

XXXII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo

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

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 *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL-5). 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 *G. diazotrophicus* em condições de laboratório. Os efeitos das doses comerciais dos herbicidas sobre os parâmetros de crescimento de *G. diazotrophicus* foram avaliados pelo monitoramento do crescimento celular por turbidimetria. Os tratamentos herbicidas ametryne, amicarbazone, metribuzin, hexazinone + diuron, hexazinone + clomazone, clomazone, isoxaflutole, sulfentrazone, oxyfluorfen, imazapic, imazapyr, trifloxysulfuron sodium + ametryne, s-metolachlor, glyphosate, MSMA e 2,4-D não afetaram o crescimento da bactéria diazotrófica *G. diazotrophicus*, quando utilizados em concentração equivalente à dose comercial. O tratamento contendo o herbicida diuron apresentou efeito bacteriostático. Paraquat demonstrou alta toxicidade à *G. diazotrophicus*, apresentando efeito bactericida.

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

Introdução

A cana-de-açúcar sempre teve um importante papel na atividade agrícola do Brasil, desde a sua introdução pelos holandeses. A agroenergia tem no etanol um dos seus principais componentes, e a cana-de-açúcar se mostra como a cultura que apresenta a melhor relação custo-benefício na produção do etanol.

A cana-de-açúcar extrai aproximadamente 205 kg de nitrogênio (N) a cada colheita de 100 t ha⁻¹ de colmos [1], sendo que para sustentar altos níveis de produtividade o N é introduzido anualmente com uma dose média de 150 kg ha⁻¹ nas soqueiras, via fertilizantes químicos.

Existe um consenso dentro da comunidade científica que a aplicação de grandes quantidades de fertilizantes químicos nitrogenados nos sistemas agrícolas gera perda de sustentabilidade desses ambientes [2]. Estima-se que menos de 50% do N contido nos fertilizantes químicos são efetivamente utilizados pelas culturas agrícolas [3,4].

As pesquisas envolvendo a problemática do N na cultura da cana-de-açúcar têm sido voltadas à melhoria de práticas agronômicas, principalmente ligadas às técnicas de aplicação dos fertilizantes nitrogenados [5,6] ou ao incremento da fixação biológica de N (FBN) pela associação da cultura com bactérias diazotróficas [7,8]. Algumas espécies de bactérias endofíticas capazes de fixar N atmosférico como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp., *Azospirillum amazonense*, *Burkholderia* spp. foram isoladas de colmos e raízes de plantas de cana-de-açúcar. Dentre essas espécies *Gluconacetobacter diazotrophicus* parece contribuir substancialmente para o suprimento de N na cana-de-açúcar [9,10].

Vários estudos mostram que os pesticidas podem apresentar toxicidade também a organismos não-alvos. Por exemplo, são comprovados casos de herbicidas sendo tóxicos a bactérias [11,12,13]. Nesse sentido, é importante para o sucesso da tecnologia de inoculação de bactérias diazotróficas que os pesticidas utilizados na cana-de-açúcar não apresentem efeitos bactericidas, bacteriostáticos ou mesmo prejudiquem a eficiência da FBN desses microrganismos.

Decorrente desse cenário o objetivo do trabalho foi identificar herbicidas utilizados na cultura da cana-de-

⁽¹⁾ Pesquisadores da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Av. Beira Mar, 3.250, Aracaju, SE, CEP. 49025-040.

⁽²⁾ Professor Adjunto do Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Maria. Avenida Roraima n°1000, 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. E-mail: daniaraujo03@gmail.com

⁽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.

açúcar que não afetam o crescimento da bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Tabuleiros Costeiros em Aracaju-SE. A estirpe de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAI-5) 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. 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 *G. diazotrophicus* 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 *G. diazotrophicus* foram avaliados pelo monitoramento do crescimento celular por turbidimetria das culturas inoculadas em meio líquido DIGs misturados com os herbicidas e incubados por 60 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 *G. diazotrophicus* ativa. Após inoculação, os frascos foram rapidamente agitados e o conteúdo dos mesmos vertido em placas de petri (10 cm de diâmetro) estéreis. Aliquotas 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 ametryne, amicarbazone, metribuzin, hexazinone + diuron, hexazinone + clomazone, clomazone, isoxaflutole, sulfentrazone, oxyfluorfen, imazapic, imazapyr, trifloxysulfuron sodium + ametryne, s-metolachlor, glyphosate, MSMA e 2,4-D não afetaram o crescimento da bactéria diazotrófica *G. diazotrophicus*, estirpe PAI-5, quando utilizados em concentração equivalente a dose comercial (Figura 1 e Tabela 2). O resultado verificado com o herbicida 2,4-D não está de acordo com o encontrado por Madhaiyan et al. [14], onde os autores observaram que esse herbicida reduziu em 50% o crescimento de *G. diazotrophicus*, quando foi adicionado ao meio na concentração de 22 mg L⁻¹.

