sensíveis (Tabela 1). Procópio et al. (2004) observaram que imazethapyr e fomesafen aplicados em meio YM reduziram mais de 40% do crescimento de *Bradyrhizobium elkanii*.

Utilizando o dobro da dose recomendada dos herbicidas, a estirpe INPA 03-11B apresentou resistência para todos os herbicidas (Tabela 1). A estirpe BR 3277 apresentou resistência aos herbicidas fomesafen, bentazon e fluazifop a partir de 24 horas, e ao s-metolachlor e clethodim somente no período de 96 horas. Já a estirpe BR 3299 apresentou resistência ao herbicida fluazifop a partir de 24 horas, e aos herbicidas bentazon e cletodin somente na avaliação de 96 horas. A sensibilidade do rizóbio aos diferentes herbicidas pode ser influenciada pela concentração e pela estirpe de bactéria (King et al., 2001; Santos et al., 2004; Santos et al., 2011).

A mistura de fomesafen + fluazifop na dose recomendada provocou maior inibição do crescimento das estirpes BR 3299 e BR 3277. Ao comparar ambos herbicidas em mistura e isolados, observou-se que maior parte da inibição foi devido ao fomesafen. O fluazifop-p-butil demonstrou-se não tóxico à estirpe BR 3299 e pouco tóxico à BR 3277 (Tabela 1). A possível causa da alta toxicidade do herbicida fomesafen a esse rizóbio pode ser atribuída ao seu mecanismo de ação, o qual é inibidor da enzima protoporfirina IX em células tratadas com este herbicida, ocasionando a interação com o oxigênio e a luz, produzindo as formas reativas do oxigênio e consequente peroxidação dos lipídios e morte celular. Outra possível causa para este efeito pode ser atribuída à toxicidade de um ou mais ingrediente na formulação comercial do produto.

CONCLUSÕES

Observou-se que a estirpe de *Bradyrhizobium* INPA 03-11B apresentou resistência a todos os herbicidas aplicados na dose recomendada após 24, 72 e 96 horas de exposição. Todavia, as estirpes BR 3299 e BR 3277 foram sensíveis ao s-metolachlor, trifluralin, pendimethalin, fomesafen, clethodim e fomesafen+fluazifop-p-butil até 72 horas após a aplicação.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.4, p.493-496, 1966.
- CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Protocolo para análise da qualidade e da eficiência agrônômica de inoculantes, estirpes e outras tecnologias relacionadas ao processo de fixação biológica do nitrogênio em leguminosas. In: REUNIÃO DA RELARE, 13, 2007, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2007. p. 89-123.
- CHAGAS JR., A. F. et al. Eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio inoculadas em feijão-caupi no Cerrado, Gurupi-TO. **Revista Ciência Agronômica**, v.41, n.4, p.709-714, 2010.
- JACQUES, R. J. S. et al. Sensibilidade de estirpes de *Bradyrhizobium* ao glyphosate. **Revista Ceres**, v.57, n.1, p.028-033, 2010.
- KING, C. A.; PURCELL, L. C.; VORIES, E. D. Plant growth and nitrogenase activity of glyphosate-tolerant soybean in response to foliar glyphosate applications. **Agronomy Journal**, v.93, p.176-186, 2001.
- PROCÓPIO, S. O. et al. Crescimento de estirpes de *Bradyrhizobium* sob influência dos herbicidas glyphosate potássico, fomesafen, imazethapyr e carfentrazone-ethyl. **Revista Ceres**, v.51, n.294, p.179-188, 2004.
- SANTOS, J. B. et al. Efeitos de diferentes formulações comerciais de glyphosate sobre estirpes de *Bradyrhizobium*. **Planta Daninha**, v.22, n.2, p.293-299, 2004.
- SANTOS, J. A. et al. Tannery sludge compost amendment rates on soil microbial biomass in two different soils. **European Journal of Soil Biology**, v.1, p.146-151, 2011.
- SILVA, J. F.; ALBERTINO, S. M. F. Manejo de plantas daninhas. In: ZILLI, J. E.; VILARINHO, A. A.; ALVES, J. M. A. **A cultura do feijão-caupí na Amazônia brasileira**. Boa Vista: Embrapa Roraima, p. 223-243, 2009.
- VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970, 164p.