

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE AGROTÓXICOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO
DO Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli

PASCUAL ISOLDI PINKOSKI*

ELIANE MARIA MANARA ROSSONI**

SHEILA MARIA ROSITO***

As bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, via processo simbiótico, repassam N₂ às leguminosas sob forma de amônia, proporcionando aumento na produção de alimentos protéicos, reciclagem biológica de nitrogênio do ar, evitando o alto custo da adubação nitrogenada e o efeito potencialmente poluidor do nitrato lixiviado. Testou-se quatro estirpes de Rhizobium phaseoli frente a quatro fungicidas indicados para o tratamento de sementes de Phaseolus vulgaris L. (feijoeiro), no Estado do Rio Grande do Sul (Brasil). Considerando-se as dosagens recomendadas dos fungicidas, houve crescimento bacteriano das quatro estirpes frente a Benomil e inibição total frente a Captan; porém, para PCNB e Thiram, a resistência dependeu do tipo de estirpe. Observou-se que não há influência de fungicidas sobre o desenvolvimento do Rhizobium phaseoli quando seleciona-se a estirpe adequada ao fungicida corretamente dosado.

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio é um nutriente essencial às plantas, mas de difícil assimilação na forma em que se apresenta, pois apenas 5% do nitrogênio do solo encontra-se sob forma inorgânica (amônia e nitrato), capaz de ser absorvido pelas plantas, e somente uma pequena parte do nitrogênio orgânico (aminoácidos e açúcares aminados) pode ser inicialmente

* Engº Químico da Fundação de Ciência e Tecnologia (CIENTEC).

** Farm.Bioquímica da Fundação de Ciência e Tecnologia (CIENTEC).

*** Estudante de Eng.Quiímica, Bolsista do CNPq e FAPERGS.

fixado por microrganismos procarióticos (bactérias fixadoras livres e simbióticas) (3).

Na fixação simbiótica existe interação entre a bactéria e a leguminosa, onde o nitrogênio captado pelo microrganismo é repassado à planta hospedeira sob a forma de amônia, que se combinará com os ácidos orgânicos provenientes da fotossíntese na formação dos aminoácidos (3).

Entretanto, no passado, como o custo da unidade de nitrogênio era relativamente baixo, os países industrializados utilizavam elevadas quantidades de fertilizantes nitrogenados para aumentarem a produtividade das gramíneas. Assim, as leguminosas, mesmo fixando eficientemente o nitrogênio, não podiam competir com as gramíneas em termos de proteína total produzida por unidade de área, quando estas eram adequadamente adubadas com nitrogênio. Como consequência dessa orientação, o uso intensivo de fertilizantes nitrogenados determinou desequilíbrio nos processos microbiológicos responsáveis pela manutenção do balanço de nitrogênio no solo. A acumulação de formas inorgânicas de nitrogênio no solo, seguidas de lixiviação pelas águas de percolação e pelo escorramento superficial ocasionado pela erosão, têm determinado o acúmulo de amônia e nitrato nos cursos de água com consequente desequilíbrio ecológico, podendo atingir o estágio de eutrofização. Como decorrência da poluição dos cursos de água associada ao alto custo dos adubos nitrogenados, os países desenvolvidos começaram a intensificar os programas de pesquisa sobre a fixação biológica de nitrogênio por meio de diferentes mecanismos e em diferentes ecossistemas. Paralelamente, devido ao alto custo e baixa disponibilidade de fertilizantes nitrogenados, os países subdesenvolvidos vêem, na possibilidade de maior utilização dos benefícios da fixação biológica de nitrogênio, uma alternativa para a melhoria da produtividade agrícola por aumentar a retenção do nitrogênio no solo sob formas orgânicas complexas com liberação lenta e contínua de amônia ao solo (3).

O presente estudo teve como objetivo avaliar o desenvolvimento do microrganismo Rhizobium phaseoli em plantas da Família leguminosae, mais especificamente Phaseolus vulgaris L. (feijoeiro), bem como acompanhar a influência, sobre estirpes de Rhizobium (SEMIA 487, SEMIA 4026, SEMIA 4064 E SEMIA 4077), de agrotóxicos selecionados para feijão, de uso corrente na Região Sul do Brasil, especificamente no Rio Grande do Sul.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

A disponibilidade de nitrogênio mineral para as plantas está na dependência direta da contínua decomposição de matéria orgânica e da aplicação de adubação nitrogenada, sendo o processo de fixação (redução biológica) do nitrogênio atmosférico (N_2) restrito a microrganismos que ocorrem livremente no solo, ou em associação com espécies vegetais (1).