O tratamento contendo o herbicida diuron apresentou atraso na duração da fase lag e aumento no tempo de geração de *G. diazotrophicus* (Figura 1 e Tabela 2), indicando a ocorrência de um efeito bacteriostático.

Paraquat demonstrou alta toxicidade à *G. diazotrophicus*, causando, praticamente, mortalidade completa das bactérias (Figura 1 e Tabela 2). Esses resultados mostram que o herbicida paraquat apresenta efeito bactericida sobre essa bactéria 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 [15]. Dessa forma, esperasse que produtos considerados compatíveis nesse tipo de teste também o sejam quando aplicados em condições de campo. Para que os tratamentos herbicidas ametryne, amicarbazone, metribuzin, hexazinone + diuron, hexazinone + clomazone, clomazone, isoxaflutole, sulfentrazone, oxyfluorfen, imazapic, imazapyr, trifloxysulfuron sodium + ametryne, s-metolachlor, glyphosate, MSMA e 2,4-D possam ser considerados seletivos a *G. diazotrophicus*, 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 o herbicida paraquat seja avaliado em nível de campo, pois a partir dos mesmos é possível afirmar que o paraquat é tóxico a essa estirpe de *G. diazotrophicus*, mas não que essa toxicidade se refletirá em prejuízos a FBN, quando da utilização do inoculante na cultura da cana-de-açúcar. O paraquat é um herbicida utilizado 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 ele vem sendo utilizado em pós-emergência em doses mais baixas que a de registro.

Para se sugerir que o diuron também seja avaliado em campo, seria recomendável primeiramente a avaliação de seus efeitos sobre a atividade nitrogenase de *G. diazotrophicus*, pois esse herbicida apresentou um efeito bacteriostático não tão pronunciado, o que pode não

resultar em prejuízo significativo a FBN em condições de campo. Esse resultado observado com o herbicida diuron não foi regra a todos os herbicidas que são inibidores da fotossíntese, atuando na interrupção do fluxo de elétrons no Fotossistema II, ou seja, a avaliação de toxicidade deve ser por produto e não pode ser extrapolada ao mecanismo de ação, ou mesmo ao grupo químico. Segundo Malkones [16], 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. [17], 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.

Conclusões

Os tratamentos herbicidas ametryne, amicarbazone, metribuzin, hexazinone + diuron, hexazinone + clomazone, clomazone, isoxaflutole, sulfentrazone, oxyfluorfen, imazapic, imazapyr, trifloxysulfuron sodium + ametryne, s-metolachlor, glyphosate, MSMA e 2,4-D não afetam o crescimento da bactéria diazotrófica *G. diazotrophicus*, estirpe PA1-5.

O tratamento contendo o herbicida diuron apresenta efeito bacteriostático a *G. diazotrophicus*, enquanto que o paraquat demonstra efeito bactericida.

Referências

- [1]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.
- [2]ROBINSON, N.; FLETCHER, A.; WHAN, A.; CRITCHLEY, C.; VON WIRÉN, N.; LAKSHMANAN, P. & SCHMIDT, S. 2007. Sugarcane genotypes differ in internal nitrogen use efficiency. **Functional Plant Biology**, 34: 1122-1129.
- [3]RAUN, W.R. & JOHNSON, V.G. Improving nitrogen use efficiency for cereal production. 1999. **Agronomy Journal**, 91: 357-363.
- [4]TILMAN, D.; CASSMAN, K.G.; MATSON, P.A.; NAYLOR, R. & POLASKY, S. 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, 418: 671-677.
- [5]KEATING, B.A.; VERBURG, K.; NUTH, N.I. & ROBERTSON, M.J. Nitrogen management in intensive agriculture: sugarcane in Australia. In: KEATING, B.A. & WILSON, J.R. (Eds.) **Intensive sugarcane production: meeting the challenges beyond 2000**. Wallingford: CAB International. 1997. p.103-124.
- [6]MEIER, E.A.; THORBURN, P.J.; WEGENER, M.K. & BASFORD, K.E. 2006. The availability of nitrogen from sugarcane trash on contrasting soils in the wet tropics of north Queensland. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, 75: 101-114.
- [7]BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D. & DOBEREINER, J. 2002. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, 29: 417-423.
- [8]HOEFSLOOT, G.; TERMORSHUIZEN, A.J.; WATT, D.A. & CRAMER, M.D. 2005. Biological nitrogen fixation is not a major contributor to the nitrogen demand of a commercially grown South African sugarcane cultivar. **Plant and Soil**, 277: 85-96.
- [9]JAMES, E.K.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.; BALDANI, J.I. & DOBEREINER, J. 1994. Infection of sugarcane by the nitrogen fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **J. Exp. Bot.**, 45: 757-766.
- [10]DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D. & REIS, V.M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J. & DE ZAMAROCZY, M. (Eds.) **Azospirillum VI and related microorganisms**. Berlin: Springer-Verlag. 1995. p.3-14.
- [11]HAAHTELA, K.; KILPI, S. & KARI, K. 1988. Effects of phenoxy acid herbicides and glyphosate on nitrogenase activity (acetylene reduction) in root-associated *Azospirillum*, *Enterobacter* and *Klebsiella*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 53: 123-127.
- [12]MARTINEZ-TOLEDO, M.V.; SALMERON, V. & GONZALEZ-LOPEZ, J. 1990. Metolachlor and the biological activity of *Azotobacter chroococcum*. **Soil Biol. Biochem.**, 22: 447-452.
- [13]SANTOS, J.B.; SILVA, A.A.; COSTA, M.D.; JAKELAITIS, A.; VIVIAN, R. & SANTOS, E.A. 2006. Ação de herbicidas sobre o crescimento de estirpes de *Rhizobium tropici*. **Planta Daninha**, 24: 457-465.
- [14]MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; HARI, K.; SARAVANAN, V.S. & SA, T. 2006. Influence of pesticides on the growth rate and plant-growth promoting traits of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Pesticides Biochemistry and Physiology**, 84:143-154.
- [15]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.
- [16]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.
- [17]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.

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
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-hidroxiifenilpiruvato-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
s-metolachlor	Dual Gold [®]	1.920	Inibição da divisão celular
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	Mimetização de auxinas

Tabela 2. Equações de regressões expressando o crescimento da bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus*, 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	$\hat{Y}=0.1027+0.8384/(1+\exp(-(x-39.6678)/4.4203))$	0.99
paraquat	$\hat{Y}=0.0800+0.0004x$	0.88
ametryne	$\hat{Y}=0.1038+0.8009/(1+\exp(-(x-40.2758)/4.2516))$	0.99
amicarbazone	$\hat{Y}=0.1109+0.8246/(1+\exp(-(x-39.7058)/4.2290))$	0.99
glyphosate	$\hat{Y}=0.1026+0.8583/(1+\exp(-(x-41.8283)/5.4919))$	0.99
sulfentrazone	$\hat{Y}=0.1063+0.8086/(1+\exp(-(x-40.3710)/5.1243))$	0.99
oxyfluorfen	$\hat{Y}=0.1068+0.8485/(1+\exp(-(x-40.5601)/5.1247))$	0.99
trifloxysulfuron-sodium + ametryne	$\hat{Y}=0.0963+0.8737/(1+\exp(-(x-41.3766)/4.8076))$	0.99
imazapic	$\hat{Y}=0.0952+0.8938/(1+\exp(-(x-42.1497)/5.2368))$	0.99
imazapyr	$\hat{Y}=0.0954+0.8261/(1+\exp(-(x-40.5560)/5.1658))$	0.99
MSMA	$\hat{Y}=0.1124+0.7480/(1+\exp(-(x-38.9018)/3.7587))$	0.99
2,4-D	$\hat{Y}=0.1107+0.7538/(1+\exp(-(x-38.7141)/3.8752))$	0.99
s-metolachlor	$\hat{Y}=0.1012+0.8246/(1+\exp(-(x-40.6212)/5.2201))$	0.99
clomazone	$\hat{Y}=0.1126+0.8457/(1+\exp(-(x-41.5643)/3.9246))$	0.99
isoxaflutole	$\hat{Y}=0.1109+0.8440/(1+\exp(-(x-39.9656)/4.5991))$	0.99
metribuzin	$\hat{Y}=0.1040+0.7818/(1+\exp(-(x-39.8472)/4.5364))$	0.99
hexazinone + diuron	$\hat{Y}=0.1016+0.8397/(1+\exp(-(x-39.5851)/4.4353))$	0.99
hexazinone + clomazone	$\hat{Y}=0.1100+0.8439/(1+\exp(-(x-38.7679)/4.0735))$	0.99
diuron	$\hat{Y}=0.1051+0.7585/(1+\exp(-(x-42.2125)/4.8653))$	0.99

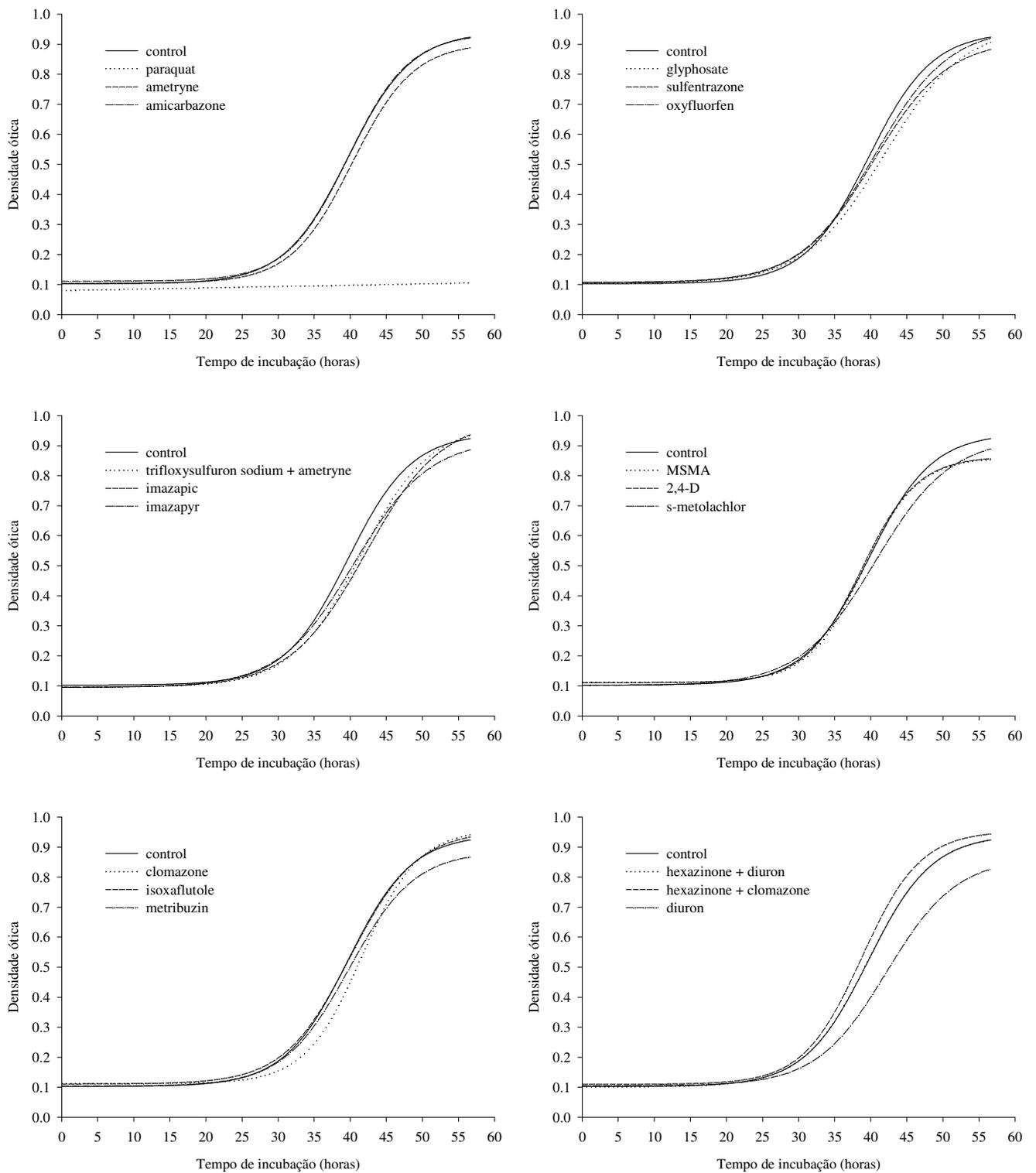


Figura 1. Crescimento da bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus*, mensurado pela densidade ótica (DO = 450 nm), em meio contendo diversos herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar.