

XXXII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo

“Efeitos de Herbicidas Utilizados na Cultura da Cana-de-Açúcar sobre o Crescimento da Bactéria Diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*”

SERGIO DE OLIVEIRA PROCÓPIO⁽¹⁾, MARCELO FERREIRA FERNANDES⁽¹⁾, ALBERTO CARGNELUTTI FILHO⁽²⁾, DANIELE ARAÚJO TELES⁽³⁾, SELENOBALDO ALEXINALDO CABRAL DE SANT'ANNA⁽⁴⁾, VERONICA MASSENA REIS⁽⁵⁾ & LEANDRO VARGAS⁽⁶⁾

RESUMO - Objetivou-se no trabalho identificar herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar que não afetam o crescimento da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* (Z67). O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Tabuleiros Costeiros em Aracaju-SE. Dezoito herbicidas registrados para a cultura de cana-de-açúcar no Brasil foram avaliados quanto ao impacto sobre o crescimento de *H. seropedicae* em condições de laboratório. Os efeitos das doses comerciais dos herbicidas sobre os parâmetros de crescimento de *H. seropedicae* foram avaliados pelo monitoramento do crescimento celular por turbidimetria. Os tratamentos herbicidas amicarbazone, tebuthiuron, diruon, metribuzin, hexazinone + diuron, hexazinone + clomazone, clomazone, isoxaflutole, sulfentrazone, imazapic, trifloxysulfuron sodium + ametryne, MSMA e 2,4-D não afetaram o crescimento da bactéria diazotrófica *H. seropedicae*, estirpe Z67, quando utilizados em concentração equivalente a dose comercial. Os tratamentos contendo os herbicidas paraquat, imazapyr, ametryne, glyphosate e oxyfluorfen inibiram significativamente o crescimento de *H. seropedicae*.

Palavras-Chave: (*Saccharum* spp.; fixação biológica de nitrogênio; pesticidas)

Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar [1] e é visto mundialmente como o grande expoente na tecnologia de produção de agroenergia. Para isso, uma série de novas unidades industriais estão sendo construídas em várias regiões do País, aumentando muito a área cultivada com cana-de-açúcar. Todavia, aumento na produtividade, redução de

custos e sustentabilidade da produção é o grande desafio da pesquisa nacional.

A adubação nitrogenada na cultura da cana-de-açúcar é uma operação necessária, já que a produtividade desta cultura responde à elevação dos teores de N do solo, principalmente, na cana-soca. Sabe-se, entretanto que o emprego de fontes minerais de N é uma operação extremamente onerosa [2]. O principal fertilizante mineral utilizado na cultura da cana-de-açúcar, a uréia, apresenta problema de volatilidade, necessitando ser incorporada para a diminuição de perdas [3,4].

Sabe-se que esta cultura é capaz de se associar com uma diversidade de bactérias diazotróficas e obter contribuições efetivas em termos de nutrição nitrogenada através do processo de fixação biológica do nitrogênio [5]. Uma das espécies de bactérias diazotróficas que vem sendo estudadas com resultados extremamente promissores é a *Herbaspirillum seropedicae*.

A presença de plantas daninhas em lavouras de cana-de-açúcar pode causar perdas na produtividade de colmos e de açúcar, decréscimo da longevidade do canavial, dificuldade e aumento no custo da colheita, queda na qualidade industrial da matéria prima, servir de abrigo para pragas e doenças da cana-de-açúcar e causar depreciação no valor da terra. Dentre os métodos de controle das plantas daninhas sobressai no Brasil o controle químico, devido, principalmente, ao rendimento operacional e ao custo por área, comparado aos demais métodos. Todavia, a aplicação de herbicidas, dependendo do princípio ativo ou da formulação, da dose utilizada, dos microrganismos presentes e da sensibilidade destes aos diversos produtos, das condições climáticas e do tipo de solo, pode trazer conseqüências indesejáveis para a microbiota do solo ou associada às plantas [6].

Decorrente desse cenário o objetivo do trabalho foi identificar herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar que não afetam o crescimento da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*.

⁽¹⁾ Pesquisadores da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Av. Beira Mar, 3.250, Aracaju, SE, CEP. 49025-040. E-mail: marcelo@cpac.embrapa.br.

