

JOSÉ BARBOSA DOS SANTOS

ATIVIDADE MICROBIANA APÓS APLICAÇÃO DE HERBICIDAS
UTILIZADOS NO CULTIVO DO FEIJOEIRO

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia,
para obtenção do título de “*Doctor
Scientiae*”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

JOSÉ BARBOSA DOS SANTOS

ATIVIDADE MICROBIANA APÓS APLICAÇÃO DE HERBICIDAS
UTILIZADOS NO CULTIVO DO FEJJOEIRO

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fitotecnia, para obtenção
do título de "*Doctor Scientiae*".

APROVADA: 21 de outubro de 2005.


Prof. Mauricio Dutra Costa
(Conselheiro)


Prof. Francisco Affonso Ferreira
(Conselheiro)


Prof. Sergio de Oliveira Procopio


Prof. Laércio Zambolim


Prof. Antonio Alberto da Silva
(Orientador)

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

S237a
2005

Santos, José Barbosa dos, 1976-

Atividade microbiana após aplicação de herbicidas
utilizados no cultivo do feijoeiro / José Barbosa dos San-
tos. - Viçosa : UFV, 2005.
x, 71f : il. ; 29cm.

Orientador: Antonio Alberto da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografias.

1. Herbicidas. 2. Feijão - Efeito dos herbicidas.
3. Fluazifop-p-butil. 4. Fomesafen. 5. Microrganismo de
solo. 6. Erva daninha - Controle integrado. I. Universida-
de Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 632.954

Ao meu amor Alyne Myriam por me mostrar o maior e melhor de todos os sentimentos e ao pequeno José Arthur por representar todo nosso amor.

Aos meus pais, Sebastião e Maria por terem me ensinado tudo sobre respeito, humildade e como agradecer a Deus pela vida.

Aos meus irmãos, Gorete, Edson, Arnaldo, Imaculada, Inês, José Carlos e Elizângela, e ao sobrinho Vitor, pelos quais tenho o maior orgulho e admiração.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, em particular aos Departamentos de Fitotecnia e Microbiologia, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – pela concessão da bolsa.

Ao Professor Antonio Alberto da Silva, pela orientação e amizade.

Ao Professor Maurício Dutra Costa, pelo estímulo e sugestões que contribuíram para realização deste trabalho.

Ao Professor Francisco Affonso, pelo auxílio durante a realização do curso e pelas sugestões.

Aos amigos Evander, Rafael Vivian e Adriano, pelo companheirismo.

Aos colegas Akihiko, Alessandra, Alexandre, Amanda, André Narvais, Aroldo, Francisco, Gino, Irene, Leonardo, Luis Henrique, Marcelo, Márcia, Marcos, Marliane, Rafael Viana e Rodrigo, pela amizade e pelo convívio.

Ao Centro Nacional de Pesquisa da EMBRAPA/Agrobiologia, pelo fornecimento das estirpes de *Rhizobium*.

BIOGRAFIA

JOSÉ BARBOSA DOS SANTOS, filho de Sebastião das Graças dos Santos e Maria Marta Barbosa dos Santos, nasceu em Presidente Bernardes, Estado de Minas Gerais, Brasil, no dia 01 de maio de 1976.

Em maio de 2002, graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Em setembro de 2002, iniciou o curso de Mestrado em Fitotecnia na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em 13 de fevereiro de 2004. Em março do mesmo ano iniciou o curso de Doutorado em Fitotecnia na mesma instituição, submetendo-se à defesa de tese em 21 de outubro de 2005.

CONTEÚDO

<i>RESUMO</i>	vii
<i>ABSTRACT</i>	ix
1. <i>INTRODUÇÃO GERAL</i>	01
2. <i>ATIVIDADE MICROBIANA DO SOLO, CULTIVADO COM FEIJÃO (Phaseolus vulgaris) APÓS A APLICAÇÃO DE HERBICIDAS</i>	06
2.1 <i>Introdução</i>	08
2.2 <i>Material e Métodos</i>	10
2.3 <i>Resultados e Discussão</i>	13
2.4 <i>Conclusões</i>	20
2.5 <i>Literatura Citada</i>	22
3. <i>ATIVIDADE MICROBIANA DO SOLO APÓS APLICAÇÃO DE HERBICIDAS EM SISTEMAS DE PLANTIO DIRETO E CONVENCIONAL</i>	25
3.1 <i>Introdução</i>	27
3.2 <i>Material e Métodos</i>	29
3.3 <i>Resultados e Discussão</i>	30
3.4 <i>Conclusões</i>	41

3.5 Literatura Citada.....	42
4. AÇÃO DE HERBICIDAS SOBRE O CRESCIMENTO DE ESTIRPES DE <i>Rhizobium tropici</i>	45
4.1 Introdução.....	47
4.2 Material e Métodos.....	48
4.3 Resultados e Discussão.....	50
4.4 Conclusões.....	64
4.5 Literatura Citada.....	65
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
6. CONCLUSÕES FINAIS.....	70

RESUMO

SANTOS, José Barbosa, D.S., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2005.
Atividade microbiana após aplicação de herbicidas utilizados no cultivo do feijoeiro. Orientador: Antonio Alberto da Silva. Conselheiros: Maurício Dutra Costa e Francisco Affonso Ferreira.

A demanda por informações sobre o impacto causado por herbicidas de médio efeito residual no solo motivou o estudo de indicadores microbiológicos que possibilitassem medir o distúrbio provocado à microbiota do solo após a aplicação desses produtos para o controle de plantas daninhas, dando ênfase à cultura do feijoeiro. Dessa forma, foram conduzidos três experimentos com o objetivo geral de verificar o impacto provocado pelos herbicidas fomesafen e fluazifop-p-butil, isolados ou em mistura pré-formulada, largamente utilizados no manejo das plantas daninhas na cultura do feijoeiro, sobre a atividade dos microrganismos do solo. No primeiro experimento, realizado em campo, ao longo do cultivo do feijoeiro, em dois sistemas de plantio – convencional (SPC) e direto (SPD) – avaliaram-se, após a aplicação dos herbicidas mencionados, a respiração basal da microbiota do solo, o carbono da biomassa microbiana

(CBM), o quociente microbiano (qMIC), o quociente metabólico (qCO₂), a porcentagem de colonização de raízes do feijoeiro por fungos micorrízicos e, ao final do ciclo, o rendimento de grãos. No segundo experimento, a partir de amostras de solo representando SPC e SPD, verificou-se, em laboratório, o efeito da adição de diferentes concentrações dos mesmos herbicidas, isolados e em mistura pré-formulada, sobre a respiração basal da microbiota do solo, CBM e qCO₂. No último experimento, avaliou-se o crescimento das estirpes de *Rhizobium tropici* BR 322 e BR 520, utilizadas como inoculantes na cultura do feijoeiro no Brasil, em meio de cultura, adicionado dos principais herbicidas utilizados ao longo do ciclo do feijoeiro (bentazon, s-metolachlor, imazamox e paraquat, além do fluazifop-p-butil e do fomesafen). De maneira geral, os indicadores microbiológicos avaliados ao longo do ciclo do feijoeiro se mostraram sensíveis à ação dos diferentes herbicidas testados, além de demonstrarem o menor impacto negativo do SPD sobre a microbiota do solo em comparação ao SPC. O qCO₂ que estima a eficiência da microbiota do solo em utilizar o carbono da matéria orgânica, evidenciou que a aplicação dos herbicidas testados causou maior impacto negativo quando sobre o solo do SPC. Com o aumento da concentração do fomesafen, observou-se diminuição da microbiota do solo, sendo mais prejudicial na mistura comercial. A partir dos resultados da tolerância das estirpes de rizóbio aos herbicidas, verificou-se que o paraquat promoveu maior inibição do crescimento, seguido pelo fomesafen. Entre as estirpes, BR 520 apresentou maior tolerância à maioria dos herbicidas testados.

ABSTRACT

SANTOS, José Barbosa, D.S., Universidade Federal de Viçosa, October, 2005.

Microbial activity after herbicide application on common bean crop.

Advisor: Antonio Alberto da Silva. Committee Members: Maurício Dutra Costa and Francisco Affonso Ferreira.

The search for information about the impact caused by herbicide on soil motivated the study of microbiological indicators that could measure the harm caused to soil microbiota after the application of products to control weeds, mainly in the common bean crop. Thus, three experiments were conducted in order to verify the impact caused by fomesafen and fluazifop-p-butyl herbicide, isolated or in a commercial mixture on soil microbial activity. The first experiment was conducted under no-till (NTS) and conventional-till (CTS) systems. After herbicide application, the soil was evaluated measuring basal respiration of soil microbiota, microbial biomass carbon (MBC), microbial quotient (qMIC), metabolic quotient (qCO₂), root colonization by mycorrhizal fungi and grain yield at the end of the cycle. In the second experiment, conducted in the laboratory, the effect of adding different concentrations of the same herbicide on basal respiration of soil microbiota, MBC and qCO₂ was evaluated. The growth of *Rhizobium tropici* BR 322 and BR 520 was evaluated in the last

experiment, by adding the herbicides (bentazon, metolachlor, imazamox and paraquat, plus the fluazifop-p-butyl and fomesafen). Microbiological indicators were sensitive to the tested herbicides, besides showing the efficiency of NTS in comparison to CTS. The qCO_2 showed that herbicide application caused higher negative impact in CTS. With increasing fomesafen concentrations, soil microbiota decreased, being in commercial mixture, paraquat provided higher growth inhibition, followed by fomesafen. The *Rhizobium tropici* strains BR 520 showed higher tolerance to most of tested herbicides.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Em consequência do uso indiscriminado de pesticidas na agricultura e da rápida degradação dos solos cultivados, termos como manejo integrado de pragas, cultivo mínimo do solo, plantio direto na palha, qualidade da água, do solo e do ar, passaram a fazer parte das pesquisas em nível mundial para o estudo da sustentabilidade dos sistemas agrícolas (Stenberg, 1999; Tótola & Chaer, 2002). Estes estudos objetivam gerar tecnologias que permitam elevada produtividade de alimentos com qualidade e custo financeiro viável, promovendo pequeno impacto ambiental negativo. Também novas técnicas para descontaminação de ambientes que receberam a aplicação de herbicidas residuais estão sendo desenvolvidas, principalmente no campo da biorremediação – fitorremediação – que emprega a utilização de plantas para diminuir o resíduo destes produtos no ambiente (Pires et al, 2003; Santos et al., 2004; Procópio et al., 2005).

Uma das grandes preocupações atuais tem sido o efeito de moléculas tóxicas a organismos não-alvo. O monitoramento dessas moléculas no ambiente pode ser dificultado pela falta de indicadores que informem com maior precisão o real impacto da utilização desses produtos na agricultura.

Quanto ao impacto de herbicidas sobre a microbiota do solo, poucos são os estudos para condições brasileiras, tendo-se dado ênfase apenas na eficiência dos produtos sobre o controle das plantas daninhas (Souza et al., 1996; Pires et al., 2005).

Herbicidas, tais como o fomesafen e fluazifop-p-butil, que apresentam persistência média no solo de 120 e 50 dias, respectivamente (Rodrigues & Almeida, 2005), têm sido largamente utilizados para o controle de plantas daninhas nas culturas de soja e feijão, leguminosas de grande importância que têm ganhado espaço na balança comercial agrícola brasileira.

Apesar de sofrerem degradação microbiana, esses herbicidas, entre outros, podem alterar a qualidade do solo ao longo do tempo como resultado de sucessivas aplicações. Dessa maneira, o estudo de indicadores que consigam diagnosticar mais rapidamente alterações promovidas pela ação desses produtos no ambiente, pode constituir ferramenta para predição desses efeitos na sustentabilidade do sistema solo.

Indicadores microbiológicos, tais como a taxa de desprendimento de CO₂ e a biomassa microbiana, têm-se destacado devido à capacidade de responderem rapidamente a mudanças no solo e por estarem diretamente envolvidas na degradação da matéria orgânica e na transformação e disponibilidade dos nutrientes no solo (Angers et al., 1993). Integrando-se os indicadores respiração microbiana e biomassa microbiana do solo, podem-se estimar os quocientes microbiano e metabólico envolvidos, respectivamente, com a qualidade da matéria orgânica e equilíbrio da microbiota do solo, podendo indicar a magnitude do distúrbio causado pelas diversas práticas agrícolas.

Dessa forma, a avaliação de indicadores microbiológicos para medir as alterações provocadas no ambiente pela utilização de herbicidas, pode constituir numa ferramenta eficiente na predição dos efeitos negativos da aplicação desses compostos em diferentes sistemas de manejo do solo antes que estes tenham a qualidade alterada de maneira a dificultar o desenvolvimento das culturas agrícolas.

Nesse trabalho propõe-se avaliar, em condições de campo, o efeito da aplicação de herbicidas, indicados para o controle de plantas daninhas na cultura do feijoeiro, sobre a atividade microbiana do solo em sistema de plantio direto e convencional. Além disso, será verificado, a partir de amostras de solo coletadas sob os sistemas de plantio supracitados, o efeito de concentrações dos mesmos herbicidas sobre a taxa de desprendimento de CO₂ e biomassa microbiana. Para complementar os resultados, será avaliada, em condições de laboratório, a sensibilidade de estirpes de *Rhizobium tropici*, recomendadas para inoculação em sementes de feijão, a herbicidas utilizados nessa cultura.

Dessa forma, objetiva-se nesse trabalho avaliar o impacto da utilização de herbicidas sobre a microbiota do solo dando ênfase à cultura do feijoeiro e em dois sistemas de plantio: direto e convencional.

1.1 LITERATURA CITADA

ANGERS, D.A.; BISSONNETTE, N.; LÈGÈRE, A.; et al. Microbial and biochemical changes induced by rotation and tillage in a soil under barley production. **Can. J. Soil Sci.**, v.73, p.39-50, 1993.

PIRES, F.R.; SOUZA, C.M.; CECON, P.R.; et al. Rhizospheric activity of potentially phytoreme-diative species for tebuthiuron-contaminated soil. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, v.29, p.627-634, 2005.

PIRES, F.R.; SOUZA, C.N.; SILVA, A.A.; et al. Revisão bibliográfica: Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. **Planta Daninha**, v.21, p.335-341, 2003.

PROCÓPIO, S.O.; SANTOS, J.B.; SILVA, A.A. Potencial de espécies vegetais para a remediação do herbicida trifloxysulfuron-sodium. **Planta Daninha**, v.23, p.9-16, 2005.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. de. **Guia de herbicidas**. 5.ed. Londrina, PR: Grafmarke, 2005. 591p.

SANTOS, J.B.; PROCÓPIO, S.O.; SILVA, A.A.; et al. Fitorremediação do herbicida trifloxysulfuron-sodium. **Planta Daninha**, v.22, p.323-330, 2004.

SOUZA, A.P.; LOURES, E.G.; SILVA, J. et al. Efeito do oxyfluorfen, 2,4-d e glyphosate na atividade microbiana de solos com diferentes texturas e conteúdos de matéria orgânica. **Planta Daninha**, v.14, p.55-64, 1996.

STENBERG, B. Monitoring soil quality of arable land: Microbiological indicators. **Soil and Plant Sci.**, v.49, p.1-24, 1999.

TÓTOLA, M.R.; CHAER, G.M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. VENEGAS, V.H.A., SCHAEFER, C.E.G.R., BARROS, N.F., MELLO, J.W.V., COSTA, L.M. (Eds.). **Tópicos em Ciência do Solo**. v.II (2002) – Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002, p.195-276.

2. ATIVIDADE MICROBIANA DO SOLO, CULTIVADO COM FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris*) APÓS A APLICAÇÃO DE HERBICIDAS

RESUMO

Avaliaram-se neste trabalho os efeitos da aplicação dos herbicidas fluazifop-p-butil e fomesafen e da mistura comercial desses sobre a atividade microbiana de um solo cultivado com feijão nos sistemas de plantio direto (SPD) e convencional (SPC). Além da respiração microbiana, acompanhada por 63 dias após a aplicação (DAA) dos herbicidas, foram avaliados, aos 12 e 51 DAA, o carbono da biomassa microbiana (CBM), o quociente microbiano (qMIC), o quociente metabólico (qCO₂), a porcentagem de colonização de raízes do feijoeiro por fungos micorrízicos e, ao final do ciclo, o rendimento de grãos. Entre os sistemas de cultivo, a maior taxa respiratória da microbiota foi observada no SPD, sendo fluazifop-p-butil, nesse sistema, o que proporcionou menor desprendimento de CO₂ das amostras de solo. Aos 12 DAA, CBM e qMIC foram mais afetados negativamente pelo fomesafen e pela mistura comercial desses herbicidas. A micorrização do feijoeiro foi afetada pelos herbicidas somente aos 12 DAA no SPC, entretanto, em ambas as épocas, o maior valor foi

encontrado em SPD. Todos os herbicidas causaram decréscimo nos valores de CBM e qMIC aos 51 DAA. O qCO₂, relacionado à estabilidade do sistema solo, indicou maior equilíbrio do SPD sobre o SPC. Entre os herbicidas, o fomesafen proporcionou menor estabilidade ao sistema. Menor produtividade de grãos foi obtida nos tratamentos sem controle de plantas daninhas (sem herbicidas) e onde se aplicou apenas o fomesafen, podendo ser atribuída à alta infestação de gramíneas na área experimental.

Palavras-chave: fluazifop-p-butil, fomesafen, micorriza arbuscular, plantio direto, quociente microbiano, quociente metabólico.

MICROBIAL ACTIVITY OF A SOIL CULTIVATED WITH COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris*) AFTER THE APPLICATION OF HERBICIDES

ABSTRACT

The effects of the application of the herbicides fluazifop-p-butyl and fomesafen and the commercial mixture of these herbicides on the microbial activity of a soil cultivated with common bean under no-till (NTS) and conventional-till (CTS) systems were evaluated in this work. Microbial respiration was monitored for 63 days after application (DAA) of the herbicides, and the following evaluated at 12 and 51 DDA: microbial biomass carbon (MBC), microbial quotient (qMIC), metabolic quotient (qCO₂), percentage of bean root colonization by mycorrhizal fungi, and grain yield at the end of the cycle. A larger microbial respiration rate was observed under NTS, with fluazifop-p-butyl providing the lowest respiration. At 12 DAA, MBC and qMIC were most affected negatively by fomesafen and by the commercial mixture of the two herbicides. Mycorrhizal colonization was affected by the herbicides only

at 12 DAA under CTS; however, in both periods, the highest value was found under NTS. All the herbicides caused a decrease in the MBC and qMIC values at 51 DAA; the qCO₂, related with the soil system stability indicated a greater NTS balance over CTS. The herbicide fomesafen provided lower stability to the system. Lower grain yield was obtained in the treatments without weed control (without herbicides) and with only fomesafen application, what may be attributed to the high weed infestation in the experimental area.