A grande importância da simbiose Rhizobium - leguminosa está condicionada ao valor da reciclagem biológica do nitrogênio do ar que promove, em substituição ao uso de energia de origem fóssil, bem como ao alto custo da adubação nitrogenada e ao efeito potencialmente poluidor do nitrato lixiviado (4).

Entretanto, o maior resultado prático dessa simbiose é o aumento da produção de alimentos protéicos como o feijão, acompanhado de uma economia substancial nos custos destinados à produção da cultura do feijoeiro.

A reciclagem do nitrogênio atmosférico, gás que totaliza 78% do ar, consiste na redução de N_2 (forma não absorvida pelas plantas) em NH_3 , por bactéria do gênero Rhizobium dentro de estruturas especiais desenvolvidas nas raízes, chamadas nódulos (4).

Fatores que atuam na fixação biológica de nitrogênio

Há três fatores que atuam na fixação biológica de nitrogênio quando se trata da simbiose entre a bactéria e a planta, ou seja:

ores inerentes ao macrossimbionte - Phaseolus vulgaris (feijoeiro)

Uantidade de carboidratos solúveis para os nódulos; período até o florescimento, e capacidade de absorver nitrogênio do solo.

ores inerentes ao microssimbionte - Rhizobium phaseoli (bactéria fixadora de N₂)

feijoeiro forma sua associação simbiótica com o Rhizobium phaseoli; quando este microrganismo está sente no solo, naturalmente ou via inoculação, ele encontra e infecta as raízes da planta hospedeira, provocando a formação do nódulo onde ocorrerá a fixação do nitrogênio (1).

Diferenças nas estirpes de rizóbio capazes de infectar o feijoeiro são detectadas quanto ao potencial de fixação de nitrogênio, amplitude de variedades noduladas cientemente e na capacidade de infecção diante das estirpes já estabelecidas no solo (4).

Na iniciação do nódulo, o Rhizobium transforma-se em teróide, para de se multiplicar e começa a sintetizar a nitrogenase, a enzima responsável pela redução do nitrogênio à amônia, iniciando-se a fixação. Os teróides utilizarão os produtos da fotossíntese da planta como suprimento de energia, liberando, em troca, no citosol do nódulo, as formas amoniacais de nitrogênio que serão incorporadas a esqueletos de aminoácidos e transportadas (sob a forma de ureídos no feijoeiro) para outras partes da planta, onde serão usadas na biossíntese de proteínas vegetais (1).

Para que estirpes de Rhizobium phaseoli possam ser recomendadas para a inoculação do feijão, é preciso conhecer, entre outros atributos, a sua eficiência na fixação de nitrogênio e a capacidade de se estabelecerem no solo e competirem com os microrganismos ali presentes. Estes são os principais requisitos para o uso de uma estirpe de Rhizobium em inoculantes para o plantio de leguminosas (1).

□ Fatores inerentes ao solo

Supõe-se que o meio ambiente tenha papel relevante na habilidade de uma estirpe "ganhar" a competição com as outras, mas o controle de seus efeitos é difícil. Além disso, não se sabe se os fatores de competitividade são inerentes apenas às bactérias, às plantas, ao meio ambiente ou à interação de dois ou três desses componentes (1).

Os fatores relevantes relacionados ao solo são: acidez (pH ótimo para o crescimento do feijoeiro situa-se entre 5,5 e 6,7); fósforo (nutriente que mais limita a fixação biológica de nitrogênio); adubação nitrogenada (tem sido prejudicial à nodulação e à atividade de nitrogenase de modo acentuado em feijoeiro); temperatura (em feijoeiro, consideram-se temperaturas entre 25 e 30°C como as mais favoráveis à fixação de nitrogênio), e umidade do solo (fator de suma importância no estabelecimento da nodulação em feijoeiro e na atividade nodular) (4).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO E OBTENÇÃO DE ESTIRPES DE Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli

As estirpes selecionadas para a execução desse trabalho foram cedidas pelo INSTITUTO DE PESQUISAS AGRONÔMICAS (IPAGRO) e pertencentes à coleção de culturas de Rhizobium do IPAGRO/MIRCEM.

Foram cedidas quatro estirpes em culturas puras liofilizadas, identificadas da seguinte maneira:

- SEMIA 487 - IPAGRO;
- SEMIA 4026 - UFRGS;
- SEMIA 4064 - UNIVERSIDADE DE MINNESOTA;
- SEMIA 4077 - UNIVERSIDADE DE MINNESOTA.

3.2 SELEÇÃO DE AGROTÓXICOS

No decorrer do período em que houve contato com técnicos especializados (fitossanitaristas, fitopatologistas e engenheiros agrônomos), ocasião em que procurava-se informações sobre o tratamento de sementes de feijão e, consequentemente, a possível viabilidade e/ou necessidade de aplicação de agrotóxicos em tais sementes, constatou-se que a única classe viável era a dos fungicidas, pois os herbicidas e os inseticidas não são recomendados para tratamento de sementes, os quais foram descartados para este estudo.

A partir de tais informações, procurou-se selecionar os fungicidas de maior aplicação em culturas de feijão da Região Sul, quais sejam: Benomil, PCNB e Thiram; porém, alguns técnicos sugeriram que se testasse, também o Captan.

Estes produtos foram fornecidos pelas seguintes empresas:

- BENOMIL: IPAGRO - INSTITUTO DE PESQUISAS AGRONÔMICAS
- CAPTAN: HOKKO DO BRASIL - INDÚSTRIA QUÍMICA E AGROPECUÁRIA
- PCNB: LABORATÓRIOS PFIZER LTDA
- THIRAM: RHODIA (CNDA).

3.3 ANÁLISE E SELEÇÃO DE MEIOS DE CULTURA

Adotou-se o meio de cultura segundo MAZZA et al (2) de boa eficiência e de fácil preparação.

Meio líquido para desenvolvimento de Rhizobium phaseoli, segundo MAZZA et al (1976):

• GLICEROL.....	10,0 g (8,13 mL)
• EXTRATO DE LEVEDURA.....	4,0 g
• K ₂ HPO ₄	0,5 g
• MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
• NaCl.....	0,1 g
• KNO ₃	0,8 g
• (NH ₄) ₂ HPO ₄	0,3 g
• SOLUÇÃO A*	2 gotas
• SOLUÇÃO B**.....	2 gotas
• ÁGUA DESTILADA.....	1000,0 mL

Nota: * SOLUÇÃO A: solução a 10% de MnSO₄

MnSO₄ 10,0 g

ÁGUA DESTILADA.. 100,0 mL

** SOLUÇÃO B solução a 10% de FeCl₃

FeCl₃..... 10,0 g

ÁGUA DESTILADA.. 100,0 mL

Meio sólido para desenvolvimento de Rhizobium phaseoli

- Meio líquido com adição de 15,0 g de Ágar-Ágar.

3.4 EQUIPAMENTOS, VIDRARIA E REAGENTES

Os equipamentos usados pertencem ao Laboratório de Biotecnologia da FUNDAÇÃO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA (CIENTEC), os quais serão citados a seguir:

- câmara climática mod. 346, marca FANEM;
- capela de fluxo laminar mod. FLV - série 445, marca TROX;
- estufa incubadora para B.O.D. mod. 347, marca FANEM;
- autoclave vertical mod. 103, marca FABBE-PRTMAR;
- balança eletrônica, marca MARTE;
- banho-Maria tipo DUBNOFF TE 093, marca TECHAL;
- freezer BRASTEMP mod. 340 DUPLEX;
- forno de microondas SHARP CAROUSEL SM;

- contador de colônias BIOMATIC;
- medidor de pH digital mod. DMPH-3, marca DIGIMED, e
- destilador QUIMIS.

A vidraria disponível é comum aos Laboratórios de Microbiologia.

Os reagentes empregados são usuais para formulação de meios de cultura, bem como indicadores, soluções de sulfato de manganês e de cloreto férrico, solventes, álcool 70% e álcool iodado para esterilização.

3.5 ENSAIOS EXPERIMENTAIS

3.5.1 Preparação e esterilização dos meios de cultura

A vidraria empregada na preparação do meio de cultura foi previamente esterilizada por autoclavagem.

Os reagentes sólidos após pesados em balança eletrônica foram dissolvidos em um litro de água destilada, resultando no meio líquido que deve apresentar pH próximo de 7,2. Este meio é acondicionado em erlenmeyers de 250 mL, sendo tampados com algodão e vedados com papel laminado para posterior esterilização em autoclave vertical, a temperatura de 120°C e pressão de 1 atm, durante 15 minutos.

Todo material esterilizado foi guardado em freezer a temperatura de 4°C.