⁽²⁾ Professor Adjunto do Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Maria. Avenida Roraima nº1000, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, CEP 97105-900.

⁽³⁾ Graduanda em Biologia, Universidade Federal de Sergipe. Av. Marechal Rondon, s/n, Cidade Universitária Prof. "José Aloísio de Campos", São Cristóvão, SE, CEP. 49100-000.

⁽⁴⁾ Doutorando no PPG de Agronomia – Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio Janeiro. BR 465, Km 07, Seropédica, RJ, CEP 23890-000.

⁽⁵⁾ Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia. BR 465, Km 07, Seropédica, RJ, CEP 23890-000.

⁽⁶⁾ Pesquisador da Embrapa Trigo. BR 285, Km 294, Passo Fundo, RS, CEP 99001-970.

Apoio financeiro: CNPq e FAPITEC.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Tabuleiros Costeiros em Aracaju-SE. A estirpe de *Herbaspirillum seropedicae* (Z67) utilizada neste estudo foi obtida da Coleção de Bactérias Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia.

As células foram ativadas em 10 mL de meio líquido DIGs, cuja formulação, em g L⁻¹ de água destilada, é a seguinte: glicose, 2,0; peptona, 1,5; extrato de levedura, 2,0; K₂HPO₄, 0,5; MgSO₄.7H₂O, 0,5; ácido glutâmico, 1,5; e ácido málico, 2,0. O pH foi ajustado para 6,0, utilizando-se solução 1 N de NaOH. A cultura foi incubada a 25°C por 72 h, quando a densidade ótica (DO_{450nm}) atingiu aproximadamente 0,6.

Dezoito herbicidas registrados para a cultura de cana-de-açúcar no Brasil (Tabela 1) foram avaliados quanto ao impacto sobre o crescimento de *H. seropedicae* em condições de laboratório. Soluções estoques dos herbicidas foram preparadas com água destilada e filtrada através de membranas Millipore com poros de 0,22 µm.

Os efeitos das doses comerciais dos herbicidas sobre os parâmetros de crescimento de *H. seropedicae* foram avaliados pelo monitoramento do crescimento celular por turbidimetria das culturas inoculadas em meio líquido DIGs misturados com os herbicidas e incubados por 55 h. Detalhes deste procedimento são descritos a seguir.

Um volume de 200 µL das soluções herbicidas filtradas foi adicionado a Erlenmeyers de 50 mL contendo 25 mL de meio líquido DIGs, de modo a atingir as concentrações comerciais recomendadas para cada produto (Tabela 1). Frascos controle receberam 200 µL de água destilada filtrada através de membrana Millipore. Os frascos foram inoculados com 40 µL de uma cultura de *H. seropedicae* ativa.

Após inoculação, os frascos foram rapidamente agitados e o conteúdo dos mesmos vertido em placas de petri (10 cm de diâmetro) estéreis. Alíquotas de 200 µL destas misturas foram transferidas para microplacas de 96 poços utilizando-se uma micropipeta de oito canais, de modo que cada coluna da placa (8 poços) recebesse um tratamento herbicida diferente. Em cada placa, uma das colunas de poços foi preenchida com meio DIGs estéril para verificar a possível ocorrência de contaminação da microplaca durante as leituras de DO ao longo do período dos ensaios. As placas foram incubadas a 32°C, no escuro, e as leituras de DO realizadas em intervalos regulares, em um leitor de microplacas, ajustado no comprimento de ondas de 450 nm. Com os resultados das leituras foram traçadas curvas de crescimento bacteriano durante o período de avaliação, para os diferentes tratamentos.

Resultados

Os tratamentos herbicidas amicarbazone, tebuthiuron, diruon, metribuzin, hexazinone + diuron,

hexazinone + clomazone, clomazone, isoxaflutole, sulfentrazone, imazapic, trifloxysulfuron sodium + ametryne, MSMA e 2,4-D não afetaram o crescimento da bactéria diazotrófica *H. seropedicae*, estirpe Z67, quando utilizados em concentração equivalente a dose comercial (Figura 1 e Tabela 2).

Os tratamentos contendo os herbicidas paraquat, imazapyr, ametryne, glyphosate e oxyfluorfen inibiram significativamente o crescimento de *H. seropedicae* (Figura 1 e Tabela 2), causando aumento no tempo de geração dessa diazotrófica.