Keywords: fluazifop-p-butyl; fomesafen; arbuscular mycorrhiza; no-till system; microbial quotient; metabolic quotient

2.1 INTRODUÇÃO

O aumento na contaminação do solo por herbicidas em áreas de agricultura intensa tem despertado o interesse de pesquisas para a avaliação de indicadores biológicos que atestem a qualidade desses solos. Conhecer e entender atributos da qualidade do solo permite manejá-los de forma satisfatória no presente, proporcionando condições para que o sistema seja sustentável no futuro, pois, pelo monitoramento das mudanças na qualidade do solo, pode-se determinar se um conjunto de práticas é sustentável.

A avaliação acurada e consistente da qualidade do solo pode ser estimada por indicadores como a biomassa microbiana (BM), que é responsável pelo controle de funções essenciais no solo, como decomposição e acúmulo de matéria orgânica, ou transformações envolvendo nutrientes minerais ou compostos xenobióticos. O quociente microbiano (qMIC) – o qual indica a qualidade da matéria orgânica, por refletir acréscimos desta ao solo – estima a eficiência de conversão de C orgânico para carbono da BM ou perdas de carbono no solo (Sparling, 1992); também o quociente metabólico (qCO₂), estabelecido pela relação entre o CO₂ acumulado e o total do CBM, estabelece que, com o aumento da eficiência da BM em utilizar os recursos em seu meio, menos C é

perdido como CO₂ pela respiração, podendo este ser incorporado aos tecidos microbianos (Anderson & Domsch, 1985). Dessa forma, menor qCO₂ significa maior estabilidade da biomassa microbiana, ou seja, maior estabilidade no sistema.

A BM, que possui, comparativamente, taxa de formação e decomposição rápida de um a dois anos (Jenkinson & Ladd, 1981), pode ser proposta como medida mais sensível de distúrbios no solo resultantes da aplicação de herbicidas, uma vez que seu aumento ou decréscimo afeta a quantidade total da matéria orgânica do solo.

No sistema plantio direto (SPD), tem-se observado maior retenção de compostos orgânicos no solo pelo aumento da agregação das partículas (Beare et al., 1995), as quais protegem fisicamente a matéria orgânica, por formarem barreira que isola os microrganismos do substrato, influenciando, também, na ciclagem da BM (Elliott & Coleman, 1988). Dessa forma, a utilização de herbicidas nesse sistema terá impacto diferente do observado no sistema convencional de plantio (SPC).

Dentre os herbicidas recomendados para a cultura do feijão, destaca-se o fomesafen, o qual é eficiente para o controle de diversas plantas daninhas dicotiledôneas. Entretanto, esse herbicida apresenta longa persistência no solo, com meia-vida de dois a seis meses (Rodrigues & Almeida, 2005). Normalmente o fomesafen é utilizado em mistura com o fluazifop-p-butil, tendo em vista o controle simultâneo de plantas daninhas dicotiledôneas e gramíneas (Silva et al., 2003).

Estudos demonstraram que herbicidas influenciam, de maneira negativa, a biomassa microbiana (Edwards, 1989; Wardle, 1994; Perschbacher et al., 1997; Kinney et al., 2005), porém, as pesquisas ainda são escassas para condições de clima e solos tropicais ou em sistema de plantio direto.

Foram avaliados neste trabalho os efeitos dos herbicidas fluazifop-p-butil e fomesafen aplicados isoladamente ou em mistura sobre a atividade microbiana de um solo submetido aos sistemas de plantio direto e convencional durante o cultivo do feijoeiro.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em campo experimental pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (DFT/UFV) no município de Coimbra-MG, em região de clima classificado como tropical de altitude, com precipitação média anual de 1.300 a 1.400 mm, concentrada, principalmente, nos meses de outubro a março, e temperatura média anual de 19 °C. As análises foram feitas no Laboratório de Herbicidas no Solo do DFT/UFV, utilizando-se amostras do solo, classificado como Argisolo Vermelho-Amarelo, coletadas na profundidade de 0-10 cm, em áreas sob cultivo de feijão, em sistemas de plantio direto (SPD) e convencional (SPC). Em ambas as áreas pratica-se, há seis anos, o cultivo rotacionado de milho com feijão. A caracterização química e textural do solo, em cada área, encontra-se no Quadro 1.

A operação de semeadura do feijão (cv. Ouro Vermelho) foi realizada em novembro de 2004, com linhas espaçadas de 50 cm, e plantadeira regulada para depositar 15 sementes por metro linear (300.000 sementes ha⁻¹). Na adubação de semeadura foram utilizados 200 kg ha⁻¹ de NPK, fórmula 8-28-16. Imediatamente após a semeadura foi realizada a primeira irrigação, aplicando-se uma lâmina de água de 30 mm, que foi repetida quando houvesse necessidade da irrigação. A adubação de cobertura foi feita 15 dias após a emergência do feijoeiro, na dose de 20 kg ha⁻¹ de N na forma de uréia.

Quadro 1 – Composição química e textural da camada de 0-10 cm de profundidade do solo argiloso proveniente dos sistemas de plantio direto (SPD) e convencional (SPC) utilizados no experimento. Viçosa – MG, 2005

SPC										
Fração mineral (%)										
Areia fina			Areia grossa		Silte		Argila		Textura	
15			19		11		55		Argilosa	
Análise Química										
pH	P	K+	H + Al	Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	CTC	V	m	MO
							total			
H ₂ O	mg dm ⁻³		cmol _c dm ⁻³					%		dag kg ⁻¹
5,2	13,8	7,1	4,62	0,1	1,4	0,4	6,6	30	5	2,90
SPD										
Fração mineral (%)										
Areia fina			Areia grossa		Silte		Argila		Textura	
10			16		19		55		Argilosa	
Análise Química										
pH	P	K+	H + Al	Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	CTC	V	m	MO
							total			
H ₂ O	mg dm ⁻³		cmol _c dm ⁻³					%		dag kg ⁻¹
5,3	14,1	14,2	4,29	0,1	2	0,8	7,45	42	3	3,82

*Análises realizadas nos Laboratórios de Análises Físicas e Químicas de Solo do Departamento de Solos da UFV.

O experimento foi arranjado em parcelas subsubdivididas e delineado em blocos casualizados, com quatro repetições. Nas parcelas foram alocados os sistemas de cultivo (SPC e SPD), enquanto nas subparcelas os tratamentos foram compostos pelos herbicidas fluazifop-p-butil ($187,5 \text{ g ha}^{-1}$ – Fusilad 125[®]) e fomesafen (250 g ha^{-1} – Flex 250[®]) e pela mistura comercial destes, denominada Robust[®], nas doses de 140 g ha^{-1} de fluazifop-p-butil + 175 g ha^{-1} de fomesafen, aplicados aos 30 dias após a semeadura do feijão, mais uma testemunha sem herbicida, e, nas subsubparcelas, as épocas de avaliação. Cada sub-parcela ocupou área de 20 m^2 ($4 \times 5 \text{ m}$), separadas entre si por ruas de $0,5 \text{ m}$, e os blocos, por ruas de 1 m . Para aplicação dos herbicidas, utilizou-se um pulverizador costal pressurizado com gás carbônico (CO_2), aplicando-se o equivalente a 200 L ha^{-1} de calda. Os dados climáticos referentes ao período de avaliação do experimento se encontram na Figura 1.

A respiração microbiana foi estimada a partir da quantidade de CO_2 evoluído de amostras de 100 g do solo, o qual foi capturado em frascos contendo 100 mL de NaOH ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$), em sistema contínuo de fluxo de ar (isento de CO_2 e umidade), aos 5, 12, 28, 51 e 63 dias após a aplicação (DAA) dos herbicidas. As amostras de solo, após serem passadas por peneira com malha de 2 mesh, secas ao ar e determinado o teor de água, foram pesadas e incubadas por sete dias em erlenmeyer com teor de água a 80% da capacidade de campo. Procedeu-se então à titulação indireta do hidróxido de sódio com HCl ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$), e o excesso de NaOH que não reagiu com o CO_2 evoluído foi quantificado (Anderson, 1982).

Aos 12 e 51 DAA, além da respiração microbiana, determinaram-se: carbono da biomassa microbiana (CBM) pelo método descrito por Vance et al. (1987), utilizando-se, em lugar do clorofórmio (fumigação), forno de microondas (irradiação) (Islam & Weil, 1998); quociente microbiano (qMIC), a partir da relação entre CBM e o C orgânico multiplicado por 100; quociente metabólico (q CO_2), por meio da relação entre o CO_2 acumulado ($\mu\text{g g}^{-1}$) e o C total da biomassa microbiana ($\mu\text{g g}^{-1}$); e porcentagem de raízes do feijoeiro colonizadas por fungos micorrízicos. Para esta última, as raízes do feijoeiro foram

clarificadas com KOH a 10%, coradas em lactoglicerol contendo Azul de Tripiano (Schenck, 1982) e dispostas sobre uma placa de Petri com o fundo quadriculado, onde cada segmento interceptando uma linha do quadrículo era somado como micorrizado ou não, respectivamente, pela presença ou ausência de estruturas fúngicas (Giovanetti & Mosse, 1980).

Aos 63 DAA, colheu-se o feijão, sendo determinado o rendimento de grãos. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e as médias dos tratamentos, para as características avaliadas, foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Também foram ajustadas curvas de regressão para a evolução do CO₂ acumulado durante o período de avaliação.

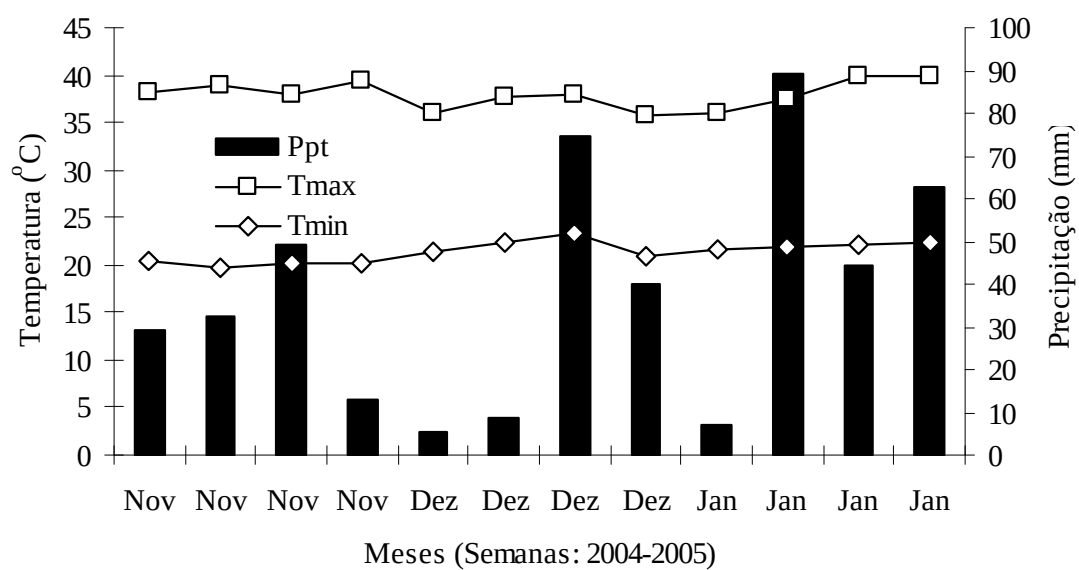


Figura 1 – Médias semanais de temperatura máxima (Tmax), temperatura mínima (Tmin.) e precipitação (Ppt), entre novembro de 2004 a janeiro de 2005. Coimbra - MG

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Independentemente do tratamento aplicado, a resposta em evolução de CO_2 foi linear ao longo do período amostrado (Figura 2). Entre os sistemas de cultivo, maior respiração microbiana foi observada no SPD, independentemente da aplicação dos herbicidas. Para o SPC, verificou-se maior uniformidade entre os herbicidas para a resposta da atividade microbiana. Todavia, no SPD houve maior discrepância entre os tratamentos, sendo o menor e o maior acúmulo de CO_2 observado para as amostras de solo tratadas, respectivamente, com fluazifop-p-butil e fomesafen. A maior respiração microbiana no solo proveniente do SPD, em relação ao SPC, confirma os trabalhos de Aon et al. (2001), Balota et al. (2003) e FEBRAPDP (2005), podendo ser atribuída ao não-revolvimento do solo e à manutenção de uma camada de palha na sua superfície, promovendo melhores condições para a atividade metabólica microbiana.

Quanto aos herbicidas, as respostas da sua aplicação sobre a respiração da microbiota são variáveis. Verificando o efeito de herbicidas sobre a comunidade microbiana aquática, Perschbacher et al. (1997) observaram que fomesafen e fluazifop-p-butil não interferiram na taxa de evolução de O_2 . Contudo, outros trabalhos constataram que diversos herbicidas, entre eles o glyphosate, a atrazine e o 2,4-D, afetaram a qualidade do solo pelo efeito indireto sobre a respiração (Edwards, 1989; Aon et al., 2001).

Entre os sistemas de cultivo, o SPC apresentou, aos 12 DAA, menor CBM nas amostras de solo sem herbicida e onde receberam a mistura comercial (Tabela 2). Aos 51 DAA, independentemente do tratamento herbicida, o CBM foi maior nas amostras de solo do SPD (Tabela 2).

Independentemente do sistema de plantio, a aplicação dos herbicidas reduziu o CBM nas duas épocas avaliadas. Aos 12 DAA, o fomesafen e a mistura comercial proporcionaram maiores reduções no CBM em amostras de solo do SPC. No SPD, o decréscimo na biomassa microbiana foi maior sob aplicação dos herbicidas isolados do que quando em mistura. Aos 51 DAA, maior redução no CBM foi proporcionada pela mistura comercial dos herbicidas (Tabela 2). Aon et

al. (2001) verificaram que a biomassa de fungos e bactérias de solo tratado com os herbicidas atrazine, glyphosate, 2,4-D, 2,4-DB, EPTC e flumetsulan era menos afetada e mais expressiva em sistema de plantio direto do que no convencional.

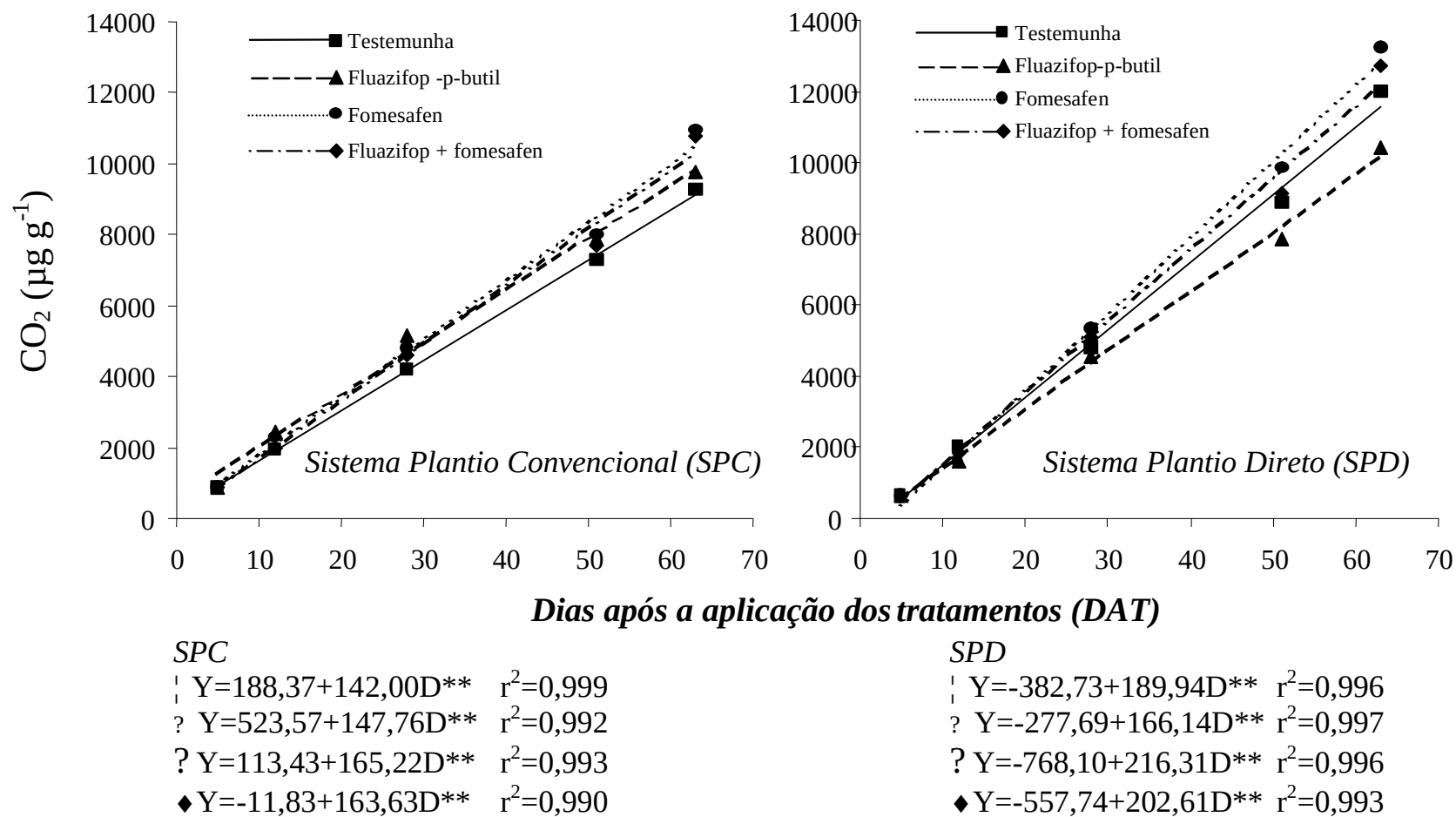


Figura 2 – Evolução de CO₂ acumulado ao longo de 63 dias em solo proveniente dos sistemas de plantio convencional (SPC) e direto (SPD), após terem recebido os herbicidas fluazifop-p-butil (187,5 g ha⁻¹), fomesafen (250 g ha⁻¹) e a da mistura pré-formulada [fluazifop-p-butil (140 g ha⁻¹) + fomesafen (175 g ha⁻¹)]. **Significativo a 1% pelo teste t.

Semelhantemente ao CBM, o qMIC foi reduzido em amostras de solo que receberam aplicação dos herbicidas. Entre eles, a mistura comercial, aos 51 DAA, proporcionou as maiores reduções (Tabela 2). Segundo Wardle (1994), quando a biomassa microbiana se encontra sob estresse, a capacidade de utilização do C é diminuída; nesse caso, a relação entre CBM e C orgânico decresce, regulando o qMIC. Da mesma forma, com a mudança para uma condição favorável, a BM pode aumentar rapidamente, mesmo se os valores do C orgânico permaneceram os mesmos.

A maior diminuição do CBM e qMIC, observada no solo que recebeu a mistura comercial dos herbicidas, pode ser resultado da ação direta conjunta dos herbicidas sobre a microbiota do solo, ou indiretamente, pelo melhor controle das plantas daninhas competidoras com o feijoeiro. A diminuição da atividade rizosférica como resultado do controle das espécies vegetais pelos herbicidas aplicados pode ser a principal causa da redução na biomassa microbiana. Da mesma forma, a diminuição mais expressiva do CBM no SPC pode ser explicada pela maior exposição do solo às intempéries climáticas.

A ação direta dos herbicidas sobre microrganismos pode ser atribuída ao mecanismo de ação. Fomesafen é inibidor da enzima protoporfirinogênio oxidase (protox), fazendo com que haja acúmulo de protoporfirina em células tratadas com este herbicida, ocasionando interação com o oxigênio para produção de formas reativas e, conseqüentemente, peroxidação dos lipídeos e morte celular (Warren & Hess, 1995). O fluazifop-p-butil é um potente inibidor da síntese de acetil coenzima A carboxilase (ACCase) (Hess, 1995), presente também no metabolismo microbiano. Também, Procópio et al. (2004) demonstraram ser o fomesafen um potente inibidor do crescimento de bactéria formadora de nódulo em soja.

Uma estimativa mais representativa dos efeitos de qualquer estresse sobre a microbiota do solo pode ser obtida por meio da avaliação do quociente metabólico (qCO_2), o qual relaciona o CO_2 acumulado e o total do CBM (Anderson & Domsch, 1985). Esse índice estabelece que, à medida que a

biomassa microbiana se torna mais eficiente em utilizar os recursos em seu meio, menos C é perdido como CO₂ pela respiração, podendo ele ser reincorporado aos tecidos microbianos. Dessa forma, menor qCO₂ significa maior estabilidade da BM e, conseqüentemente, da matéria orgânica no solo. Nas amostras de solo do SPC, aos 12 DAA, a maior estabilidade foi observada na ausência de herbicidas, sendo fomesafen o tratamento que conferiu menor estabilidade ao solo. No SPD, não se observou diferença no qCO₂ entre os tratamentos nesta época (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores para C da biomassa microbiana (CBM) ($\mu\text{g g}^{-1}$), quociente microbiano (qMIC) e quociente metabólico (qCO₂) em solo sob os sistemas de plantio convencional (SPC) e direto (SPD) cultivado com feijão que recebeu aplicação dos herbicidas fluazifop-p-butil (187,5 g ha⁻¹) e fomesafen (250 g ha⁻¹) e da mistura comercial Robust[®] [fluazifop-p-butil (140 g ha⁻¹) + fomesafen (175 g ha⁻¹)], avaliados aos 12 e 51 dias após a aplicação (DAA) dos tratamentos. Viçosa, MG, 2005

Tratamento	CBM		QMIC		qCO ₂	
	SPC	SPD	SPC	SPD	SPC	SPD
	-----12 DAA-----					
Testemunha	388,23 aB	572,37 aA	2,308 aB	2,583 aA	0,59 aB	0,41 aA
Fluazifop-p-butil	281,08 bA	222,09 cA	1,667 aA	1,002 bA	0,78 bA	0,61 aA
Fomesafen	166,56 cA	176,95 cA	0,991 bA	0,798 bA	1,14 cA	0,76 aA
Robust [®]	209,19 cB	307,81 bA	1,242 bA	1,389 bA	0,82 bA	0,56 aA
C.V. (%)	-----21,75-----		-----19,66-----		-----23,66-----	
	-----51 DAA-----					
Testemunha	388,42 aB	464,21 aA	2,309 aB	2,095 aA	0,53 aB	0,28 aA
Fluazifop-p-butil	61,76 cB	286,86 bA	0,367 bB	1,295 bA	1,76 bB	0,41 bA
Fomesafen	106,77 bB	242,62 bA	0,635 bB	1,095 bA	1,28 bB	0,72 bA
Robust [®]	44,71 cB	93,52 cA	0,266 bA	0,422 cA	3,20 cB	2,00 cA
C.V. (%)	-----23,15-----		-----18,21-----		-----28,06-----	

Médias de cada característica (CBM, qMIC e qCO₂) seguidas por letras iguais, minúsculas na coluna, para cada época de avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Letras iguais maiúsculas na linha, para cada característica, caracterizam médias iguais entre si pelo teste F a 5% de probabilidade de erro.

Aos 51 DAA, o qCO_2 foi menor no SPD para todos os tratamentos, indicando maior equilíbrio desse sistema em relação ao convencional de plantio (Tabela 2). Entre os tratamentos, semelhantemente ao ocorrido para SPC aos 12 DAA, a ausência dos herbicidas proporcionou menor qCO_2 , indicando que a BM se torna menos eficiente na presença destes, em ambos os sistemas. Nos dois sistemas de plantio, a aplicação da mistura de herbicidas proporcionou maior qCO_2 (Tabela 2). Solos com alto qCO_2 são dominados por organismos colonizadores de crescimento rápido, refletindo um ambiente mais instável ou mais longe de seu estado de equilíbrio (Sakamoto & Obo, 1994) ocasionado, neste caso, pelo próprio sistema de cultivo, quando comparados os valores de qCO_2 entre SPD e SPC, ou pela aplicação dos herbicidas testados, quando estes são comparados à testemunha.

A colonização das raízes do feijoeiro por fungos micorrízicos foi menor no SPC, independentemente da aplicação dos herbicidas, podendo isso ser atribuído ao maior revolvimento do solo nesse sistema de plantio. Com a aplicação dos herbicidas houve redução da micorrização do feijoeiro, aos 12 DAA, nas amostras de raízes coletadas no SPC. Enquanto na testemunha, a percentagem de colonização micorrízica das raízes do feijoeiro foi de 67,25%, nas parcelas que receberam o fomesafen ou a mistura de herbicidas esse valor diminuiu para 50,75% das raízes; para o fluazifop-p-butil, essa percentagem não ultrapassou 31,25% (Tabela 3). Outros trabalhos também mostraram prejuízos no processo de micorrização em culturas em função da aplicação de herbicidas no solo (Trappe et al., 1984; Paula Junior & Zambolim, 1993). Abd-Alla et al. (2000), estudando o efeito de vários pesticidas sobre micorrizas arbusculares e fixação de nitrogênio em leguminosas, constataram que o herbicida paraquat reduziu, significativamente, a colonização micorrízica.

Ao final do ciclo, observou-se menor rendimento de grãos nas testemunhas não capinadas e nas parcelas que receberam o fomesafen em SPC (Tabela 4). Considerando que a maioria das espécies de plantas daninhas presentes na área experimental eram gramíneas, nas parcelas tratadas com o

fomesafen isolado a maior competição com o feijoeiro já era esperada, haja vista que este herbicida não possui eficiência no controle dessas espécies.

Tabela 3 – Colonização de raízes do feijoeiro (%) avaliada aos 12 e 51 dias após a aplicação (DAA) dos herbicidas fluazifop-p-butil (187,5 g ha⁻¹), fomesafen (250 g ha⁻¹) e da mistura comercial Robust[®] [fluazifop-p-butil (140 g ha⁻¹) + fomesafen (175 g ha⁻¹)], nos sistemas de plantio convencional (SPC) e direto (SPD). Viçosa, MG, 2005

Tratamento	Raízes micorrizadas (%)			
	12 DAA		51 DAA	
	SPC	SPD	SPC	SPD
Testemunha	67,25 aB	71,75 aA	56,25 aB	72,00 aA
Fluazifop.	31,25 cB	69,50 aA	59,50 aB	68,25 aA
Fomesafen	51,00 bB	67,25 aA	50,25 aB	65,75 aA
Robust [®]	50,50 bB	62,50 aA	56,75 aA	62,75 aA
C.V. (%)	-----17,72-----		-----18,67-----	

Médias seguidas por letras iguais, minúsculas na coluna ou maiúsculas na linha, em cada época, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

De maneira geral, pode-se afirmar que a aplicação dos diferentes herbicidas promoveu impacto negativo sobre a microbiota do solo. Esse efeito negativo é diminuído pela adoção do SPD, o qual, por meio do não-revolvimento do solo e manutenção de palha na superfície, parece proporcionar maior equilíbrio ao sistema. Dos herbicidas testados, a mistura comercial fomesafen + fluazifop-p-butil promoveu menores valores para a biomassa microbiana do solo e maior desequilíbrio na microbiota do solo diminuindo a eficiência na reutilização do carbono, evidenciado pelo alto qCO₂.

Tabela 4 – Rendimento de grãos durante a colheita do feijoeiro tratado com diferentes herbicidas para o controle das plantas daninhas: fluazifop-p-butil (187,5 g ha⁻¹), fomesafen (250 g ha⁻¹) e mistura comercial Robust[®] [fluazifop-p-butil (140 g ha⁻¹) + fomesafen (175 g ha⁻¹)], nos sistemas de plantio convencional (SPC) e direto (SPD). Viçosa, MG, 2005

Sistema de plantio	Rendimento (kg ha ⁻¹)			
	Testemunha (sem capina)	Fluazifop-p-butil	Fomesafen	Robust [®]
<i>Convencional</i>	2058,33 Ba	2550,00 Aa	2216,67 Bb	2741,66 Aa
<i>Direto</i>	2224,33 Ba	2413,33 ABa	2466,67 ABa	2600,00 Aa
<i>C.V. (%)</i>	-----19,07-----			

Médias seguidas por letras iguais, minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade de erro; maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Dessa forma, indicadores da atividade microbiana, como CBM, qMIC, qCO₂ e porcentagem de fungos micorrízicos associados às raízes, podem oferecer suporte para a predição dos efeitos da aplicação dos herbicidas fomesafen e fluazifop-p-butil em diferentes manejos de solo. O acompanhamento da variação desses indicadores ao longo do tempo possibilita o planejamento e adoção de práticas para diminuição dos efeitos negativos da utilização desses produtos na agricultura.

2.4 CONCLUSÕES

- Os indicadores microbiológicos respiração basal do solo, biomassa microbiana e taxa de colonização micorrízica foram sensíveis à presença dos herbicidas testados e ao sistema de plantio adotado.

- Os efeitos negativos da aplicação dos herbicidas testados sobre a microbiota do solo foram menores em sistema de plantio direto, comparado ao sistema convencional de plantio.
- A colonização micorrízica no feijoeiro não foi afetada pelos tratamentos herbicida em sistema de plantio direto.
- O rendimento do feijoeiro foi menor em sistema de plantio convencional nas parcelas não capinadas e onde receberam somente o fomesafen para o controle das plantas daninhas, devido à predominância de gramíneas.
- A mistura comercial dos herbicidas promoveu os menores valores para a biomassa microbiana e o mais elevado quociente metabólico.

2.5 LITERATURA CITADA

- ABD-ALLA, M.H.; OMAR, S.A.; KARANXHA, S. The impact of pesticides on arbuscular mycorrhizal and nitrogen-fixing symbioses in legumes. **Appl. Soil Ecol.**, v.14, p.191-200, 2000.
- ANDERSON, J.P.E. Soil Respiration. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. ed. Methods of Soil Analysis – part 2 – Chemical and microbiological properties. Madison, **A. Soc. Agron.**, 1982, v.2, p.831-871.
- ANDERSON, T.H.; DOMSCH, K.H. Determination of ecophysiological maintenance carbon requirements of soil microorganisms in a dormant state. **Biol. Fertil. Soils**, v.1, p.81-89, 1985.
- AON, M.A.; et al. (Micro)biological, chemical and physical properties of soils subjected to conventional or no-till management: na assessment of their quality status. **Soil Til. Res.**, v.60, p.173-186, 2001.
- BALOTA, E.L.; et al. Microbial biomass in soils under different tillage and crop rotation systems. **Biol. Fertil. Soil**, v.38, p.15-20, 2003.
- BEARE, M.H.; et al. A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. **Plant Soil**, v.170, p.5-22, 1995.
- EDWARDS, C.A. Impact of herbicides on soil ecosystems. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v.8, p.221-257, 1989.

- ELLIOTT, E.T.; COLEMAN, D.C. Let the soil work for us. **Ecol. Bulletin**, v.39, p.23-32, 1988.
- FEBRAPDP – Federação Brasileira de Plantio Direto na Palha. (2005) http://www.febrapdp.org.br/area_PD_Brasil (12 mar. 2005).
- HESS, F.D. Mode of action of lipid biosynthesis inhibitors (Graminicides – Accase Inhibitors). In: **Herbicide action course**. Purdue University: Indiana, 1995, 787p.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytol.** v.84, p.489-500, 1980.
- ISLAM, K.R.; WEIL, R.R. Microwave irradiation of soil for routine measurement of microbial biomass carbon. **Biol. Fertil. Soils**, v.27, p.408-416, 1998.
- JENKINSON, D.S.; LADD, J.M. **Microbial biomass in soil: measurement and turnover**. In: PAUL, E.A. & LADD, J.N., eds. Soil biochemistry. New York, Marcel Dekker, 1981, v.5, p.415-471.
- KINNEY, C.A.; MANDERNACK, K.W.; MOSIER, A.R. Laboratory investigations into the effects of the pesticides mancozeb, chlorothalonil, and prosulfuron on nitrous oxide and nitric oxide production in fertilized soil. **Soil Biol. Biochem.**, v.37, p.837-850, 2005.
- PAULA JUNIOR, T.J.; ZAMBOLIM, L. Efeito de fungicidas e de herbicidas sobre a micorrização de *Eucalyptus grandis* por *Glomus etunicatum*. **Fitopatol. Bras.**, v.19, n.2, p.173-177, 1994.
- PERSCHBACHER, P.W.; et al. Evaluation of effects of common aerially-applied soybean herbicides and propanil on the plankton communities of aquaculture ponds. **Aquaculture**, v.157, p.117-122, 1997.
- 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.
- RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. de. **Guia de herbicidas**. 5.ed. Londrina, PR: Grafmarke, 2005. 591p.

- SAKAMOTO, K.; OBO, Y. Effects of fungal to bacterial ratio on the relationship between CO₂ evolution and total soil microbial biomass. **Biol. Fertil. Soils**, v,17, p.39-44, 1994
- SCHENCK, N.C. **Methods and Principles of Mycorrhizal Research**. The Amer. Phytopat. Soc. Publ., St. Paul, MN, USA. 224p., 1982.
- SILVA, A.A.; et al. **Controle de plantas daninhas**. Brasília: ABEAS, módulo 3, 2003. 260p.
- SPARLING, G.P. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indication of changes in soil organic matter. **Aust. J. Soil. Res.**, v.30, p.195-207, 1992.
- TRAPPE, J.M.; MOLINA, R.; CASTELLANO, M. Reactions of mycorrhizal fungi and mycorrhiza formation to pesticides. **Ann. Rev. Phytopathol.** v.22, p.331-359, 1984.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biol. Biochem.**, v.19, p.703-707, 1987.
- WARDLE, D.A. Impact of disturbances on detritus food-webs in agro-ecosystems of contrasting tillage and weed management practices. **Adv. Ecol. Res.**, v.26, p.10-17, 1994.
- WARREN, G.F.; HESS, F.D. Mode of action of inhibitors of protoporphyrinogen oxidase (Diphenylethers and oxadiazon). In: **Herbicide action course**. Purdue University: Indiana, 1995, 787p.

3. ATIVIDADE MICROBIANA DO SOLO APÓS APLICAÇÃO DE HERBICIDAS EM SISTEMAS DE PLANTIO DIRETO E CONVENCIONAL

RESUMO

Avaliou-se neste trabalho os efeitos de cinco concentrações (0,0; 1,05; 2,10; 4,20 e 8,40 $\mu\text{g g}^{-1}$) dos herbicidas fluazifop-p-butil, fomesafen e da mistura pré-formulada sobre a atividade microbiana de um solo submetido aos sistemas de plantio direto (SPD) e convencional (SPC). Amostras do solo coletadas em SPD e SPC foram colocadas em Erlenmeyer de 250 mL, tratadas com as diferentes concentrações dos herbicidas e umedecidas próximo à capacidade de campo. A cada intervalo de quatro dias, fez-se a quantificação da respiração microbiana por meio da captura do CO_2 liberado do solo. Aos 20 dias após o início da incubação, determinou-se o carbono da biomassa microbiana (CBM) e o quociente metabólico (qCO_2). No solo proveniente do SPD, a atividade metabólica microbiana avaliada por meio da respiração aumentou com as concentrações do fluazifop-p-butil e reduziu para concentrações superiores a 4,20 $\mu\text{g g}^{-1}$ de fomesafen. Os efeitos dos herbicidas sobre a respiração microbiana e

CBM do solo em SPC foram inferiores aos observados no solo do SPD. Entre os herbicidas, com o aumento das concentrações, verificou-se maior CBM para fluazifop-p-butil e menores valores de CBM para o fomesafen. A mistura pré-formulada não influenciou o CBM no SPD, mas causou maior redução do mesmo no solo sob SPC quando aplicada nas maiores concentrações. No SPD, o qCO_2 aumentou com as concentrações dos herbicidas sem, contudo, variar entre eles. No SPC a mistura dos herbicidas proporcionou o maior qCO_2 . Em geral os herbicidas promoveram efeito negativo sobre a biomassa microbiana. Este efeito foi proporcional às concentrações aplicadas, sendo menor em solo cultivado no SPD, em comparação ao solo cultivado no SPC.

Palavras-chave: Biomassa microbiana, fluazifop-p-butil, fomesafen, quociente metabólico.

SOIL MICROBIAL ACTIVITY AFTER HERBICIDE APPLICATION UNDER NO-TILLAGE AND CONVENTIONAL PLANTING SYSTEM

ABSTRACT

This study evaluated the effect of the herbicides fluazifop-p-butyl and fomesafen in five concentrations (0.0; 1.05; 2.10; 4.20 and 8.40 $\mu g\ g^{-1}$) and of a commercial mixture of both compounds on microbial activity in soil submitted to no-tillage system (NTS) and conventional planting system (CPS). Samples put in Erlenmeyer of 250mL were treated with herbicide and wetted to field capacity. Every four days, the microbial respiration was quantified by measuring CO_2 evolved from the soil. Metabolic quotient (qCO_2) and microbial biomass carbon (CMB) were determined 20 days after incubation. Under NTS, microbial activity increased with fluazifop-p-butyl application and reduced with fomesafen concentrations higher than 4.20 $\mu g\ g^{-1}$. The herbicide effect on soil microbial

respiration and CMB under CPS were inferior to those observed under NTS. When the concentration of fluazifop-p-butyl increased and the concentrations of fomesafen decreased, there was an increase in CMB. The mixture did not influenced CMB under NTS, but it was reduced under CPS in higher concentrations. Under NTS the qCO_2 increased with the herbicide concentrations, without, however, to vary between them. Under CPS herbicide mixture provide a higher qCO_2 . The herbicide provided a negative effect on microbial biomass and this effect was proportional to applied concentrations, being smaller in soil under NTS compared to under CPS.

Key words: microbial biomass, fluazifop-butyl, fomesafen, metabolic quotient.

3.1 INTRODUÇÃO

A biomassa microbiana (BM) é responsável pelo controle de funções essenciais no solo, como decomposição e acúmulo de matéria orgânica, ou transformações envolvendo nutrientes minerais ou compostos no solo. Em razão disso, alto conteúdo de BM pode proporcionar ao solo maior estocagem de nutrientes, possibilitando também melhor ciclagem desses ao longo do tempo (Stenberg, 1999). Ademais, o fato de muitos microrganismos utilizarem a fração disponível da matéria orgânica, os torna sensíveis na mudança em sua qualidade. A BM a qual possui, comparativamente, taxa de formação e decomposição rápida de um a dois anos (Jenkinson & Ladd, 1981), tem sido proposta como medida mais sensível de aumento ou decréscimo na quantidade total da matéria orgânica do solo (Carter, 1992; Sparling, 1992; Balota et al., 2003). Segundo Sparling (1992) mudanças graduais e pequenas na matéria orgânica do solo são difíceis de serem monitoradas e detectadas no curto prazo. Todavia, devido à maior sensibilidade da microbiota do solo aos distúrbios provocados no solo, mudanças significativas na BM podem ser detectadas muito antes que alterações na matéria

orgânica possam ser percebidas, possibilitando a adoção de medidas de correção antes que a perda da qualidade do solo seja mais severa.

No sistema plantio direto (SPD), tem-se observado aumento dos teores de matéria orgânica no solo (Balota et al, 2003; FEBRAPDP, 2005). A maior retenção de compostos orgânicos no solo sob SPD, tem sido associada ao aumento da agregação das partículas do solo (Beare et al., 1995), as quais protegem fisicamente a matéria orgânica por formarem barreira que isola os microrganismos do substrato, influenciando, também, na ciclagem da BM, pois diminuem as variações de temperatura e umidade no solo ao longo do dia (Elliott & Coleman, 1988).

Por meio da BM é possível avaliar as mudanças iniciais no conteúdo de matéria orgânica no solo, pois esta constitui o estágio inicial do carbono dos resíduos em decomposição no solo, definida como a parte viva da matéria orgânica do solo, excetuando raízes e grandes animais; sensível a mudanças quando se utilizam práticas agrícolas diversas como fertilizações ou aplicação de pesticidas, dentre eles, herbicidas (Wardle & Parkinson, 1991; Kinney et al., 2005).

Entre os herbicidas recomendados para as culturas da soja e feijão, destaca-se o fomesafen indicado para o controle de diversas plantas daninhas dicotiledôneas. Entretanto, esse herbicida apresenta longa persistência no solo, com meia vida de dois a seis meses (Rodrigues & Almeida, 2005). Normalmente o fomesafen é utilizado em mistura com o fluazifop-p-butyl tendo em vista o controle simultâneo de plantas daninhas dicotiledôneas e gramíneas (Silva et al., 2003).

Apesar dos estudos demonstrando que herbicidas afetam de maneira negativa a biomassa microbiana (Edwards, 1989; Wardle, 1994; Perschbacher et al., 1997; Kinney et al., 2005), poucas informações existem a respeito desse assunto em condições de clima e solos tropicais ou em sistema de plantio direto.

Neste trabalho foram avaliados os efeitos de concentrações dos herbicidas fluazifop-p-butyl, fomesafen e da mistura comercial destes (denominada Robust[®]), sobre a atividade microbiana do solo cultivado em SPD e SPC.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Herbicidas no Solo da Universidade Federal de Viçosa, utilizando-se amostras de solo coletadas na profundidade de 0 – 10 cm em áreas de cultivo rotacionado de milho com feijão, nos sistemas de plantio direto (SPD) e no sistema de plantio convencional (SPC). A caracterização química e textural do solo encontra-se na Tabela 1 (Capítulo 2).

Os tratamentos, em esquema fatorial 3 x 5 x 5, foram compostos por três herbicidas, cinco concentrações e cinco épocas de avaliação para cada um dos sistemas de cultivo, com três repetições. Os herbicidas fluazifop-p-butil (Fusilad 125[®]), fomesafen (Flex[®]) e a mistura pré-formulada de fluazifop-p-butil – 200 g L⁻¹ + fomesafen – 250 g L⁻¹ (Robust[®]), foram aplicados nas concentrações de 0,00; 1,05; 2,10; 4,20 e 8,40 µg g⁻¹ aproximadamente equivalentes às doses de 0, 125, 250, 500 e 1000 g ha⁻¹ do ingrediente ativo baseando-se na área e massa de solo sob aplicação. As cinco épocas de avaliação foram aos 4, 8, 12, 16 e 20 dias após início da incubação. A concentração adotada na mistura comercial dos herbicidas baseou-se na mesma para o fomesafen quando isolado.

As amostras de solo, após serem coletadas nos respectivos locais e secas ao ar, foram peneiradas em malha de 2 mesh, e tiveram o teor de água determinado. Sub-amostras de 80 g foram pesadas e colocadas em frascos Erlenmeyer, onde receberam os herbicidas por meio de pulverização utilizando-se uma micro-seringa. A umidade das amostras incubadas foi mantida em 80% da capacidade de campo. A temperatura ambiente foi monitorada ao longo do experimento, variando entre 23 e 25 °C. Em cada época de avaliação estimou-se a respiração microbiana do solo, por meio da quantidade de CO₂ evoluído, o qual foi capturado em frascos contendo 100 mL de NaOH (0,25 mol L⁻¹), em sistema contínuo de fluxo de ar (isento de CO₂ e umidade por meio da pré filtração, e passagem do ar em colunas contendo micropérolas de NaOH). Procedeu-se então

à titulação indireta do hidróxido de sódio com HCl ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$), onde o excesso de NaOH que não reagiu com o CO_2 evoluído foi quantificado.

Após a ultima avaliação, aos 20 dias de incubação, determinou-se o carbono da biomassa microbiana (CBM) pelo método descrito por Vance et al. (1987), utilizando-se, em lugar do clorofórmio (fumigação), forno de microondas (irradiação) (Islam & Weil, 1998).

O cálculo do qCO_2 foi feito por meio da relação entre o CO_2 acumulado ao longo de 20 dias ($\mu\text{g g}^{-1}$) pelo C total da biomassa microbiana ($\mu\text{g g}^{-1}$). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e as médias dos tratamentos para CBM e qCO_2 foram comparadas pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade. Também foram ajustadas curvas de regressão para a evolução do CO_2 acumulado durante o período de incubação, para cada herbicida.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Independentemente do sistema de cultivo ou dos herbicidas avaliados, a resposta em evolução de CO_2 comportou-se linearmente em todas as concentrações testadas (Figuras 1 e 2 e Tabela 2).

No SPD, os maiores acúmulos de CO_2 foram observados quando as amostras de solo foram tratadas com $8,40 \mu\text{g g}^{-1}$ de fluazifop-p-butil e $2,10 \mu\text{g g}^{-1}$ de fomesafen. Na mistura comercial, a respiração foi intermediária à observada para cada herbicida isolado (Figura 1). Os resultados indicaram que para o fluazifop-p-butil a atividade microbiana do solo aumentou com a concentração, enquanto que para o fomesafen, esta atividade começou a ser inibida a partir da concentração de $2,10 \mu\text{g g}^{-1}$ desse herbicida (Figura 1).

Para o SPC, verificou-se menor estímulo dos herbicidas sobre a atividade microbiana pelo maior desprendimento de CO_2 com o aumento da concentração dos produtos aplicada ao solo (Figura 2). No entanto, independentemente do tratamento herbicida, o total de CO_2 acumulado nesse tipo de solo foi

nitidamente inferior ao observado no solo proveniente do SPD, uma vez que, na ausência de herbicidas, o total evoluído de CO₂, ao longo dos 20 dias, subiu de 350 para 800 µg g⁻¹ de CO₂ do SPC para o SPD. Este fato evidenciou atividade metabólica microbiana superior no solo cultivado no SPD, o que pode ser atribuída à maior quantidade de microrganismos, promovida pelo não revolvimento do solo e manutenção de uma camada de palha na superfície do mesmo. Diversos trabalhos já confirmaram a maior atividade microbiana no SPD comparado ao SPC (Amato & Ladd, 1992; Carter, 1992; Balota et al., 2003; Fontes et al., 2004; FEBRAPDP, 2005).

Em trabalho realizado para verificar o efeito de herbicidas sobre a comunidade microbiana aquática, Perschbacher et al. (1997), verificaram que fomesafen e fluazifop-p-butil não interferiram na taxa de evolução de O₂. Todavia, em outros trabalhos, verificou-se que vários herbicidas, dentre eles o glyphosate, afetaram a qualidade do solo pelo efeito indireto sobre a respiração (Souza et al., 1999; Tuffi Santos et al., 2005), biomassa da microbiota e na ciclagem de nutrientes (Edwards, 1989).

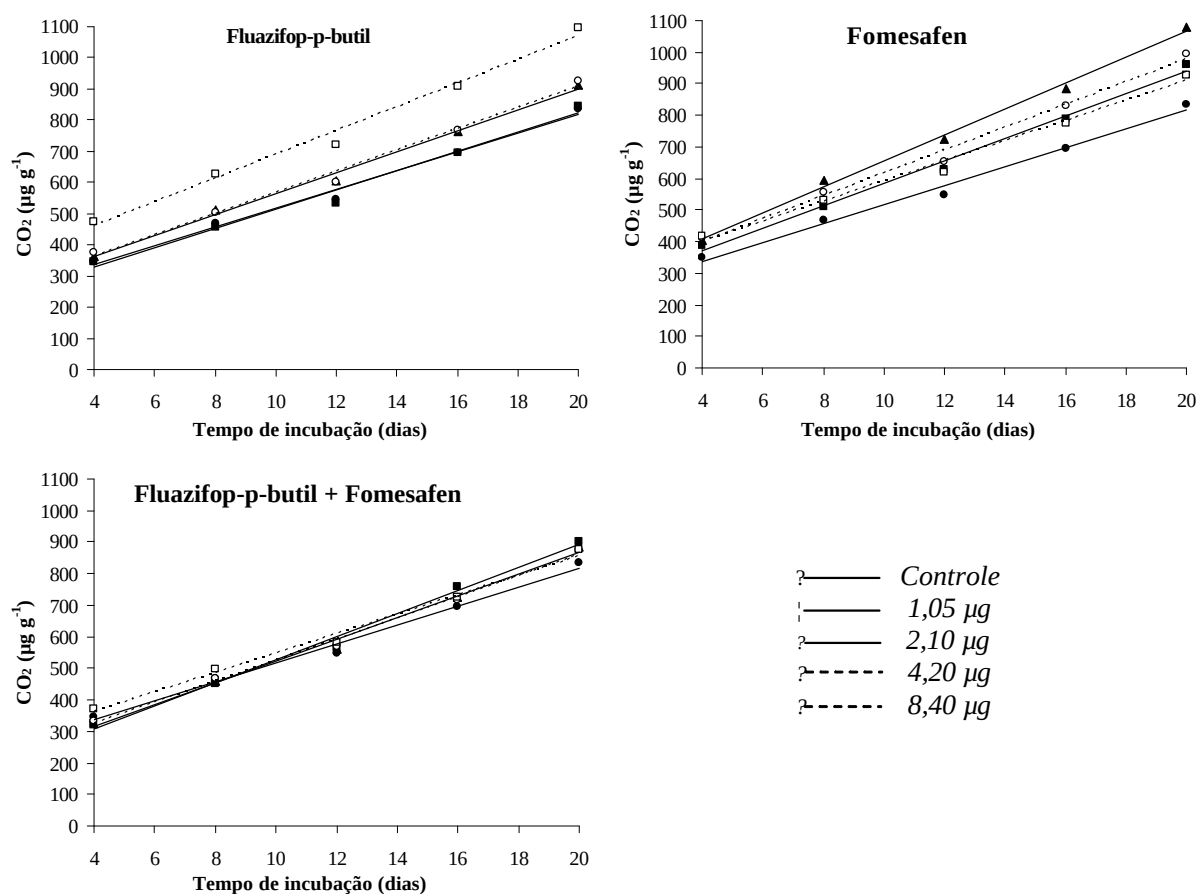


Figura 1 – Evolução de CO₂ acumulado ao longo de 20 dias em solo proveniente de sistema de plantio direto que recebeu diferentes concentrações (µg g⁻¹*) dos herbicidas fluazifop-p-butil, fomesafen e da mistura pré-formulada de fluazifop-p-butil + fomesafen. *Na mistura pré-formulada a concentração foi padronizada para o fomesafen.

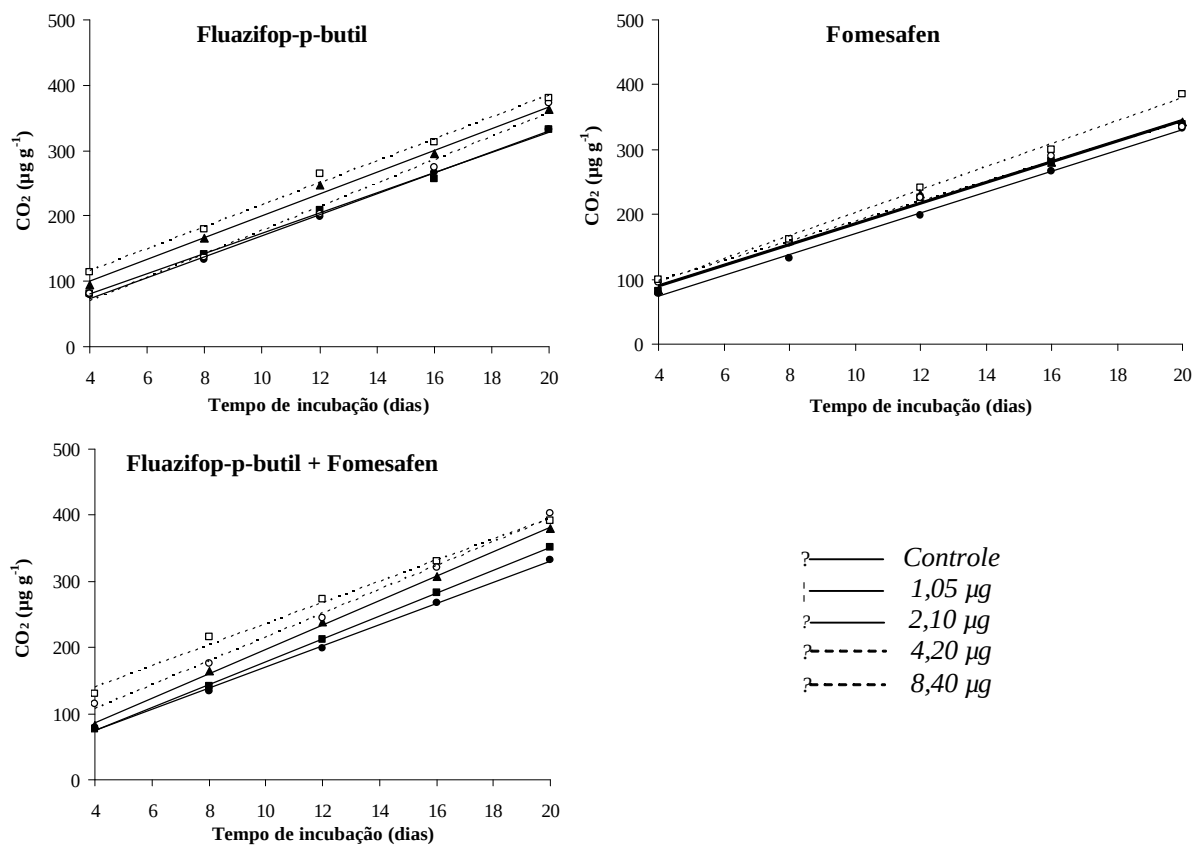


Figura 2 – Evolução de CO₂ acumulado ao longo de 20 dias em solo proveniente de sistema de plantio convencional que recebeu diferentes concentrações (µg g⁻¹*) dos herbicidas fluazifop-p-butil, fomesafen e da mistura pré-formulada de fluazifop-p-butil + fomesafen. *Na mistura pré-formulada a concentração foi padronizada para o fomesafen.

...continuação

Tabela 2 – Equações de regressão correlacionando o tempo de incubação, em dias (D**) do solo submetido aos sistema de plantio direto e convencional, e a evolução de CO₂ (µg g⁻¹) sob efeito dos herbicidas fluazifop-p-butil, fomesafen e a mistura pré-formulada, aplicados em diferentes concentrações (µg g⁻¹). Viçosa, MG, 2005

Concentração (µg g ⁻¹)	Sistema plantio direto		Sistema plantio convencional	
	Equação ajustada	R ²	Equação ajustada	R ²
-----Fluazifop-p-butil-----				
0,00	$Y = 30,0924D + 216,964$	0,93	$Y = 16,0272D + 9,740$	0,95
1,05	$Y = 33,7448D + 225,844$	0,85	$Y = 15,388D + 19,633$	0,99
2,10	$Y = 30,9805D + 203,214$	0,79	$Y = 16,6581D + 33,229$	0,98
4,20	$Y = 34,1172D + 224,698$	0,82	$Y = 17,9322D + 1,432$	0,96
8,40	$Y = 38,1634D + 307,055$	0,98	$Y = 16,7010D + 49,557$	0,97
-----Fomesafen-----				
0,00	$Y = 30,0924D + 216,964$	0,93	$Y = 16,0272D + 9,740$	0,95
1,05	$Y = 35,6927D + 226,417$	0,98	$Y = 15,9339D + 25,638$	0,94
2,10	$Y = 41,0423D + 246,039$	0,96	$Y = 15,9061D + 28,216$	0,95
4,20	$Y = 36,0078D + 256,208$	0,98	$Y = 15,3612D + 35,931$	0,94
8,40	$Y = 31,8112D + 273,109$	0,97	$Y = 17,7389D + 24,206$	0,98
-----Fluazifop-p-butil + Fomesafen* (Robust®)-----				
0,00	$Y = 30,0924D + 216,964$	0,93	$Y = 16,0272D + 9,740$	0,95
1,05	$Y = 36,5020D + 162,393$	0,91	$Y = 17,2522D + 5,586$	0,98
2,10	$Y = 34,4824D + 176,416$	0,93	$Y = 18,5120D + 12,174$	0,98
4,20	$Y = 33,4512D + 191,898$	0,97	$Y = 18,0253D + 35,091$	0,98
8,40	$Y = 30,9017D + 239,164$	0,89	$Y = 15,9844D + 76,198$	0,94

*Na mistura comercial a concentração foi padronizada para o fomesafen.

** Significativo pelo teste t a 1% de probabilidade de erro.

O C microbiano ou C da biomassa microbiana (CBM) estimado ao final do período de incubação do solo nos diferentes tratamentos, variou entre os herbicidas e entre as concentrações testadas (Tabelas 3 e Figura 3).

Nas concentrações de 2,10 e 4,20 $\mu\text{g g}^{-1}$ de herbicida aplicado no solo sob SPD, menor CBM foi observado na presença do fluazifop-p-butil, comparado ao fomesafen. Entretanto, na maior concentração testada (8,40 $\mu\text{g g}^{-1}$), verificou-se efeito contrário, isto é, maior redução do CBM na presença do fomesafen (Tabela 3). A mistura comercial dos herbicidas, nas mesmas concentrações, provocou comportamento intermediário no valor de CBM, comparado a cada herbicida isolado (Tabela 3).

Esses resultados sugerem que o fomesafen, comparado ao fluazifop-p-butil, apresentou-se mais tóxico aos microrganismos do solo quando acumulado. Outros trabalhos demonstraram que a presença do fomesafen em meio de cultura inibiu o crescimento de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (Procópio et al., 2004; Santos, 2004). Uma possível causa da agressividade do fomesafen aos microrganismos pode ser atribuída ao seu mecanismo de ação, o qual leva à inibição da enzima protoporfirinogênio oxidase (protox), fazendo com que haja acúmulo de protoporfirina em células tratadas com este herbicida, ocasionando interação com o oxigênio para produção de formas reativas e, conseqüentemente, peroxidação dos lipídeos e morte celular (Warren & Hess, 1995).

No SPC, os valores de CBM, similar ao ocorrido para a respiração, foram menores do que os observados para o solo proveniente do SPD (Tabela 3). Entre os herbicidas, a mistura comercial (Robust[®]) provocou as maiores reduções nos valores de CBM, principalmente na maior concentração testada. Neste tratamento verificou-se que o total de C proveniente da biomassa microbiana representou somente 26% do valor observado na ausência de herbicida (Tabela 3). Este resultado pode estar relacionado à maior instabilidade do solo no SPC, permitindo maior contato do herbicida com a comunidade microbiana presente, a qual é menos equilibrada quando comparada à encontrada no solo proveniente do SPD. O distúrbio causado pelo revolvimento do solo impede a formação de

microsítios propícios à atividade microbiana. Além disso, nesse sistema de cultivo, as camadas sub-superficiais do solo são constantemente revolvidas, expondo a microbiota às intempéries climáticas. Especificamente no caso da mistura comercial dos herbicidas, o efeito tóxico sobre a microbiota pode ter ocorrido pela ação conjunta dos herbicidas, isto é, dois mecanismos diferentes atuando ao mesmo tempo. O fluazifop-p-butil, apesar de ter sido menos tóxico à microbiota no SPD e no SPC quando aplicado isolado, é um potente inibidor da síntese de acetil coenzima A carboxilase (ACCase) (Hess, 1995), presente também no metabolismo microbiano.

Entre os herbicidas, nas diferentes concentrações, verificou-se que, em SPD, a mistura comercial não promoveu variação no CBM. Contudo, considerando cada herbicida isolado, o fluazifop-p-butil provocou diminuição na biomassa microbiana até a concentração de $3,57 \mu\text{g g}^{-1}$ e aumento de CBM a partir desse valor, enquanto que para fomesafen o comportamento foi contrário, com diminuição no CBM nas maiores concentrações (Figura 3). A retomada no aumento de CBM nas maiores concentrações do fluazifop-p-butil pode ser explicada pela presença de microrganismos saprofíticos de crescimento rápido os quais se beneficiam da matéria orgânica advinda da morte da comunidade anteriormente presente. O mesmo não foi observado para o fomesafen, talvez por sua maior agressividade aos microrganismos já comentada, associado ao maior efeito residual desse produto em relação ao fluazifop-p-butil.

Em solo proveniente do SPD, os valores de CBM diminuíram mais expressivamente para a mistura dos herbicidas. Apesar da biomassa microbiana apresentar pouca variação entre as concentrações de fluazifop-p-butil, concluiu-se que este herbicida tem efeito inibitório sobre a biomassa microbiana, pois a menor concentração adicionada ao solo ($1,05 \mu\text{g g}^{-1}$) foi suficiente para causar decréscimo de 11% no CBM. Ao contrário, o fomesafen apresentou-se menos tóxico nas menores concentrações, todavia, promoveu redução do CBM a valores abaixo dos observados para fluazifop-p-butil em maiores concentrações no solo (Figura 3).

A relação entre o CO_2 acumulado e o total do CBM proporciona o denominado quociente metabólico (qCO_2) proposto por Anderson & Domsch (1985) e prediz que, à medida que a biomassa microbiana se torna mais eficiente em utilizar os recursos em seu meio, menos C é perdido como CO_2 pela respiração podendo o mesmo ser incorporado aos tecidos microbianos. Para Sakamoto & Obo (1994) solos com alto qCO_2 são dominados por organismos colonizadores de crescimento rápido apresentando menor redundância funcional, refletindo um ambiente mais instável ou mais longe de seu estado de equilíbrio. Dessa forma, menor qCO_2 significa maior estabilidade da biomassa microbiana. No solo provindo do SPD não se observaram diferenças no qCO_2 entre os herbicidas (Tabela 3). No entanto, com o aumento das concentrações, verificou-se aumento do qCO_2 indicando que a biomassa microbiana se torna menos eficiente na presença dos herbicidas, sendo esta eficiência tão menor quanto maior a concentração dos herbicidas (Figura 4).

A mesma avaliação realizada para o solo sob SPC, revelou diferenças de qCO_2 entre os herbicidas. Enquanto para os herbicidas isolados, na maior concentração testada, o valor médio para qCO_2 foi de 2,58, a mistura comercial desses produtos, na mesma concentração, elevou esse valor para 7,28 (Tabela 3). Com o aumento das concentrações de cada herbicida, o qCO_2 sob influência de fluazifop-p-butil, aumentou linearmente. Efeito semelhante foi observado quando o SPC foi tratado com o fomesafen. Este efeito foi ainda mais expressivo na presença da mistura comercial de fluazifop-p-butil + fomesafen (Robust[®]) (Figura 4). Isto pode indicar que os herbicidas testados, por apresentarem diferente mecanismo de ação, quando aplicados isoladamente, estariam afetando uma parcela da comunidade microbiana sensível a cada produto. Contudo, a aplicação da mistura de ambos potencializa o efeito inibitório sobre a atividade microbiana, promovendo maior instabilidade nos processos microbiológicos e bioquímicos do solo, representados pelo qCO_2 .

Na ausência de herbicidas, a avaliação do qCO_2 indica a estabilidade entre os sistemas de cultivo. Considerando que o valor de qCO_2 observado em solo do SPC foi 13% superior ao observado no SPD, fica evidenciado a maior

estabilidade deste sistema de cultivo sobre o SPC. Da mesma forma, a aplicação dos diferentes herbicidas, nas concentrações testadas, promoveu aumento no qCO_2 quando no SPC, ou seja, o impacto negativo da aplicação desses herbicidas sobre a microbiota do solo é diminuído no SPD.

Tabela 3 – Carbono da biomassa microbiana (CBM) ($\mu g\ g^{-1}$) em solo cultivado sob sistema de plantio direto (SPD) e convencional (SPC) tratado com os herbicidas fluazifop-p-butil, fomesafen e a mistura pré-formulada, com incubação ao longo de 20 dias. Viçosa, MG, 2005

Concentração (µg g ⁻¹)	CBM (µg g ⁻¹) – SPD		
	Fluazifop-p-butil	Fomesafen	Fluazifop-p-butil + Fomesafen
0,00	580,77 a	585,19 a	581,93 a
1,05	521,05 a	601,58 a	544,74 a
2,10	445,26 b	630,00 a	540,34 ab
4,20	492,63 b	634,74 a	540,00 ab
8,40	596,84 a	421,58 b	538,11 ab
C.V. (%)	-----14,19-----		

Concentração (µg g ⁻¹)	CBM (µg g ⁻¹) – SPC			Quociente metabólico (qCO ₂) – SPC		
	Fluazifop-p-butil	Fomesafen	Fluazifop-p-butil + Fomesafen	Fluazifop-p-butil	Fomesafen	Fluazifop-p-butil + Fomesafen
0,00	219,66 a	224,55 a	230,01 a	1,48 a	1,46 a	1,50 a
1,05	154,09 a	222,78 a	157,96 a	1,99 a	1,52 a	2,67 a
2,10	169,18 ab	226,89 a	153,80 b	2,09 a	1,62 a	2,28 a
4,20	179,90 a	196,55 a	126,10 a	2,15 a	2,02 a	3,36 a
8,40	186,04 a	114,84 ab	58,926 b	2,21 a	2,95 a	7,28 b
C.V. (%)	-----18,43-----			-----19,99-----		

Médias seguidas de letras iguais, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

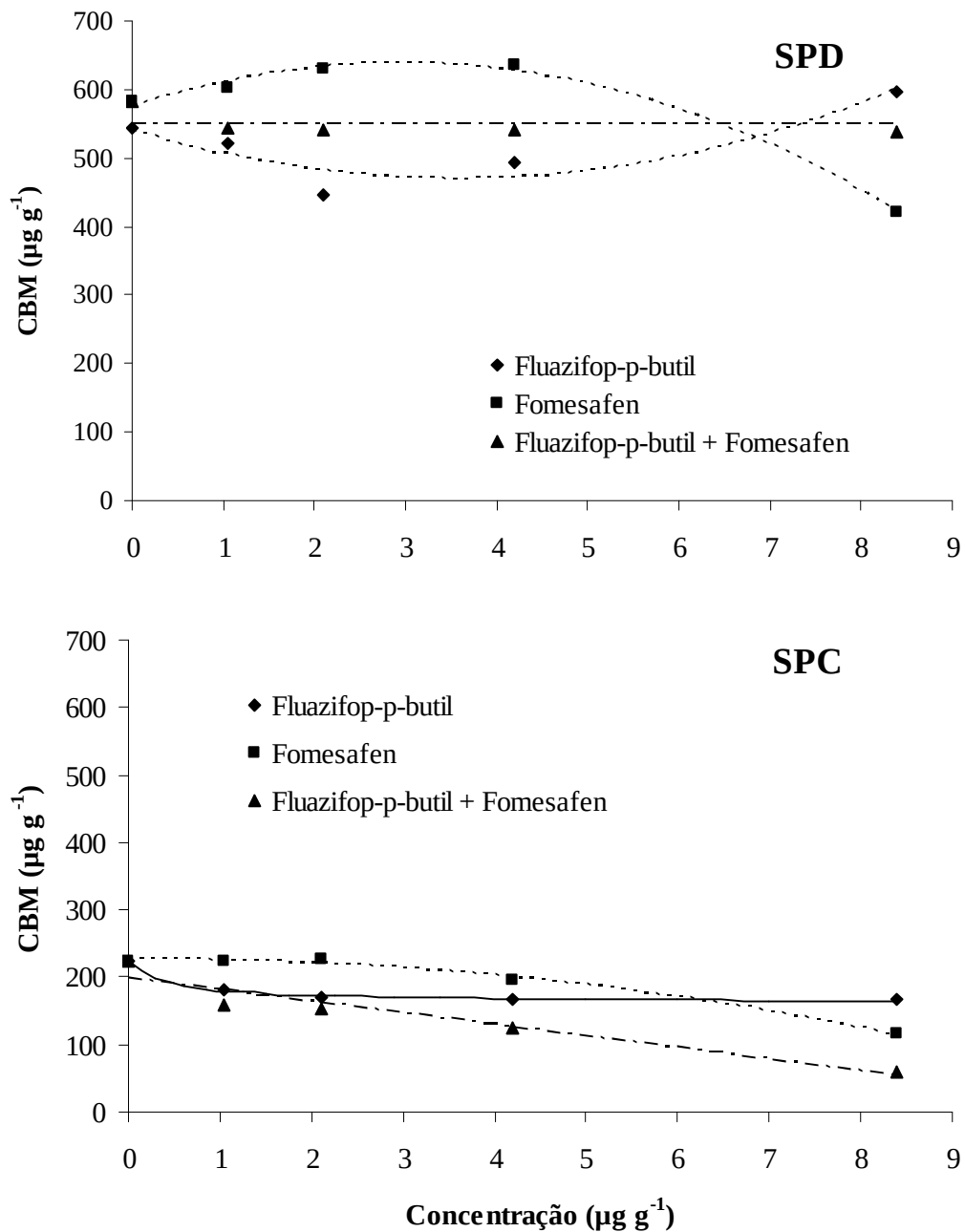


Figura 3 – Carbono da biomassa microbiana (CBM) determinado em solo sob diferentes concentrações (C) dos herbicidas fluazifop-p-butyl (Sistema de Plantio direto – SPD: $Y=5,5919C^2-39,9810C+541,241$ $R^2=0,84$; e Sistema de Plantio convencional – SPC: $Y=162,4306+(24,0372)/0,3854+C$ $R^2=0,99$), fomesafen (SPD: $Y=-7,3082C^2+43,3451C+574,539$ $R^2=0,99$ e SPC: $Y=-1,7216C^2+1,2016C+225,639$ $R^2=0,98$), e da mistura pré-formulada (SPD: $\bar{Y} = 549,189I$ e SPC: $Y = -17,219C+198,551$ $R^2=0,91$).

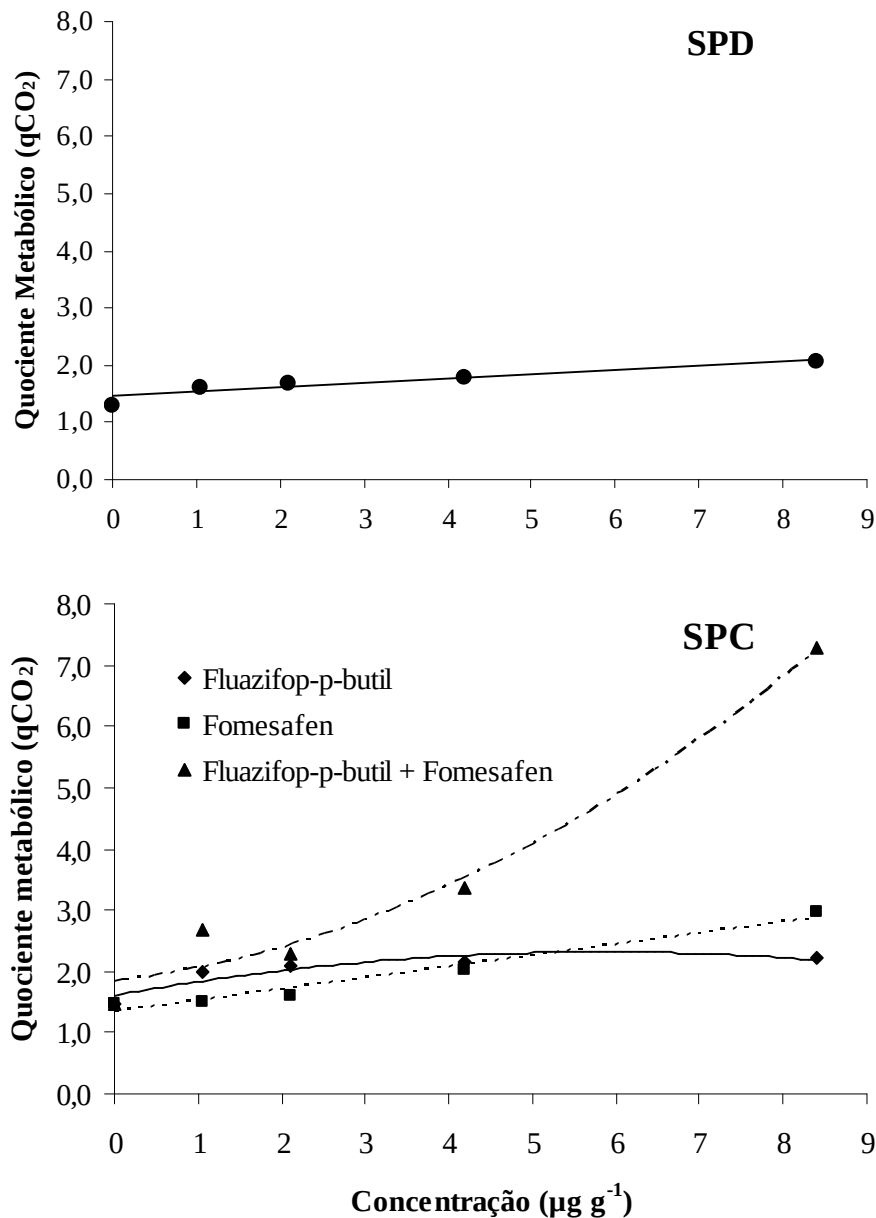


Figura 4 – Quociente metabólico (qCO₂) médio determinado em solo, proveniente de sistema de plantio direto (SPD), sob diferentes concentrações (C) ($Y=0,0757C+1,454$ $R^2=0,87$) dos herbicidas fluazifop-p-butil, fomesafen e da mistura pré-formulada e, de sistema de plantio convencional (SPC), sob ação do fluazifop-p-butil ($Y=-0,0208C^2+0,243C+1,6092$ $R^2=0,82$), fomesafen ($Y=0,1833C+1,3407$ $R^2=0,96$), e da mistura pré-formulada ($Y=0,0574C^2+0,1623C+1,8313$ $R^2=0,94$).

3.4 CONCLUSÕES

- A taxa de desprendimento de CO_2 do solo proveniente do sistema plantio direto é superior à observada no solo sob cultivo convencional, independentemente da aplicação dos herbicidas testados.
- Os valores para biomassa microbiana do solo variaram entre as concentrações dos herbicidas e entre sistemas de plantio sendo maiores em sistema plantio direto e diminuídos na maior concentração do fomesafen puro ou em mistura comercial.
- No solo proveniente do sistema plantio direto o quociente metabólico (qCO_2) não variou entre os tratamentos, entretanto, aumentou com a concentração dos herbicidas; para o solo sob sistema plantio convencional, os maiores valores para qCO_2 foram observados com o aumento da concentração da mistura comercial dos herbicidas.

3.5 LITERATURA CITADA

- AMATO, M.; LADD, J.N. Decomposition of ¹⁴C-labelled glucose and legume material in soil: Properties influencing the accumulation of organic residue C and microbial biomass C. **Soil Biol. Biochem.**, v.24, p.455-464, 1992.
- ANDERSON, T.H.; DOMSCH, K.H. Determination of ecophysiological maintenance carbon requirements of soil microorganisms in a dormant state. **Biol. Fertil. Soils**, v.1, p.81-89, 1985.
- BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S.; et al. Microbial biomass in soils under different tallage and crop rotation systems. **Biol. Fertil. Soils**, v.38, p.15-20, 2003.
- BEARE, M.H.; COLEMAN, D.C.; CROSSLEY Jr., D.A. et al. A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. **Plant Soil**, v.170, p.5-22, 1995.
- CARTER, M.R. Influence of reduced tillage systems on organic matter, microbial biomass, macro-aggregate distribution and structural stability of surface soil in a humid climate. **Soil Til. Res.**, v.23, p.361-372, 1992.
- EDWARDS, C.A. Impact of herbicides on soil ecosystems. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v.8, p.221-257, 1989.

ELLIOTT, E.T.; COLEMAN, D.C. Let the soil work for us. **Ecol. Bulletin**, v.39, p.23-32, 1988.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solo**. 2 ed. Rio de Janeiro, 1997. 212p.

FEBRAPDP – Federação Brasileira de Plantio Direto na Palha. (2005) http://www.febrapdp.org.br/area_PD_Brasil (12 mar. 2005).

FONTES, J.R.A., et al. Lixiviação de herbicidas no solo aplicados com água de irrigação em plantio direto. **Planta Daninha**, v.22, p.623-631, 2004.

HESS, F.D. Mode of action of lipid biosynthesis inhibitors (Graminicides – Accase Inhibitors). In: **Herbicide action course**. Purdue University: Indiana, 1995d, 787p.

ISLAM, K.R.; WEIL, R.R. Microwave irradiation of soil for routine measurement of microbial biomass carbon. **Biol. Fertil. Soils**, v.27, p.408-416, 1998.

JENKINSON, D.S.; LADD, J.M. **Microbial biomass in soil: measurement and turnover**. In: PAUL, E.A. & LADD, J.N., eds. Soil biochemistry. New York, Marcel Dekker, 1981, v.5, p.415-471.

KINNEY, C.A.; MANDERNACK, K.W.; MOSIER, A.R. Laboratory investigations into the effects of the pesticides mancozeb, chlorothalonil, and prosulfuron on nitrous oxide and nitric oxide production in fertilized soil. **Soil Biol. Biochem.**, v.37, p.837-850, 2005.

PERSCHBACHER, P.W.; STONE, N.; LUDWIG, G.M. et al. Evaluation of effects of common aerially-applied soybean herbicides and propanil on the plankton communities of aquaculture ponds. **Aquaculture**, v.157, p.117-122, 1997.

PROCÓPIO, S.O.; SANTOS, J.B.; JACQUES, R.J.S. 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.

- RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. de. **Guia de herbicidas**. 5.ed. Londrina, PR: Grafmarke, 2005. 591p.
- SAKAMOTO, K.; OBO, Y. Effects of fungal to bacterial ratio on the relationship between CO₂ evolution and total soil microbial biomass. **Biol. Fertil. Soils**, v.17, p.39-44, 1994.
- SANTOS, J.B. **Efeitos do glyphosate sobre o crescimento de estirpes de *Bradyrhizobium***. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa. 56p. 2004.
- SILVA, A.A.; SILVA, J.F.; FERREIRA, F.A. et al. **Controle de plantas daninhas**. Brasília: ABEAS, módulo 3, 2003. 260p.
- SOUZA, A.P., et al. Respiração microbiana do solo sob doses de glyphosate e de imazapyr. **Planta Daninha**, v.17, p.387-398, 1999.
- SPARLING, G.P. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indication of changes in soil organic matter. **Aust. J. Soil. Res.**, v.30, p.195-207, 1992.
- STENBERG, B. Monitoring soil quality of arable land: microbiological indicators. **Soil Plant Sci.**, v.49, p.1-24, 1999.
- TUFFI SANTOS, L.D.; et al. Exsudação radicular do glyphosate por *Brachiaria decumbens* e seus efeitos em plantas de eucalipto e na respiração microbiana do solo. **Planta Daninha**, v.23, p.143-152, 2005.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biol. Biochem.**, v.19, p.703-707, 1987.
- WARDLE, D.A. Impact of disturbances on detritus food-webs in agro-ecosystems of contrasting tillage and weed management practices. **Adv. Ecol. Res.**, v.26, p.10-17, 1994.
- WARDLE, D.A.; PARKINSON, D. Relative importance of the effects of 2,4-D, glyphosate and environmental variables on the soil microbial biomass. **Plant Soil**, v.134, p.209-219, 1991.
- WARREN, G.F.; HESS, F.D. Mode of action of inhibitors of protoporphyrinogen oxidase (Diphenylethers and oxadiazon). In: **Herbicide action course**. Purdue University: Indiana, 1995, 787p.

4. AÇÃO DE HERBICIDAS SOBRE O CRESCIMENTO DE ESTIRPES DE *Rhizobium tropici*

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar o crescimento das estirpes de *Rhizobium tropici* BR 322 e BR 520, utilizadas como inoculantes na cultura do feijoeiro no Brasil, em meio de cultura à base de manitol e extrato de levedura (YM) adicionado de diferentes herbicidas (bentazon, metolachlor, imazamox, fluazifop-p-butil, fomesafen e paraquat). Os herbicidas fluazifop-p-butil e fomesafen foram avaliados puros e em mistura comercial, em concentrações variando entre 0,0 e 49,23 mg L⁻¹. O crescimento das estirpes de *Rhizobium* foi avaliado em espectrofotômetro ao longo de 100 horas de incubação por meio da leitura da densidade ótica, a 560 nm, sendo posteriormente convertido em unidades formadoras de colônia por mL. Foi observado que o paraquat foi o herbicida com maior inibição do crescimento das estirpes avaliadas, seguido pela mistura comercial de fomesafen e fluazifop-p-butil. Para os demais herbicidas, a redução do crescimento não foi significativa. No geral, a estirpe BR 520 mostrou-se mais tolerante aos herbicidas testados, com exceção ao paraquat. No

ensaio de concentrações crescentes do fomesafen, isolado ou em mistura ao fluazifop-p-butil, não foi possível determinar o I_{50} (concentração do herbicida que reduz em 50% o crescimento do rizóbio) sendo que a maior redução, de 31,1%, foi observada para a estirpe BR 322 na máxima concentração testada (49,23 mg L⁻¹) da mistura comercial.

Palavras-chave: bentazon, fluazifop-p-butil, fomesafen, imazamox, metolachlor, paraquat.

HERBICIDES ACTION ON THE GROWTH OF *Rhizobium tropici* STRAINS

ABSTRACT

This work aimed at evaluating the growth of *Rhizobium tropici* BR322 and BR 520 strains, used as inoculant on common bean in Brazil, in yeast extract manitol (YM) medium supplemented with different herbicides (bentazon, metolachlor, imazamox, fluazifop-p-butyl, fomesafen and paraquat). Fluazifop-p-butyl and fomesafen were evaluated pure and in a commercial mixture with concentrations, varying from 0.0 to 49.23 mg L⁻¹. Cell growth was assessed by optic density readings in a spectrophotometer at 560 nm, being later converted to colony forming units per mL. Paraquat caused higher inhibition of cell growth, followed by the commercial mixture of fomesafen and fluazifop-p-butyl. For the others herbicides, growth reduction was not meaningful. In general, BR 520 strain was more tolerant to tested herbicides, except to paraquat. The I_{50} (herbicide concentration that decrease *Rhizobium* growth in 50%) could not be determined in fomesafen concentrations tested, isolated or mixture to fluazifop-p-butyl. The higher reduction of 31.1% was observed to BR322 in the maximum tested concentration of commercial mixture.

Key words: bentazon, fluazifop-p-butyl, fomesafen, imazamox, metolachlor, paraquat.

4.1 INTRODUÇÃO

A aplicação de herbicidas sobre culturas que realizam simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico pode prejudicar a eficiência na assimilação desse nutriente (Marenco et al., 1993; Novo et al., 1996, Novo et al., 1998, Santos et al., 2005). Tais prejuízos devem-se à interferência do herbicida no metabolismo do microssimbionte, na planta hospedeira ou de ambos, quando em associação (Arruda et al., 2001b). A aplicação de herbicidas, dependendo do princípio ativo ou da formulação, da dose utilizada, dos microrganismos presentes e a sensibilidade desses aos diversos produtos (Royuela et al., 1998), das condições climáticas e do tipo de solo (Silva et al., 2003), podem trazer conseqüências indesejáveis para a microbiota. Acredita-se que a maior interferência desses compostos ocorre quando esses agem sobre a biossíntese de aminoácidos ou rotas metabólicas comuns entre microrganismos e plantas.

Por este motivo, o uso de moléculas herbicidas e formulações menos agressivas a organismos não-alvos deve ser objetivo de todos aqueles que se utilizam dessa tecnologia para aumentar a produção de alimentos sem, no entanto, comprometer a produtividade e sustentabilidade do sistema.

A capacidade produtiva dos atuais cultivares de feijão é aumentada somente com tecnologia que demanda alta adubação. Nesse sentido, a fixação biológica do nitrogênio pode ser uma alternativa para os adubos nitrogenados, desde que haja manejo adequado para o microssimbionte (rizóbio), visando aumentar a eficiência dessa associação. Nos cultivares utilizados no Brasil, que apresentam boa nodulação, a fixação de nitrogênio representa até 30 kg ha⁻¹ por cultivo (Mendes et al., 1995).

Trabalhos realizados em outros países (Moorman et al., 1992, Eberbach & Douglas, 1989, Mallik & Tesfai, 1985, Schuls et al., 1985) evidenciam que a

aplicação de herbicidas causa toxicidade a estirpes de rizóbios ou prejudicam a nodulação de leguminosas. Além disso, em alguns trabalhos (Haugland, 1994), as estirpes do gênero *Rhizobium* foram mais sensíveis a ação de herbicidas, comparadas a outras bactérias.

Neste trabalho objetivou-se avaliar o crescimento de duas estirpes de *Rhizobium tropici* (BR 322 e BR 520) sob ação dos herbicidas bentazon, metolachlor, imazamox, fluazifop-p-butil, fomesafen e paraquat.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Associações Biológicas/BIOAGRO, pertencente ao Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. Foram realizados dois experimentos sendo o primeiro visando avaliar o crescimento de duas estirpes de *Rhizobium tropici* (BR 322 e BR 520) em meio de cultura contendo os herbicidas (ingrediente ativo em mg L⁻¹): Basagran[®] (bentazon 14,19), Dual Gold[®] (s-metolachlor 47,31), Sweeper[®] (imazamox 0,69), Fusilad 125[®] (fluazifop-p-butil 2,96), Flexf[®] (fomesafen 4,92), Robust[®] (mistura pré-formulada contendo fomesafen 4,92 + fluazifop-p-butil 3,94) e Gramoxone[®] (paraquat 9,85). Utilizou-se ainda, a amostra sem adição de herbicida, totalizando 16 tratamentos, dispostos em delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições.

As soluções-estoque dos herbicidas foram preparadas pela mistura das formulações comerciais com água destilada e desionizada, sendo posteriormente esterilizadas por filtração (filtro Milipore[®], 0,25 µm) em condições assépticas. As concentrações utilizadas de cada herbicida foram calculadas com base na dosagem média comercial proposta (recomendada), levando-se em consideração a área a ser aplicada.

As estirpes de *Rhizobium* foram obtidas da Coleção de Bactérias Diazotróficas do Centro Nacional de Pesquisa da Embrapa/Agrobiologia, sendo as culturas estocadas em meio YM composto, em g L⁻¹, por: Manitol, 10;

K₂HPO₄, 0,05; MgSO₄, 0,02; NaCl, 0,01; extrato de levedura, 0,5; com pH ajustado em 6,8; à temperatura de 28 °C. A ativação destas culturas foi realizada segundo método descrito pela Embrapa (1994), sendo realizada, posteriormente, sua multiplicação em Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio YM líquido, incubados em agitador rotatório a 150 rpm e temperatura de 28 °C, até atingirem densidade ótica (DO a 560 nm) equivalente a 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC) por mL.

O efeito dos herbicidas no crescimento das estirpes de *Rhizobium* foi avaliado mediante leitura da DO em espectrofotômetro (Titertek Multiskan Plus MKII), a 560 nm. As avaliações para as primeiras 24 horas de incubação foram realizadas em intervalos de duas horas. Posteriormente, até as 48 e 96 horas de incubação, os intervalos entre leituras foram a cada quatro e doze horas, respectivamente. Para isso, foram utilizadas placas de ELISA com 96 células de 300 µL de capacidade volumétrica, onde foram adicionados 180 µL de meio YM líquido estéril, 60 µL da solução-estoque estéril dos herbicidas e 15 µL das culturas ativadas, totalizando 255 µL de solução. Em seguida, as placas foram incubadas no escuro, em incubadoras a 28°C, de onde foram retiradas somente para as leituras de DO sendo imediatamente recolocadas neste local, até o final das leituras. A transformação DO x unidades formadoras de colônia (UFC), foi obtida por meio da contagem em placas, precedida pela diluição seriada da suspensão de DO conhecida. Para interpretação dos resultados foram confeccionadas curvas de crescimento em milhões de UFC em função do tempo, sendo que, os dados obtidos após 96 horas de incubação, foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

No segundo experimento os procedimentos para ativação, inoculação e avaliação da DO das estirpes foram semelhantes ao descrito para o primeiro. Contudo, os tratamentos foram compostos pela combinação de três herbicidas (fluazifop-p-butil, fomesafen e a mistura comercial Robust[®]), aplicados em diferentes concentrações (0; 1,35; 3,70; 7,40; 14,80 e 29,60 mg L⁻¹ para o fluazifop-p-butil e 0; 3,08; 6,15; 12,31; 24,61 e 49,23 mg L⁻¹, para o fomesafen

isolado ou em mistura ao primeiro), constituindo um fatorial 3 x 6 para cada estirpe (BR 322 e BR 520), com 12 repetições. Os dados obtidos após 100 horas de incubação, foram submetidos à análise de variância, sendo o efeito dos herbicidas sobre o crescimento das estirpes avaliado por regressão.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a aplicação dos diferentes herbicidas testados, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi afetado para ambas as estirpes avaliadas. A estirpe BR 520 apresentou crescimento mais acelerado, evidenciado pela maior inclinação da fase exponencial de multiplicação celular, nas primeiras 30 horas após a inoculação (Figura 1 e Tabela 1).

Entre os herbicidas testados, paraquat se apresentou como o produto que promoveu maior inibição do crescimento das estirpes, sendo BR 520, a estirpe mais sensível a esse composto. A adição da mistura comercial de fluazifop-p-butil + fomesafen causou maior diminuição no crescimento da BR 322 (Figura 1).

Para os demais herbicidas, o efeito sobre o crescimento das estirpes foi menos significativo, chegando a aumentá-lo, no caso do fluazifop-p-butil para a estirpe BR 322 (Figura 1 e Tabela 2). Ao final do período de incubação, foi possível observar entre os herbicidas testados, à exceção do paraquat, maior tolerância da estirpe BR 520, comparada à BR 322 (Tabela 2).

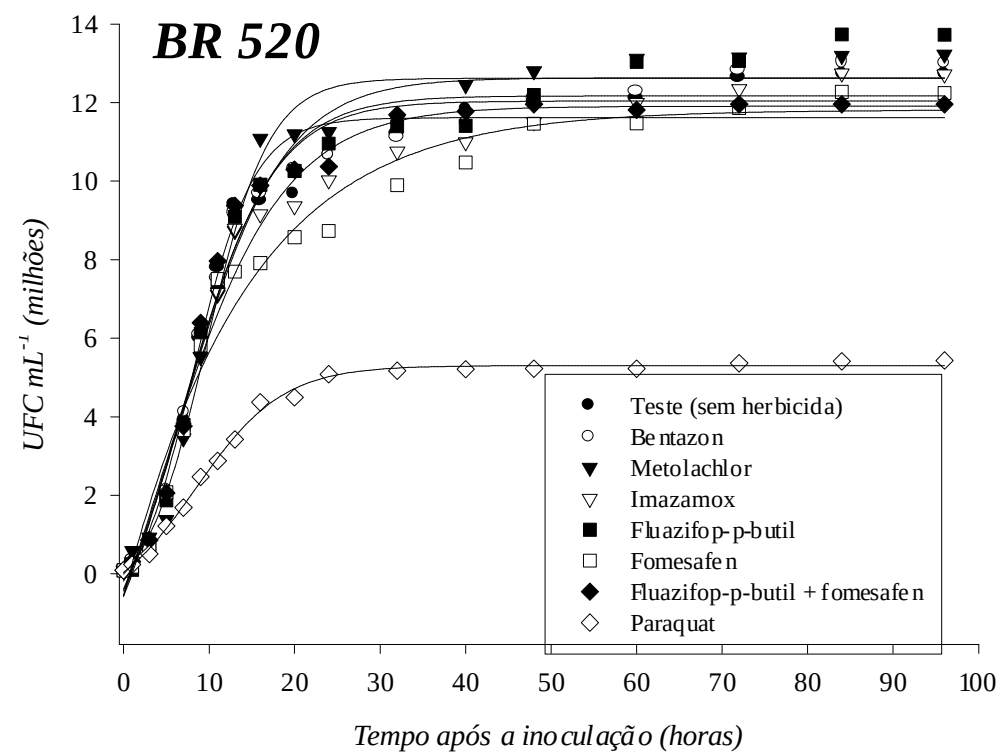
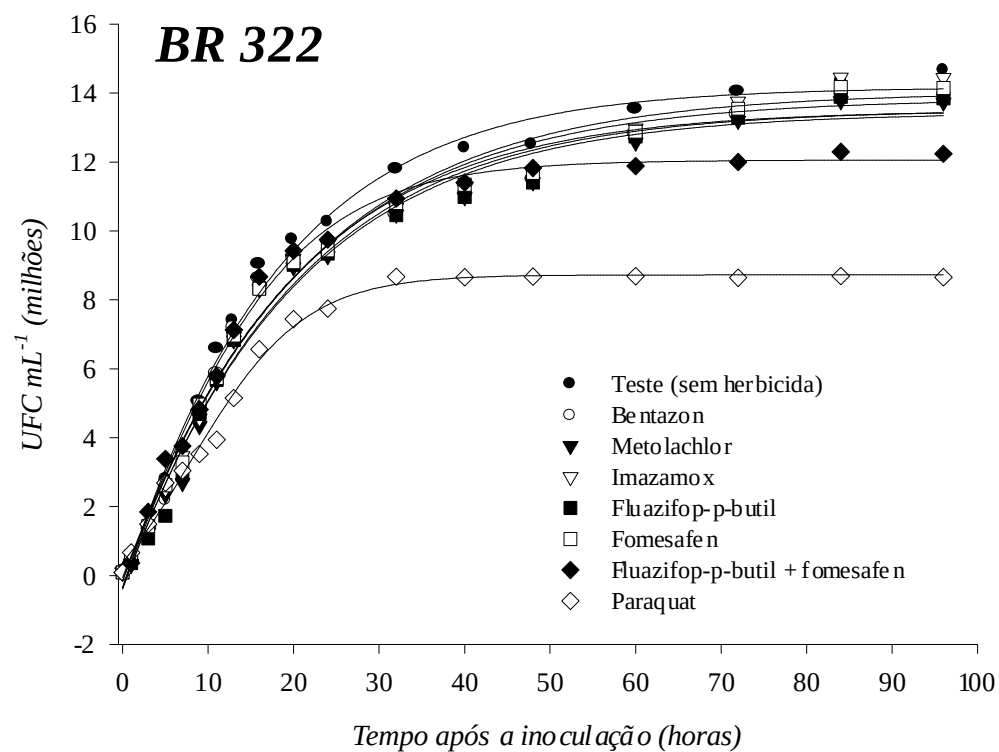


Figura 1 – Crescimento das estirpes de *Rizobium tropici* BR 322 e BR 520, em meio YM, sob efeito de diferentes herbicidas, ao longo de 96 horas de incubação a 28 °C. Viçosa – MG, 2005

Tabela 1 – Curvas de regressão relacionando unidades formadoras de colônia (UFC mL⁻¹ em milhões) das estirpes de *Rhizobium tropici* BR 322 e BR 520 e tempo após a inoculação (horas – H), em meio YM, sob efeito de diferentes herbicidas ao longo de 96 horas de incubação a 28 °C. Viçosa – MG, 2005

Tratamentos	Equação ajustada	R ²
	-----BR 322-----	
Teste (sem herbicida)	$Y = -112,0143 + 126,1871 / (1 + \exp(-(H^* + 33,827) / 16,5951))$	0,993
Bentazon	$Y = -311,5169 + 325,0294 / (1 + \exp(-(H^* + 57,8269) / 18,5805))$	0,985
Metolachlor	$Y = -208,7985 + 222,2381 / (1 + \exp(-(H^* + 51,8617) / 19,1075))$	0,987
Imazamox	$Y = -245,0929 + 259,1268 / (1 + \exp(-(H^* + 56,759) / 19,9297))$	0,988
Fluazifop-p-butil	$Y = -171,9737 + 185,4896 / (1 + \exp(-(H^* + 47,3315) / 18,8391))$	0,985
Fomesafen	$Y = -389,2975 + 403,1393 / (1 + \exp(-(H^* + 65,8382) / 19,796))$	0,991
Fluazifop-p-butil + fomesafen	$Y = -13,4183 + 25,4747 / (1 + \exp(-(H^* + 0,9962) / 10,1278))$	0,996
Paraquat	$Y = -2,0792 + 10,8052 / (1 + \exp(-(H^* - 8,0023) / 6,5774))$	0,993
-----BR 520-----		
Teste (sem herbicida)	$Y = -3,8475 + 15,8893 / (1 + \exp(-(H^* - 6,8237) / 5,2549))$	0,981
Bentazon	$Y = -4,0422 + 16,2166 / (1 + \exp(-(H^* - 6,7038) / 5,4245))$	0,982
Metolachlor	$Y = -0,906 + 13,5274 / (1 + \exp(-(H^* - 9,6845) / 3,6682))$	0,988
Imazamox	$Y = -8,0966 + 20,0066 / (1 + \exp(-(H^* - 3,6195) / 7,1997))$	0,977
Fluazifop-p-butil	$Y = -5,1199 + 17,7519 / (1 + \exp(-(H^* - 6,4064) / 5,9944))$	0,976
Fomesafen	$Y = -186,3582 + 198,1759 / (1 + \exp(-(H^* + 37,1962) / 13,7308))$	0,975
Fluazifop-p-butil + fomesafen	$Y = -1,381 + 12,9978 / (1 + \exp(-(H^* - 8,1066) / 3,5462))$	0,989
Paraquat	$Y = -0,9894 + 6,2915 / (1 + \exp(-(H^* - 8,3666) / 5,1121))$	0,997

*/Significativo pelo teste t a 1% de probabilidade.

A maior toxidez apresentada pelo paraquat às estirpes de *Rhizobium tropici*, pode estar relacionada ao seu mecanismo de ação, o qual, por meio da captura de elétrons provenientes da respiração, forma radicais tóxicos instáveis que rapidamente sofrem a auto-oxidação. Durante o processo de auto-oxidação são produzidos radicais superóxido e peróxido de hidrogênio que reagem, produzindo hidroxil e oxigênio *singlet* (Weller & Warren, 1995). Estas substâncias juntas promovem a degradação de membranas (peroxidação de lipídios), ocasionando a morte da célula (Weller & Warren, 1995). Outra possível causa para esse efeito pode ser atribuída à toxicidade de um ou mais ingredientes na formulação comercial do produto. Todavia, pode, ainda ter ocorrido interação entre esses dois fatores. Santos et al. (2005) observaram que a formulação comercial do glyphosate aumentava seu efeito tóxico contra bactérias, quando comparado ao equivalente ácido puro.

Tabela 2 – Crescimento relativo à testemunha (sem herbicida) das estirpes de *Rhizobium tropici* BR 322 e BR 520, 96 horas de incubação a 28 °C em meio YM, sob efeito de diferentes herbicidas. Viçosa – MG, 2005

Tratamentos	Crescimento relativo (%)	
	BR 322	BR 520
Testemunha (sem herbicida)	100,0 a A	100,0 ab A
Bentazon	95,10 a A	102,27 ab A
Metolachlor	93,88 a B	104,03 ab A
Imazamox	98,78 a A	100,05 ab A
Fluazifop-p-butil	94,69 a B	107,93 a A
Fomesafen	96,73 a A	96,29 b A
Fluazifop-p-butil + fomesafen	83,67 b A	94,02 b A
Paraquat	59,18 c A	42,74 c B
C.V. (%)	-----8,77-----	

Médias seguidas por letras iguais, maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade de erro; minúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

O herbicida imazamox testado, semelhante ao imazethapyr, é inibidor da síntese da enzima acetolactato sintase (ALS), no entanto, não apresentou toxidez às estirpes avaliadas. Gonzalez et al. (1996) verificaram que o *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* mostrou-se tolerante ao imazethapyr. Todavia, em outros trabalhos, herbicidas inibidores da enzima ALS afetaram, negativamente, o crescimento de estirpes de *Bradyrhizobium* (Arruda et al., 2001b).

Quando o fluazifop-p-butil foi adicionado em diferentes concentrações ao meio de cultura, as estirpes avaliadas não apresentaram diferença no crescimento. Mesmo na maior concentração testada (49,23 mg L⁻¹), o número de colônias formadas foi semelhante ao observado na testemunha, portanto, expressos por uma única regressão (Figura 2). Entretanto, com o aumento da concentração do fomesafen, isolado ou em mistura ao fluazifop-p-butil, observou-se diminuição do crescimento ao longo do período de avaliação (Figuras 3 e 4). Para o fomesafen isolado, as reduções foram menores, contudo, mais expressivas para a estirpe BR 322 do que para a BR 520.

A maior tolerância da estirpe BR 520 ficou evidente quando foram testadas diferentes concentrações da mistura comercial entre fluazifop-p-butil e fomesafen. Semelhante ao ocorrido no primeiro experimento, o efeito de inibição no crescimento foi menos pronunciado para BR 520 (Figura 4). Resultados em nível de campo mostraram que o fluazifop-p-butil foi tóxico, diminuindo a massa seca e o número de nódulos em amendoim (Novo et al., 1998). A diferença na suscetibilidade de estirpes a herbicidas foi também observada por Ortiz et al. (1989), os quais concluíram que a estirpe de *B. elkanii* SEMIA 587 foi mais sensível ao trifluralin que a SEMIA 5019.

A possível causa do efeito de inibição ao crescimento do fomesafen sobre o rizóbio pode ser atribuída ao seu mecanismo de ação, o qual inibe a enzima protoporfirinogênio oxidase (protox) ocasionando acúmulo celular de protoporfirina IX. A protoporfirina IX interage com o oxigênio e a luz presentes no meio, formando superóxido e peróxido de hidrogênio, os quais promovem a peroxidação de lipídeos resultando em morte celular (Nandihalli & Duke, 1993). O fato de as placas terem sido incubadas no escuro não impediu a ação do

fomesafen, isto porque durante o tempo de cada leitura, as placas eram expostas à luz (aproximadamente 20 minutos) tempo suficiente para ocorrer a ação tóxica do produto. Arruda et al. (2001a), testando o sulfentrazone – outro inibidor da protox – sobre a nodulação e a fixação do nitrogênio, verificaram que a aplicação desse herbicida em soja, em doses variando de 36 a 144 $\mu\text{g m}^{-2}$, afetaram, negativamente, o número e a matéria seca de nódulos formados.

Semelhante ao comentário feito para o paraquat, também existe a possibilidade do efeito tóxico de outros compostos presentes na formulação comercial dos herbicidas sobre as estirpes de rizóbio. Santos et al. (2005) avaliaram o efeito do herbicida glyphosate puro e em formulação comercial sobre as estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 5019, SEMIA 5079, SEMIA 5080 e SEMIA 587. Os autores observaram que o efeito tóxico era muito mais pronunciado na formulação comercial. Eles também verificaram que a adição de aminoácidos aromáticos ao meio de cultura contendo os herbicidas, reduzia a toxidez para o glyphosate puro sobre as estirpes enquanto que para a formulação Roundup Transorb[®], a inibição do crescimento continuava. Segundo Kishinevsky et al. (1988) é possível que solventes, surfatantes e agentes molhantes presentes nas formulações comerciais de herbicidas, contribuam para os efeitos inibitórios desses produtos no crescimento de estirpes de rizóbios. Também Malkones (2000), inferiu que os aditivos presentes na formulação dos agroquímicos podem afetar os microrganismos e, em certos casos, até modificar o efeito dos agroquímicos.

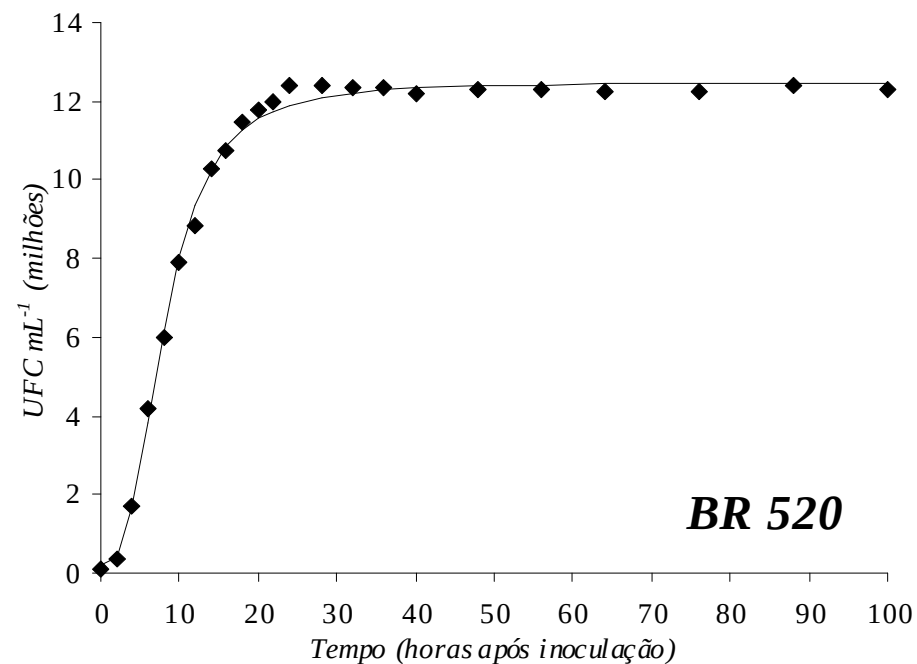
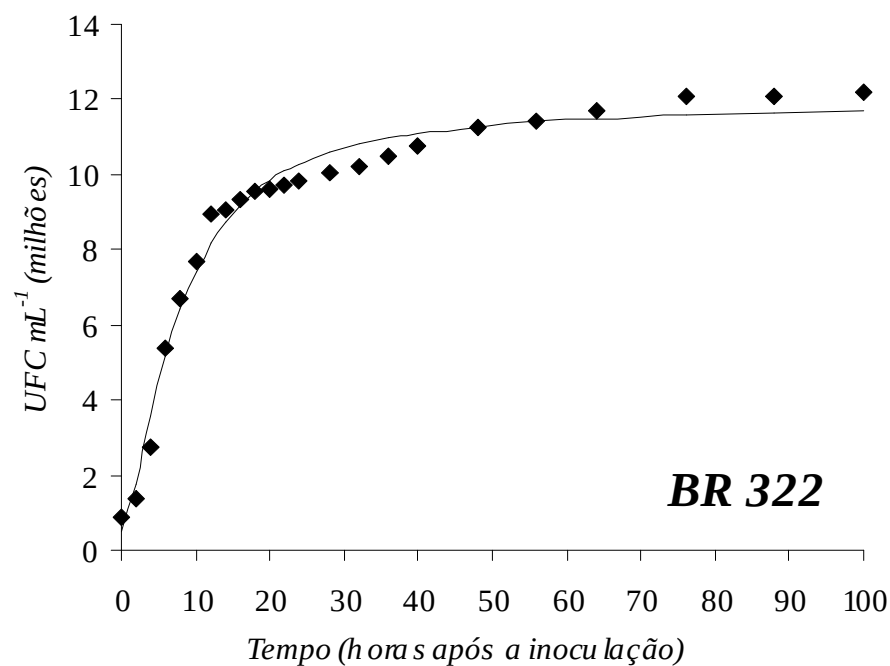


Figura 2 – Curva de crescimento das estirpes de *Rhizobium tropici* BR322 ($Y=0,4692+11,4044/(1+(H/7,5512)^{-1,568})$, e $R^2 = 0,983$), e BR 520 ($Y=0,1994+12,2795/(1+(H/8,1902)^{-2,7999})$, e $R^2 = 0,997$), em meio YM, com ou sem a adição do herbicida fluazifop-p-butil em concentrações variando de zero a 49,23 mg L⁻¹, relacionando unidades formadoras de colônias (UFC em milhões) em função do tempo (horas – H: significativo pelo teste t a 1% de probabilidade).

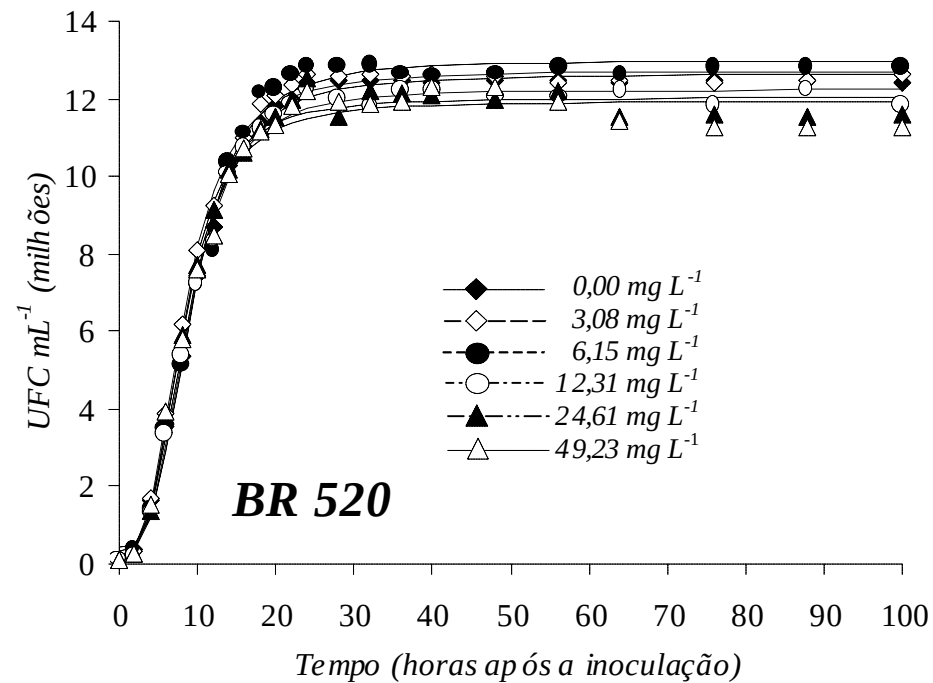
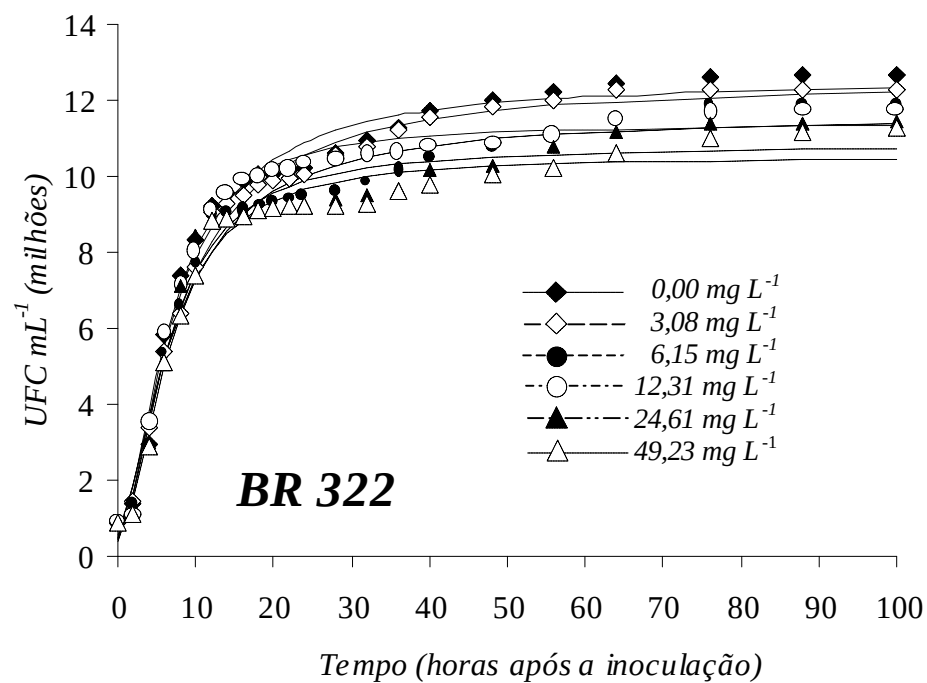


Figura 3 – Curva de crescimento da estirpe de *Rhizobium tropici* BR 322 e BR 520, em meio YM, com a adição de diferentes concentrações (mg L⁻¹) do herbicida fomesafen, relacionando unidades formadoras de colônia (UFC em milhões) em função do tempo (horas).

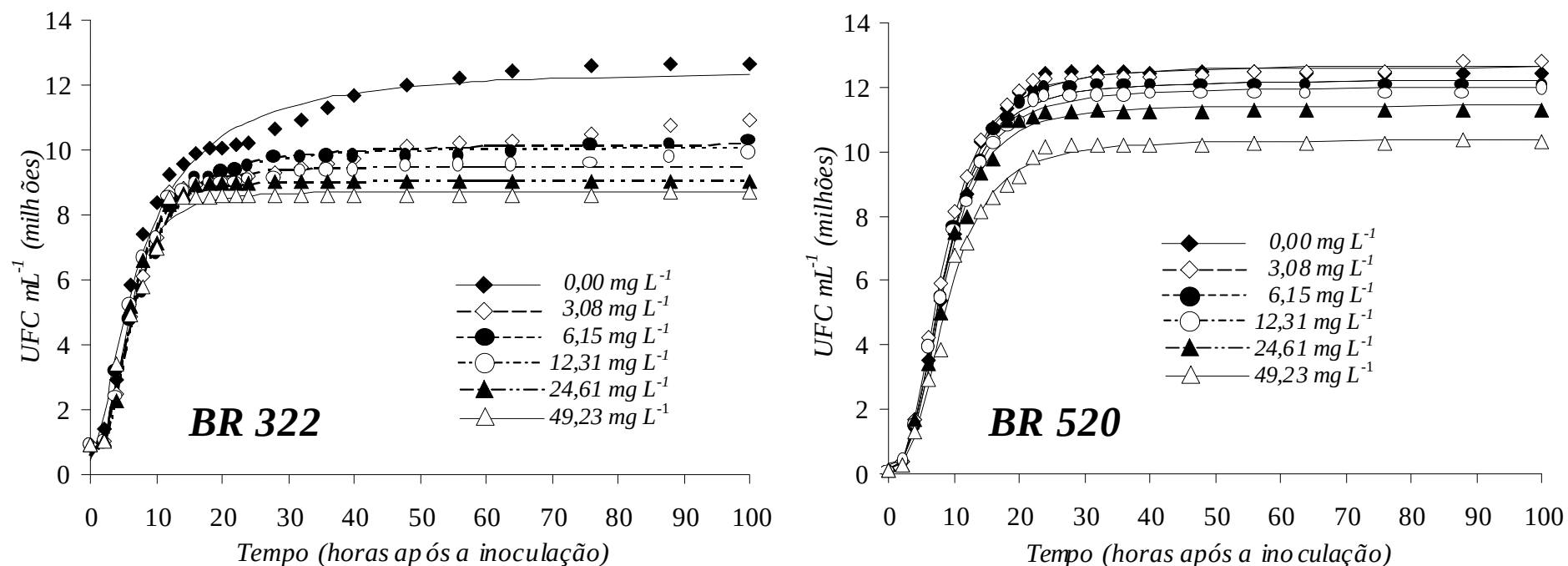


Figura 4 – Curva de crescimento da estirpe de *Rhizobium tropici* BR 322 e BR 520, em meio YM, com a adição da mistura comercial dos herbicidas fomesafen (250 g L⁻¹) + fluazifop-p-butil (200 g L⁻¹), em diferentes concentrações (mg L⁻¹), relacionando unidades formadoras de colônia (UFC em milhões) em função do tempo (horas).

Tabela 3 – Curvas de regressão relacionando unidades formadoras de colônia (UFC mL⁻¹ em milhões) das estirpes de *Rhizobium tropici* BR 322 e BR 520 e tempo de incubação (horas – H) a 28 °C, em meio YM, sob efeito do herbicida fomesafen (isolado ou em mistura ao fluazifop-p-butil*), em diferentes concentrações, ao longo de 96 horas. Viçosa – MG, 2005

Fomesafen isolado (mg L ⁻¹)	Equação ajustada	R ²	Equação ajustada	R ²
	-----BR 322-----		-----BR 520-----	
0,00	$Y=0,4185+12,1257/(1+(H/7,3582)^{-1,5549})$	0,984	$Y=0,3102+12,3191/(1+(H/8,8622)^{-2,9662})$	0,997
3,08	$Y=0,5775+11,8625/(1+(H/7,9883)^{-1,5261})$	0,992	$Y=0,207+12,4979/(1+(H/8,244)^{-2,9472})$	0,997
6,15	$Y=0,4475+11,1482/(1+(H/7,283)^{-1,5085})$	0,997	$Y=0,4217+12,5402/(1+(H/9,3228)^{-3,1937})$	0,993
12,31	$Y=0,5248+10,8559/(1+(H/6,4343)^{-1,9012})$	0,991	$Y=0,2369+11,9988/(1+(H/8,774)^{-3,1171})$	0,996
24,61	$Y=0,3844+10,4167/(1+(H/6,4388)^{-1,767})$	0,967	$Y=0,1804+11,8377/(1+(H/8,1161)^{-3,1491})$	0,993
49,23	$Y=0,5102+10,0035/(1+(H/6,7156)^{-1,8644})$	0,977	$Y=0,2257+11,6986/(1+(H/8,1656)^{-3,0385})$	0,990
Fomesafen em mistura (mg L ⁻¹)	Equação ajustada	R ²	Equação ajustada	R ²
	-----BR 322-----		-----BR 520-----	
0,00	$Y=0,4185+12,1257/(1+(H/7,3582)^{-1,5549})$	0,984	$Y=0,3102+12,3191/(1+(H/8,8622)^{-2,9662})$	0,997
3,08	$Y=0,5894+9,6304/(1+(H/6,8805)^{-2,1588})$	0,985	$Y=0,120+12,561/(1+(H/8,2017)^{-2,6868})$	0,987
6,15	$Y=0,7959+9,3259/(1+(H/7,0645)^{-2,2643})$	0,994	$Y=0,1884+12,0182/(1+(H/8,4264)^{-2,8254})$	0,997
12,31	$Y=0,7269+8,7952/(1+(H/6,2456)^{-2,7559})$	0,994	$Y=0,1768+11,8204/(1+(H/8,3642)^{-2,7397})$	0,998
24,61	$Y=0,8415+8,2267/(1+(H/6,1209)^{-3,259})$	0,996	$Y=0,275+11,1587/(1+(H/8,4769)^{-2,9957})$	0,995
49,23	$Y=0,8907+7,8306/(1+(H/5,7968)^{-2,8241})$	0,987	$Y=0,1695+10,2019/(1+(H/8,8735)^{-2,8137})$	0,995

*Mistura comercial Robust®. H: horas, significativo pelo teste t a 1% de probabilidade.

Também, no segundo experimento, ao final do período de incubação, tentou-se estabelecer a concentração dos herbicidas fluazifop-p-butil e fomesafen, responsável pela inibição de 50% do crescimento das estirpes (I_{50}), no entanto, isso não foi possível. A maior redução do crescimento verificada foi de 31,1% para a estirpe BR 322, sob ação da mistura comercial de fluazifop-p-butil e fomesafen ($49,23\text{mg L}^{-1}$) (Figura 5). Reduções acima de 50% foram constatadas por Santos et al. (2004) em três estirpes de *Bradyrhizobium* que receberam o herbicida glyphosate em concentração abaixo de 10 mg L^{-1} . Também os herbicidas imazethapyr e fomesafen aplicados em meio YM para o crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 5019), reduziram em mais de 40% o crescimento dessa estirpe (Procópio et al., 2004).

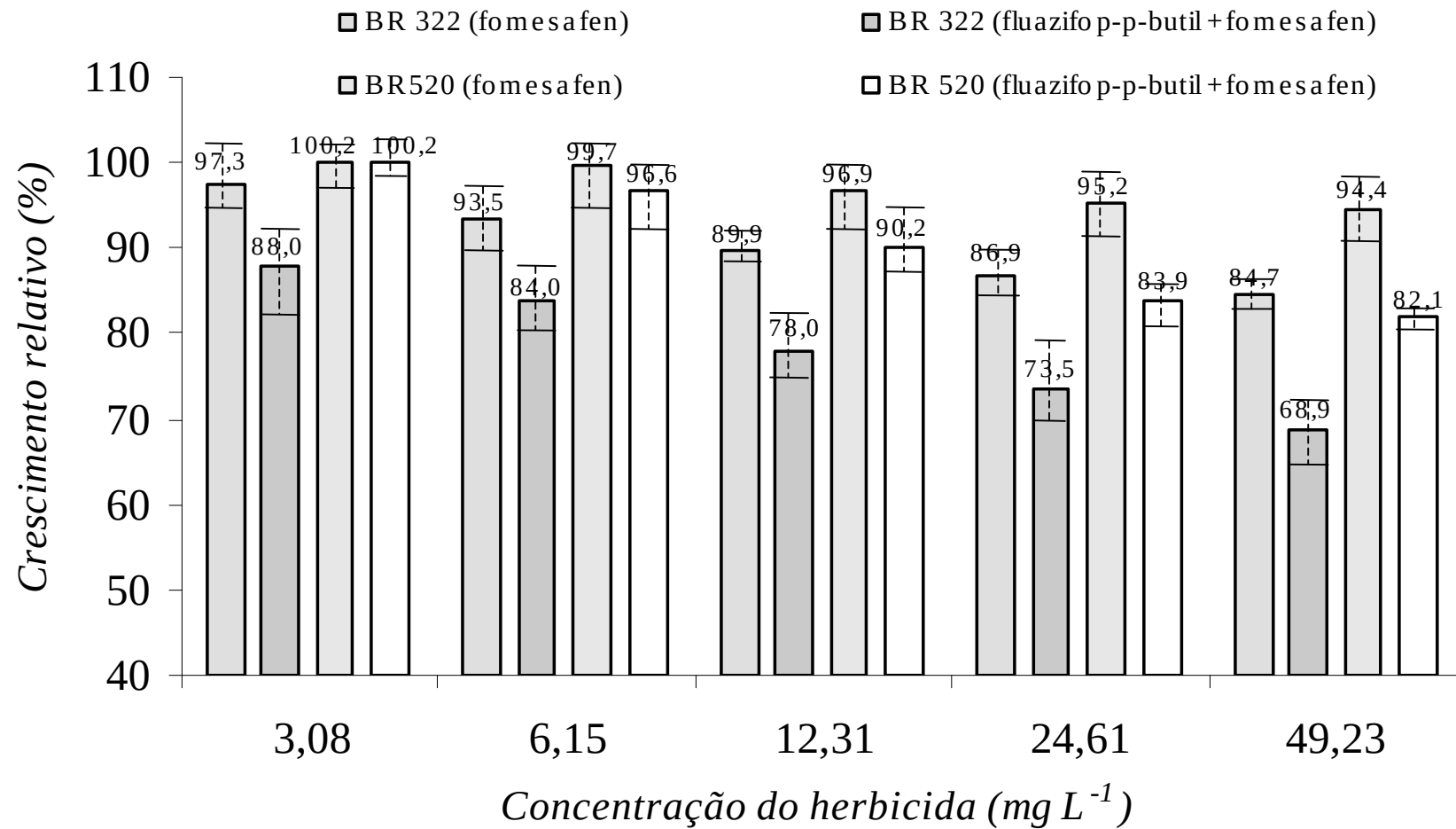


Figura 5 – Crescimento relativo (ao tratamento controle sem herbicida) das estirpes de *Rizobium tropici* BR322 e BR520, 100 horas após a inoculação a 28 °C em meio YM, sob efeito de diferentes concentrações dos herbicidas fomesafen e da mistura comercial fluazifop-p-butil + fomesafen.

Em geral, pode-se afirmar que o herbicida fomesafen aplicado isoladamente ou em mistura ao fluazifop-p-butil promove efeito negativo sobre o crescimento das estirpes avaliadas, sendo este efeito diretamente proporcional à concentração desse produto em meio de cultura. Entretanto, seu efeito é menor do que o observado para o paraquat. Entre as estirpes de *R. tropici* avaliadas, BR 520 se mostrou mais tolerante aos herbicidas testados, sendo normalmente a com maior potencial para utilização em campo.

4.4 CONCLUSÕES

- O menor crescimento das estirpes de rizóbio foi observado quando se adicionou ao meio de cultura o paraquat.
- Com exceção ao paraquat, em todos os demais herbicidas adicionados ao meio, maior tolerância foi observada para a estirpe BR 520.
- Fluazifop-p-butil adicionado ao meio de cultura até a concentração de 49,23 mg L⁻¹ não interferiu no crescimento das estirpes de rizóbio avaliadas.
- Com o aumento da concentração do fomesafen puro ou em mistura ao fluazifop-p-butil, observou-se menor crescimento das estirpes de rizóbio avaliadas.

4.5 LITERATURA CITADA

- ARRUDA, J.S.; LOPES, N.F.; BACARIN, M.A. Nodulação e fixação do dinitrogênio em soja tratada com sulfentrazone. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.36, n.2, p.325-330, 2001a.
- ARRUDA, J.S.; LOPES, N.F.; MOURA, A.B. Behavior of *Bradyrhizobium japonicum* strains under different herbicide concentrations. **Planta Daninha**, Viçosa, v.19, n.1, p.111-117, 2001b.
- EBERBACH, P.L.; DOUGLAS, L.A. Herbicide effects on the growth and nodulation potential of *Rhizobium trifolii* with *Trifolium subterraneum*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.119, n.1, p.15-23, 1989.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. **Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola**. Brasília, 1994. 542p.
- GONZALEZ, A., GONZALEZ-MURUA, C., ROYUELA, M. Influence of imazethapyr on *Rhizobium* growth and its symbiosis with Pea (*Pisum sativum*). **Weed Sci.**, v.44, p.31-37, 1996.
- HAUGLAND, E. Ecological consequences of chemical weed control. **Norsk Landbruksforskning**, v.8, n.1, p.1-13, 1994.

KISHINEVSKY, B. et al. Effects of some commercial herbicides on rhizobia and their symbiosis with peanuts. **Weed Res.**, v.28, p.291-296, 1988.

MALKONES, H.P. Comparasion of the effects of differently formulated herbicides on soil microbial activities – a review. **J. Plant Dis. Protect.**, v.8, n.5, p.781-789, 2000.

MALLIK, M.A.B.; TESFAI, K. Pesticidal effect on soybean-rhizobia symbiosis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.85, n.1, p. 33-41, 1985.

MARENCO, R.; LOPES, N.F.; MOSQUIM, P.R. Nodulation and nitrogen fixation in soybeans treated with herbicides. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, Campinas, v.5, n.2, p.121-126, 1993.

MENDES, I.C. et al. Efeito da inoculação com rizóbio e da adubação nitrogenada em sete cultivares de feijão em solo de cerrado. **Rev. Bras. Ci. Solo**, v.18, p.421-425, 1995.

MOORMAN, T.B. et al. Production of hydroxybenzoic acids by *Bradyrhizobium japonicum* strains after treatment with glyphosate. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.40, n.2, p.289-293, 1992.

NANDIHALLI, U.B.; DUKE, S.O. The porphyrin pathway as a herbicide target site. In: DUKE, S.O.; MENN, J.J.; PLIMMER, J.R. (Ed.). **Pest control with enhanced environmental safety**. Washington: American Chemical Society, 1993, p.62-72. (American Chemical Society Symposium Series, 524).

NOVO, M.C.S.S. et al. Efeito de linuron e oryzalin no crescimento da planta, na fixação simbiótica do nitrogênio e na produtividade da soja. **Planta Daninha**, Viçosa, v.14, n.1, p.65-81, 1996.

NOVO, M.C.S.S. et al. Influência de herbicidas aplicados em condições de pós-emergência no crescimento da planta e fixação simbiótica do nitrogênio na cultura do amendoim. **Sci. Agrícola**, v.55, n.2, p.276-284, 1998.

ORTIZ, S.; MUSUMECI, M.R.; TSAI, S.M. Efeito de alguns agrotóxicos na sobrevivência e na atividade respiratória de *Rhizobium leguminosarum* e *Bradyrhizobium japonicum*. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.24, n.6, p.663-667, 1989.

- PROCÓPIO, S.O. 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.
- ROYUELA, M. et al. Imazethapyr inhibition of acetolactate synthase in *Rhizobium* and its symbiosis with pea. **Pestic. Sci.**, v.52, p.372-380, 1998.
- 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.B.; et al. Tolerance of *Bradyrhizobium* strains to glyphosate formulations. **Crop Protection**, v.24, p.543-547, 2005.
- SCHULZ, A.; KRÜPER, A.; AMRHEIN, N. Differential sensitivity of bacterial 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases to the herbicide glyphosate. **FEMS Microbiol. Let.**, Amsterdam, v.28, n.3, p.297-301, 1985.
- SILVA, A.A. et al. **Controle de plantas daninhas**. Brasília, DF: ABEAS, módulo 3, 2003. 260p.
- WELLER, S.C., WARREN, G.F. Superoxide generators and protoporphyrinogen oxidase inhibitors (Paraquat and Diquat). In: **Herbicide action course**. Purdue University: Indiana, 1995, 787p.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De maneira geral, os indicadores microbiológicos avaliados ao longo do ciclo do feijoeiro se mostraram sensíveis para os impactos dos herbicidas testados.

Comprovou-se a eficiência do sistema de plantio direto em aumentar a quantidade e a qualidade da matéria orgânica do solo, promovendo, dessa forma, maior fixação de carbono nos solos sob esse sistema. Ficou também evidenciada a complexidade do sistema quando se utilizam os resultados de uma única característica, nesse caso, de um único indicador microbiológico, para inferências quanto ao impacto de determinado manejo sobre a qualidade do solo.

Assim sendo, os indicadores que relacionam duas ou mais características – quociente microbiano e quociente metabólico – foram mais eficientes na identificação do estresse ao qual o sistema – solo foi submetido após a aplicação dos herbicidas.

A partir dos resultados obtidos e a complementação com outros experimentos que avaliem grupos de microrganismos mais afetados pela aplicação dos herbicidas em estudo, trabalhos envolvendo o refinamento de microrganismos com maior

capacidade de degradação desses produtos podem ser viabilizados. Da mesma forma, a partir dos resultados da tolerância do rizóbio aos herbicidas, a estirpe BR 522 poderá apresentar maior eficiência na simbiose com o feijoeiro quando submetido aos herbicidas testados.

6. CONCLUSÕES FINAIS

- Os indicadores microbiológicos respiração basal do solo, biomassa microbiana e taxa de colonização micorrízica foram sensíveis à presença dos herbicidas testados e aos sistemas de plantio adotados nos ensaios de campo e de laboratório.
- Os efeitos negativos da aplicação dos herbicidas testados sobre a microbiota do solo foram menores em sistema de plantio direto, comparado ao sistema convencional de plantio.
 - A taxa de desprendimento de CO₂ do solo proveniente do sistema plantio direto é superior à observada no solo sob cultivo convencional, independentemente da aplicação dos herbicidas testados.
 - Os valores para biomassa microbiana do solo variaram entre as concentrações dos herbicidas e entre sistemas de plantio sendo maiores em sistema plantio direto.
 - O menor crescimento das estirpes de rizóbio foi observado quando se adicionou ao meio de cultura o paraquat.
 - Com exceção ao paraquat, em todos os demais herbicidas adicionados ao meio, maior tolerância foi observada para a estirpe BR 520.

- Com o aumento da concentração do fomesafen puro ou em mistura ao fluazifop-p-butil, observou-se menor crescimento das estirpes de rizóbio avaliadas.