A preparação do meio sólido foi realizada da mesma forma; porém, acrescentando-se, à formulação do meio líquido, 15 g de Ágar-Ágar.

3.5.2 Recuperação de culturas liofilizadas de *Rhizobium*

Procedeu-se de acordo com orientações da Seção de Microbiologia do Solo e Normas da Secretaria da Agricultura e Abastecimento, para realizar-se a recuperação de ampolas contendo culturas liofilizadas de *Rhizobium* em capela de fluxo laminar ou câmara asséptica (adição do inóculo em meio sólido, incubação a 28°C em estufa por 3 a 5 dias, até completo desenvolvimento das colônias).

3.5.3 Semeadura das estirpes selecionadas

A semeadura foi realizada em capela de fluxo laminar, onde as colônias recuperadas de *Rhizobium* foram transferidas para o meio de cultura líquido selecionado. Após, os frascos contendo o caldo inoculado são incubados em câmara climática ou em banho-Maria, sob agitação, a 28°C por 5 dias originando a cultura-mãe.

3.5.4 Isolamento de colônias de *Rhizobium* a partir da cultura-mãe

Esta etapa tem como finalidade verificar se a cultura está pura, isolando-se o microrganismo. Como técnica de isolamento, adotou-se o método das estrias, constituindo-se na transferência da colônia do microrganismo para placas de Petri contendo meio de cultura sólido (com Ágar). Esta transferência foi realizada com alça de platina, respeitando-se as exigências de assepsia, no interior da capela de fluxo laminar.

Após o isolamento das colônias, as placas são introduzidas em estufa incubadora a 28°C, durante 5 dias em média, em posição invertida.

3.5.5 Contagem "pour-plate"

A contagem "pour-plate" determina o número de bactérias por volume (mL) de cultura-mãe, com o objetivo de determinar a melhor diluição a ser usada para os testes definitivos com os fungicidas.

3.5.6 Estudo do crescimento bacteriano

As estirpes selecionadas de *Rhizobium phaseoli* apresentaram um excelente crescimento, demonstrando que as quatro estirpes podem ser inoculadas em feijão. Vale mencionar que os ensaios desenvolvidos foram "in vitro", com meio de cultura segundo MAZZA et al (2). Nesta fase, não havia sido adicionado nenhum tipo de agrotóxico ao meio de cultura contendo o inóculo.

Testes com os fungicidas

os quatro fungicidas selecionados (Benomil, Captan, Thiram) foram testados em três etapas distintas, quais: dosagem recomendada, dosagem acima da recomendada e em abaixo da recomendada.

Estes produtos foram adicionados ao meio de cultura (com Ágar-Ágar) ainda quente, para que pudessem ser lividos na maior parte possível. Após, este meio com o cida foi adicionado às placas de Petri contendo o rganismo e incubadas a 28°C, durante 5 dias, em média.

Após este período, as colônias foram analisadas e ificadas em contador de colônias BIOMATIC, para avaliar ciência do crescimento bacteriano para cada estirpe e a cada um dos diferentes fungicidas, bem como a em destes.

ULTADOS E DISCUSSÃO

nto à recuperação das culturas liofilizadas de Rhizobium phaseoli

houve maiores problemas, obtendo-se bom resultado em placas de Petri, com crescimento do microrganismo dentro prazo previsto (média de 5 dias). Ocorreram algumas contaminações em algumas culturas contendo o inóculo; porém, diante da bateria de testes realizados pode-se sperar tais resultados.

ndo à semeadura

semeadura foi facilitada devido ao uso de capela de luxo lâminar, evitando possíveis contaminações devido à manipulação de materiais e proporcionando maior segurança operadora.

□ Quanto ao isolamento do microrganismo

Na tentativa de usar meio de cultura com corante, para facilitar a visualização das colônias, obteve-se problemas relacionados com a consistência dos meios preparados com diferentes corantes, pois ambos dificultaram a introdução da colônia do microrganismo pelo método das estrias, esfacelando o meio contido na placa, quando fazia-se o movimento de zigue-zague; o que não aconteceu com o meio sem corante, sendo; portanto, adotado este último sem maiores problemas.

□ Quanto ao crescimento bacteriano

Pode-se perceber que as estirpes fornecidas pelo IPAGRO são de boa qualidade e que os métodos adotados são eficientes, pois obteve-se crescimento bacteriano, em estufa bacteriológica, dentro dos parâmetros aceitáveis, desde a consistência do caldo após o período de incubação até a coloração das colônias.

□ Quanto à influência dos fungicidas sobre o desenvolvimento do Rhizobium phaseoli

* BENOMIL

Na dosagem recomendada, todas as estirpes apresentaram crescimento bacteriano, não havendo nenhum tipo de inibição. Portanto, testou-se a dosagem acima da recomendada, a qual foi estimada em 100% superior à primeira, onde observou-se comportamento diferenciado para cada estirpe. A SEMIA 487 apresentou algum crescimento, as SEMIAS 4026 e 4064 apresentaram inibição total de crescimento; porém, a SEMIA 4077 demonstrou bom crescimento bacteriano, mostrando-se mais resistente a este fungicida.

* CAPTAN

Este fungicida é extremamente nocivo a qualquer estirpe testada, pois demonstrou inibição total em, qualquer dosagem (até em 50% inferior à recomendada) e para todas as quatro estirpes testadas. Vale mencionar, novamente, que este produto só foi testado a pedido de técnicos da área de agronomia, para efetivar-se o seu alto potencial de toxicidade frente ao Rhizobium.

* PCNB

Na dosagem recomendada, este fungicida permitiu crescimento bacteriano para as estirpes SEMIAS 4026, 4064 e 4077; porém não permitiu bom crescimento para a SEMIA 487. Testando-se dosagens acima da recomendada (25% maior), houve crescimento para a estirpe SEMIA 4077, não houve bom crescimento para a SEMIA 4064 e, para as SEMIAS 487 e 4026 não houve nenhum crescimento.

* THIRAM

Para a dosagem recomendada, as estirpes SEMIAS 487, 4026 e 4077 apresentaram bom crescimento bacteriano; porém a 4064 apresentou crescimento duvidoso. Quando testou-se o produto com dosagem 25% acima da recomendada, não houve crescimento em três estirpes, podendo haver um crescimento sensível para a SEMIA 4077.

5 CONCLUSÃO

A possibilidade de aporte de nitrogênio, através da inoculação de microrganismos, às culturas de leguminosas trará enorme economia ao produtor, descartando a necessidade do uso de fertilizantes nitrogenados no solo, e significativa melhoria na produtividade agrícola, originando elevação na

produção de alimentos protéicos como o feijão e, consequentemente, mantendo-se equilíbrio ecológico na área de plantação, já que trata-se de um processo totalmente natural.

Considerando-se dosagens recomendadas dos fungicidas, houve crescimento bacteriano das quatro estirpes frente a Benomil e inibição total frente a Captan; porém, para PCNB e Thiram, a resistência dependeu do tipo de estirpe.

Observou-se que não há influência de fungicidas sobre o desenvolvimento do Rhizobium phaseoli quando seleciona-se a estirpe adequada ao fungicida corretamente dosado.

ABSTRACT

The bacteria fixer of the atmospherical nitrogen, through symbiotic process, to repass N₂ for leguminous below form by ammonia, to proportion increase in the production of proteans foods, biological return of air nitrogen and to avoid the high cost of nitrogen manuring and the effect to pollute potentially of the lixiviate nitrate. It was tested four lineage of the Rhizobium phaseoli with four fungicides to indicate for treatment of seed of the Phaseolus vulgaris L. (bean) in the Rio Grande do Sul (Brazil). Considering dosages recommended of fungicides to had grown bacterial of the four lineage with Benomil and total inhibition with Captan, but for PCNB and Thiram, the resistance depend of the type of lineage. It was observed that there isn't influence of fungicides on the development of the Rhizobium phaseoli when to select the lineage adequate with the fungicide correcting dosed.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ARAÚJO, R.S., HENSON, R.A. Fixação biológica de nitrogênio. In: ZIMMERMANN, M.J.O. et al. Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba : Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1988. p. 213-227.
- 6 MAZZA, L.A. et al. Obtención de cultivos de Rhizobium japonicum em um fermentador sin agitación mecanica. R.da Associação Argentina de Microbiología, La Plata, v.8, p. 99-103, 1976.
- 3 VIDOR, C. et al. Fixação biológica do nitrogênio pela simbiose entre Rhizobium e leguminosas. Boletim Técnico IPAGRO, Porto Alegre, v. 11, p. 1-52, 1983.

ERRATA

Verificado erro no gráfico (Figura 4) da página 29, do volume 2, número 2, deste periódico, publica-se abaixo o gráfico correto.

FIGURA 4 - POLIEDROS DE AgNPV HETEROCOAGULADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CaF₂ EM pH 5.5