Discussão

Testes *in vitro* mantêm o microrganismo exposto ao máximo ao produto fitossanitário, o que não ocorre em condições de campo, já que ocorrem fatores externos que agem sobre o produto, principalmente radiação solar, deriva e ventos, amenizando a ação do princípio ativo [7]. Dessa forma, espera-se que produtos considerados compatíveis nesse tipo de teste também o sejam quando aplicados em condições de campo. Para que os tratamentos herbicidas amicarbazone, tebuthiuron, diruon, metribuzin, hexazinone + diuron, hexazinone + clomazone, clomazone, isoxaflutole, sulfentrazone, imazapic, trifloxysulfuron sodium + ametryne, MSMA e 2,4-D possam ser considerados seletivos a *H. seropedicae*, necessita-se ainda a realização de ensaios avaliando a influência desses compostos na atividade da enzima nitrogenase, pois nos ensaios de crescimento o nitrogênio está presente no meio de cultura.

Os resultados desse trabalho já são suficientes para propor que os herbicidas paraquat, imazapyr, ametryne, glyphosate e oxyfluorfen sejam avaliados em nível de campo, já que a partir dos mesmos é possível afirmar que esses herbicidas são tóxicos a essa estirpe de *H. seropedicae*, mas não que essa toxicidade se refletirá em prejuízos à FBN, quando da utilização do inoculante na cultura da cana-de-açúcar. O paraquat e glyphosate são herbicidas utilizados na maioria das situações em jato dirigido, evitando-se o contato das gotas aspergidas com a parte aérea das plantas de cana-de-açúcar, mas em algumas situações o paraquat vem sendo utilizado em pós-emergência em doses mais baixas que a de registro, enquanto que o glyphosate vem sendo aplicado na cultura da cana-de-açúcar em subdose como regulador de crescimento, mas já próximo à colheita (fase de maturação). Imazapyr é utilizado comumente na destruição química das soqueiras de cana-de-açúcar, principalmente em áreas infestadas com *Cyperus rotundus* e *Cynodon dactylum*, quando da renovação do canavial, ou seja, é aplicado meses antes do novo plantio da cultura. Todavia, esse herbicida apresenta alta persistência no solo, podendo vir a ser absorvido pelas plantas de cana-de-açúcar e entrar em contato com as bactérias diazotróficas. Ametryne e oxyfluorfen podem apresentar riscos maiores a FBN, pois são aplicados após o plantio da cultura, no caso do oxyfluorfen em pré-emergência e no do ametryne em pré ou mesmo em pós-inicial.

Os resultados observados com os herbicidas ametryne, imazapyr e oxyfluorfen não foram regras a todos os

herbicidas que possuem mecanismos de ação similares, ou seja, a avaliação de toxicidade deve ser por produto e não pode ser extrapolada ao mecanismo de ação, ou mesmo ao grupo químico.

Conforme o “Working Group Pesticides and Beneficial Arthropods” do “International Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants (IOBC), West Palaearctic Regional Section (WPRS)”, os estudos de seletividade a organismos não-alvo devem ser conduzidos com as formulações comerciais [8], pois sabe-se que alguns adjuvantes reduzem a tensão superficial e facilitam a penetração do pesticida. Segundo Malkones [9], os aditivos presentes na formulação dos agroquímicos podem afetar os microrganismos e, em certos casos, até modificar o efeito do agroquímico. Para Kishinevsky et al. [10], é possível que solventes, surfatantes e agentes molhantes presentes nas formulações comerciais de herbicidas contribuam para os efeitos inibitórios desses produtos no crescimento de rizóbios. Berner et al. [11] mencionaram que aplicações de glyphosate, em formulações com ou sem surfactante, inibiram o crescimento micelial de *Calonectria crotalariae*. Por esse 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.

Conclusões

Os tratamentos herbicidas amicarbazone, tebuthiuron, diruon, metribuzin, hexazinone + diuron, hexazinone + clomazone, clomazone, isoxaflutole, sulfentrazone, imazapic, trifloxysulfuron sodium + ametryne, MSMA e 2,4-D não afetam o crescimento da bactéria diazotrófica *H. seropedicae*, estirpe Z67.

Os tratamentos contendo os herbicidas paraquat, imazapyr, ametryne, glyphosate e oxyfluorfen inibem o crescimento de *H. seropedicae*

Referências

- [1]MELLO, S.Q.S.; FRANÇA, A.F.S.; LIMA, M.L.M.; RIBEIRO, D.S.; MIYAGI, E.S. & REIS, J.G. 2006. Parâmetros do valor nutritivo de nove variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob irrigação. **Ciência Animal Brasileira**, 7: 373-380.
- [2]SUMAN, A.; SHRIVASTAVA, A.K.; GAUR, A.; SINGH, P.; SINGH, J. & YADAV, R.L. 2008. Nitrogen use efficiency of sugarcane in relation to its BNF potential and population of endophytic diazotrophs at different N levels. **Plant Growth Regul.**, 54: 1-11.
- [3]PRAMMANEE, P.; SAFFIGNA, P.G.; WOOD, A.W. Loss of nitrogen from urea and ammonium sulfate applied to sugar cane crop residues. In: AUSTRALIAN SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 11., Mackay, 1989. **Proceedings...** Mackay, Watson Ferguson, 1989. p.76-84.
- [4]DENMEAD, O.T.; FRENEY, J.R.; JACKSON, A.V.; SMITH, J.W.B; SAFFIGNA, P.G.; WOOD, A.W. & CHAPMAN, L.S. 1990. Volatilization of ammonia from urea and ammonium sulfate applied to sugarcane trash in North Queensland. **Proc. Austr. Soc. Sugar Cane Technol.**, 12: 72-78.
- [5]BODDEY, R.M.; POLIDORO, J.C.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R. & URQUIAGA, S. 2001. Use of ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to sugar cane and others grasses. **Austr. J. Agricult. Res.**, 28: 889-895.
- [6]ROYUELA, M.; GONZALEZ, A.; ARRESE-IGOR, C.; APARICIO-TEJO, P.M. & GONZALEZ-MURUA, C. 1998. Imazethapyr inhibition of acetolactate synthase in *Rhizobium* and its symbiosis with pea. **Pestic. Sci.**, 52: 372-380.
- [7]CAVALCANTI, R.S.; MOINO JR., A.; SOUZA G.C. & ARNOSTI, A. 2002. Efeito dos produtos fitossanitários fenpropatrina, imidacloprid, iprodione e tiametoxam sobre o desenvolvimento do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Arq. Inst. Biol.**, 69:17-22.
- [8]HASSAN, S.A. et al. A laboratory method to evaluate the side effects of plant protection products on *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hym., Trichogrammatidae). In: CANDOLFI, M.P. et al. (Eds.) **Guidelines to evaluate side-effects of plant protection products to non-target arthropods**. Reinheim: IOBC/ WPRS, 2000. p.107-119.
- [9]MALKONES, H.P. 2000. Comparison of the effects of differently formulated herbicides on soil microbial activities – a review. **J. Plant Dis. Protect.**, 8: 781-789.
- [10]KISHINEVSKY, B.; LOBEL, R.; LIFSHITZ, N. & GURFEL, D. 1988. Effects of some commercial herbicides on rhizobia and their symbiosis with peanuts. **Weed Res.**, 28: 291-296.
- [11]BERNER, D.K.; BERGGREN, G.T. & SNOW, J.P. 1991. Effects of glyphosate on *Calonectria crotalariae* and red crown rot of soybean. **Plant Disease**, 75: 809-813.

Tabela 1. Lista de herbicidas avaliados no presente estudo

Nome comum	Marca comercial	Dose (g ha ⁻¹)	Modo de ação
paraquat	Gramoxone 200 [®]	600	Inibição da fotossíntese no Fotossistema I
ametryne	Gesapax [®]	4.000	Inibição da fotossíntese no Fotossistema II
amicarbazone	Dinamic [®]	1.400	Inibição da fotossíntese no Fotossistema II
tebuthiuron	Spike 500 [®]	1.200	Inibição da fotossíntese no Fotossistema II
diuron	Herburon 500 BR [®]	3.200	Inibição da fotossíntese no Fotossistema II
metribuzin	Sencor 480 [®]	1.920	Inibição da fotossíntese no Fotossistema II
hexazinone + diuron	Velpar K WG [®]	396 + 1.404	Inibição da fotossíntese no Fotossistema II + Inibição da fotossíntese no Fotossistema II
hexazinone + clomazone	Discover 500 WP [®]	250 + 1.000	Inibição da fotossíntese no Fotossistema II + Inibição da biossíntese de carotenóides (local da rota desconhecido)
clomazone	Gamit [®]	1.100	Inibição da biossíntese de carotenóides (local da rota desconhecido)
isoxaflutole	Provence 750 WG [®]	262,5	Inibição da enzima 4-hidroxifenilpiruvato-dioxigenase (4-HPPD)
sulfentrazone	Boral 500 SC [®]	800	Inibição da enzima protoporfirinogênio oxidase (PPO)
oxyfluorfen	Goal BR [®]	1.200	Inibição da enzima protoporfirinogênio oxidase (PPO)
imazapic	Plateau [®]	245	Inibição da enzima acetolactato sintase (ALS)
imazapyr	Contain [®]	500	Inibição da enzima acetolactato sintase (ALS)
trifloxysulfuron sodium + ametryne	Krismat [®]	37 + 1.463	Inibição da enzima acetolactato sintase (ALS) + Inibição da fotossíntese no Fotossistema II
glyphosate	Roundup [®]	1.800	Inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSP sintase)
MSMA	MSMA Sanachem 720 SL [®]	2.880	Desconhecido
2,4-D	Aminol 806 [®]	1.005	Mimetizador de auxinas

Tabela 2. Equações de regressões expressando o crescimento da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*, mensurado pela densidade ótica (DO = 450 nm), em meio contendo diversos herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar

Tratamento herbicida	$\hat{Y}=y_0+a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$	R ²
testemunha	$\hat{Y}=0,0358+1,0756/(1+\exp(-(x-11,4073)/ 1,7722))$	0,99
metribuzin	$\hat{Y}=0,0495+1,0444/(1+\exp(-(x-10,8956)/ 1,3277))$	0,99
amicarbazone	$\hat{Y}=0,0405+1,0902/(1+\exp(-(x-11,0822)/ 1,3657))$	0,99
ametryne	$\hat{Y}=0,0175+0,8307/(1+\exp(-(x-14,3215)/ 4,9173))$	0,99
hexazinone + diuron	$\hat{Y}=0,0454+1,0502/(1+\exp(-(x-10,9671)/ 1,3162))$	0,99
diuron	$\hat{Y}=0,0412+1,0387/(1+\exp(-(x-11,4244)/ 1,5255))$	0,99
paraquat	$\hat{Y}=0,0249+0,4945/(1+\exp(-(x-11,6323)/ 2,7978))$	0,99
clomazone	$\hat{Y}=0,0474+1,0217/(1+\exp(-(x-11,2484)/ 1,4667))$	0,99
isoxaflutole	$\hat{Y}=0,0396+1,0969/(1+\exp(-(x-11,0967)/ 1,3828))$	0,99
tebuthiuron	$\hat{Y}=0,0408+1,0702/(1+\exp(-(x-11,1157)/ 1,5352))$	0,99
s-metolachlor	$\hat{Y}=0,0214+0,9315/(1+\exp(-(x-12,6171)/ 2,5876))$	0,99
sulfentrazone	$\hat{Y}=0,0384+1,0960/(1+\exp(-(x-11,1193)/ 1,4789))$	0,99
2,4-D	$\hat{Y}=0,0382+1,0666/(1+\exp(-(x-11,2129)/ 1,4909))$	0,99
oxyfluorfen	$\hat{Y}=0,0294+0,7317/(1+\exp(-(x-12,6557)/ 3,0406))$	0,99
imazapic	$\hat{Y}=0,0373+1,0920/(1+\exp(-(x-11,0640)/ 1,4564))$	0,99
trifloxysulfuron-sodium + ametryne	$\hat{Y}=0,0412+1,0937/(1+\exp(-(x-11,1985)/ 1,4493))$	0,99
imazapyr	$\hat{Y}=0,0334+0,6945/(1+\exp(-(x-13,1628)/ 2,8610))$	0,99
hexazinone + clomazone	$\hat{Y}=0,0406+1,0599/(1+\exp(-(x-11,1156)/ 1,4807))$	0,99
MSMA	$\hat{Y}=0,0406+1,0503/(1+\exp(-(x-11,0573)/ 1,4398))$	0,99
glyphosate	$\hat{Y}=0,0217+0,6882/(1+\exp(-(x-12,8957)/ 3,1325))$	0,99

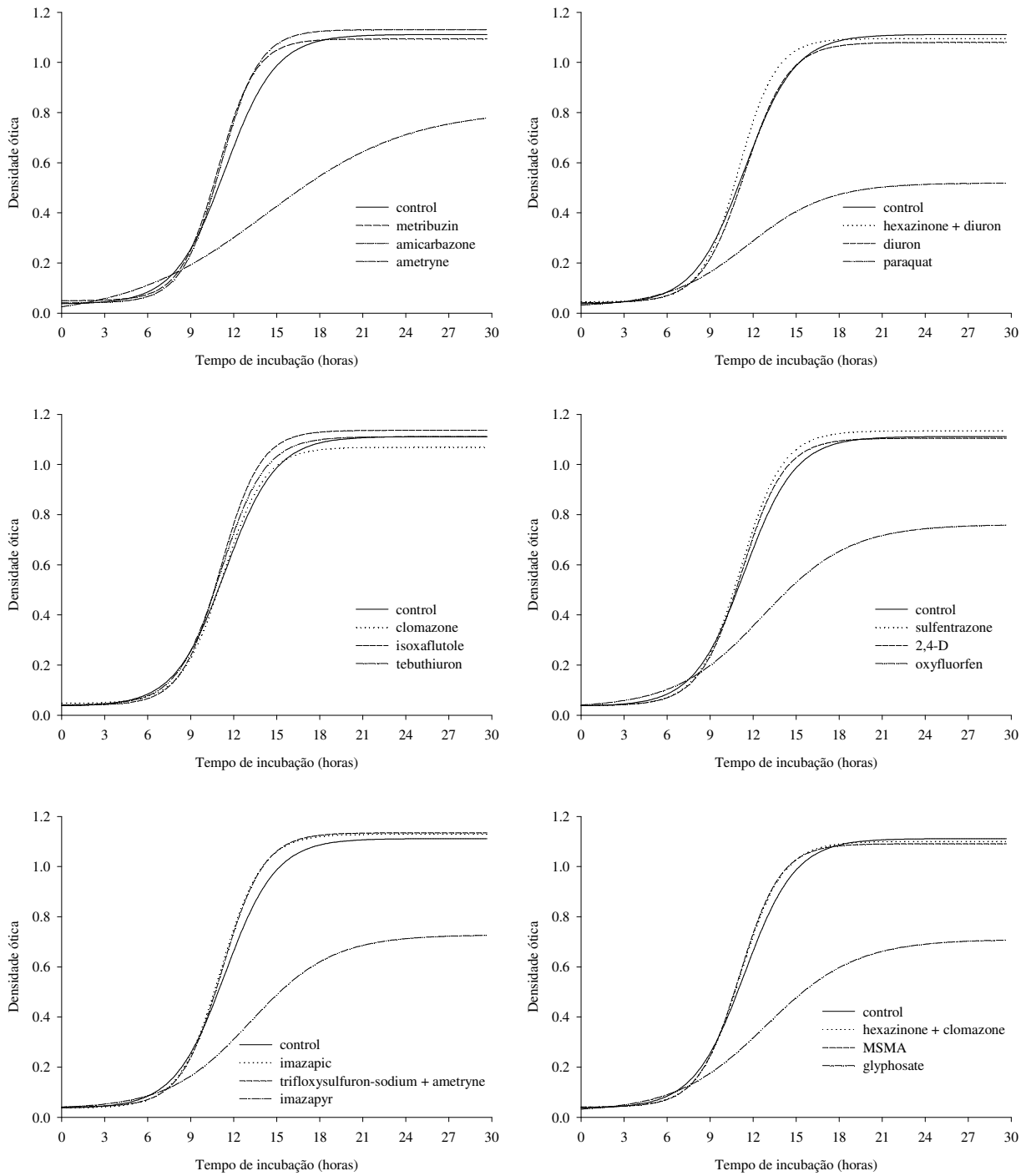


Figura 1. Crescimento da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*, mensurado pela densidade ótica (DO = 450 nm), em meio contendo diversos herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar.