

XXXII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo

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

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

RESUMO - Objetivou-se no trabalho identificar inseticidas 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. Cinco inseticidas 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 inseticidas sobre os parâmetros de crescimento de *H. seropedicae* foram avaliados pelo monitoramento do crescimento celular por turbidimetria. Os tratamentos inseticidas imidacloprid, fipronil e thiamethoxam não afetaram o crescimento de *H. seropedicae*, quando utilizados em concentração equivalente a dose comercial. Os tratamentos contendo os inseticidas endosulfan e carbofuran promoveram redução no crescimento de *H. seropedicae*. A dose do endosulfan que inibe o crescimento de *H. seropedicae* em 50% (CI₅₀) foi estimada em 6.620 g ha⁻¹ e do carbofuran em 5.639 g ha⁻¹.

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

Introdução

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e, em função da crescente demanda por etanol, a projeção é que a área cultivada com essa cultura no País aumente em mais de 50% até 2013. Todavia, incrementar a produtividade sob sistemas sustentáveis constitui-se em um grande desafio [1].

Apesar de a cana-de-açúcar responder à adubação nitrogenada, principalmente, na cana-soca, o uso de fontes minerais de N constitui-se em um dos fatores de maior impacto sobre o custo de produção da cana-de-açúcar. Recentemente, tem-se registrado um aumento acentuado e

contínuo no preço dos adubos nitrogenados, o qual está diretamente atrelado às consecutivas altas do petróleo no mercado internacional [2].

A capacidade de fixação biológica do N por bactérias associadas a plantas não-leguminosas, como a cana-de-açúcar, tem sido frequentemente relatada [3,4,5]. Experimentos mostram que, dependendo da cultivar de cana-de-açúcar, a quantidade de N fixado pode variar de 4 a 70% do total de N contido nas plantas [6,7,8,9]. Uma das espécies de bactérias diazotróficas que vem sendo estudadas com resultados extremamente promissores é a *Herbaspirillum seropedicae*. Essa bactéria endofítica é encontrada em grandes populações nos tecidos da cana-de-açúcar, sendo capaz de fixar N atmosférico em locais com altas concentrações de sacarose e pH variando de 5,3 a 8,0 [10,11,12].

O elevado uso de pesticidas na agricultura moderna pode causar efeitos indesejados sobre organismos não-alvo, incluindo microrganismos envolvidos no ciclo do nitrogênio, que são essenciais na manutenção da fertilidade do solo [13,14,15]. Um meio de se testar a toxicidade de pesticidas a bactérias é avaliando a inibição que esses compostos possam causar sobre o crescimento desses microrganismos [16].

O uso de moléculas inseticidas 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 e energia sem, no entanto, comprometer a sustentabilidade dos agroecossistemas. Decorrente desse cenário o objetivo do trabalho foi identificar inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar que não afetam o crescimento da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*.

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*

⁽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 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.

⁽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. Apoio financeiro: CNPq e FAPITEC.

(Z67) utilizada neste estudo foi obtida da Coleção de Bactérias Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia.

Preparo do inóculo

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.

*Efeito de doses comerciais de inseticidas sobre o crescimento de *Herbaspirillum seropedicae**

Cinco inseticidas 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 inseticidas 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 inseticidas e incubados por 55 h. Detalhes deste procedimento são descritos a seguir.

Um volume de 200 µL das soluções inseticidas 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. 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 inseticida 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.

Intensidade de inibição do crescimento por diferentes doses de inseticidas

Os inseticidas endosulfan e carbofuran cujas doses comerciais apresentaram efeitos significativos sobre o crescimento de *H. seropedicae*, foram posteriormente avaliados para determinação da concentração requerida para inibir 50% do crescimento bacteriano in vitro (CI₅₀).

Os procedimentos utilizados para esse ensaio foram os mesmos descritos acima, exceto que cinco doses destes inseticidas foram testadas (endosulfan - 0, 2.800, 5.600, 11.200 e 22.400 g ha⁻¹; carbofuran - 0, 825, 1.650, 3.300 e 6.600 g ha⁻¹).

As soluções estoques foram previamente diluídas em água destilada em diferentes proporções de modo que a adição de 800 µl destas soluções a 12,5 mL de meio de cultura líquido DIGs fosse suficiente para atingir as doses previamente estabelecidas para cada herbicida.

As microplacas foram incubadas por 9 h a 32°C no escuro, sendo a leitura da DO realizada ao final desse período.

Após a coleta e tabulação dos dados, foi realizada análise de regressão, avaliando o crescimento bacteriano com o incremento das doses dos inseticidas.

Resultados

Os tratamentos inseticidas imidacloprid, fipronil e thiamethoxam 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 inseticidas endosulfan e carbofuran promoveram redução no crescimento de *H. seropedicae* (Figura 1 e Tabela 2).

A dose do endosulfan que inibe o crescimento de *H. seropedicae* em 50% (CI₅₀) foi estimada em 6.620 g ha⁻¹ (Figura 2), sendo esta, mais que o dobro da dose recomendada desse produto. Em relação ao carbofuran a sua CI₅₀ foi calculada em 5.639 g ha⁻¹ (Figura 3), valor este que corresponde a uma dose maior que três vezes a recomendada para este inseticida.

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 [17]. 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 inseticidas imidacloprid, fipronil e thiamethoxam possam ser considerados seletivos a *H. seropedicae*, necessita-se ainda a realização de ensaios avaliando a influência desses compostos na atividade da enzima dinitrogenase, pois nos ensaios de crescimento o nitrogênio está presente no meio de cultura.

Para se sugerir que os inseticidas endosulfan e carbofuran sejam avaliados em campo, a fim de se avaliar se esses efeitos iniciais poderão refletir em prejuízos a FBN, quando da utilização do inoculante na cultura da cana-de-açúcar, seria recomendável primeiramente a

avaliação de seus efeitos sobre a atividade nitrogenase de *H. seropedicae*. Isso pelo fato de que esses inseticidas apresentaram uma redução no crescimento dessa diazotrófica não tão pronunciada, e também por o CI₅₀ dos compostos estarem acima das suas respectivas doses comerciais.

Observou-se que os dois inseticidas, imidacloprid e thiamethoxam, que são agonistas da acetilcolina, não reduziram o crescimento de *H. seropedicae*, fato que pode ser uma característica de compostos desse mecanismo de ação. Todavia, esse comportamento não foi constatado com os inseticidas agonistas do ácido gama-amino butírico (GABA), pois fipronil não apresentou qualquer efeito de intoxicação a *H. seropedicae*, enquanto que para o endossulfan esses efeitos foram verificados. Segundo Malkones [18], 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. [19], é possível que solventes, surfatantes e agentes molhantes presentes nas formulações comerciais de herbicidas contribuam para os efeitos inibitórios desses produtos sobre o crescimento de rizóbios, um outro grupo de bactérias fixadoras de N.

Conclusões

Os tratamentos inseticidas imidacloprid, fipronil e thiamethoxam não afetam o crescimento da bactéria diazotrófica *H. seropedicae*, estirpe PA1-5.

Os tratamentos contendo os inseticidas endossulfan e carbofuran reduzem o crescimento de *H. seropedicae*.

Referências

- [1]FNP Consultoria e Comércio. **Anuário estatístico**. Disponível em <http://www.fnp.com.br>. Acesso em 30/09/2008.
- [2]NOVAIS,R.F.; ALVAREZ, V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F., CANTARUTTI, R.B. & NEVES, J.C.L. **Fertilidade do solo**. Sociedade Brasileira da Ciência do Solo, 1º Edição, Viçosa-MG, 2007, 1017.p.
- [3]LI, R.P. & MacRAE, I.C. 1992. Isolation and identification of N₂-fixing enterobacteria associated with sugarcane in tropical Australia. **Journal of General and Applied Microbiology**, 38: 523-531.
- [4]BALOTA, E.L.; LOPES, E.S.; HUNGRIA, M. & DÖBEREINER, J. 1997. Inoculação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízico-arbusculares na cultura da mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 32: 627-639.
- [5]CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S. & DALMASTRI, C. 1998. Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp. on *Sorghum bicolor*: root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. **Soil Biology & Biochemistry**, 30: 81-87.

- [6]LIMA, E.; BODDEY, R.M. & DÖBEREINER, J. 1987. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ¹⁵N aided nitrogen balance. **Soil Biol. Biochem.**, 19: 165-170.
- [7]URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S. & BODDEY, R.M. 1992. Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: nitrogen 15 and nitrogen balance estimates. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, 56: 105-114.
- [8]YONEYAMA, T.; MURAOKA, T.; KIM, T.H.; DACANAY, E.V. & NAKANISHI, Y. 1997. The natural ¹⁵N abundance of sugarcane and neighboring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). **Plant and Soil**, 189: 239-244.
- [9]ASIS, C.A.; KUBOTA, M.; OHTA, H.; ARIMA, Y.; OHWAKI, Y.; YONEYAMA, T.; TSUCHIYA, K.; HAYASHI, N.; NAKANISHI, Y. & AKAO, S. 2002. Estimation of the nitrogen fixation by sugarcane cultivar NiF-8 using ¹⁵N dilution and natural ¹⁵N abundance techniques. **Soil Sci. Plant Nutr.**, 48: 283-285.
- [10]BALDANI, I.J.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L. & DOBEREINER, J. 1986. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen-fixing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 36: 86-93.
- [11]BODDEY, R.M.; OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D. & DOBEREINER, J. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, 174: 195-209.
- [12]OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. & DOBEREINER, J. 1996. Occurrence of endophytic diazotroph *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly in gramineae. **Biol. Fertil. Soils**, 21: 197-200.
- [13]ATLAS, R.M.; PRAMER, D. & BARTHA, R. 1978. Assessment of pesticides effects on non-target soil microorganisms. **Soil Biol. Biochem.**, 10: 231-239.
- [14]SIMON-SYLVESTRE, G. & FOURNIER, J.C. 1979. Effects of pesticides on the soil microflora. **Advanc. Agron.**, 31: 1-92.
- [15]DOMSCH, K.H.; JAGNOW, G. & ANDERSON, T.H. 1983. An ecological concept for the assessment of side-effects of agrochemicals on soil microorganisms. **Resid. Rev.**, 86: 65-105.
- [16]BITTON, G. & KOOPMAN, B. 1992. Bacterial and enzymatic bioassays for toxicity testing in the environment. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, 125: 1-22.
- [17]CAVALCANTI, R.S.; MOINO JR., A.; SOUZA G.C. & ARNOSTI, A. 2002. Efeito dos produtos fitossanitários fenpropratrina, imidacloprid, iprodione e tiametoxam sobre o desenvolvimento do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Arq. Inst. Biol.**, 69:17-22.
- [18]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.
- [19]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 inseticidas avaliados no presente estudo.

Nome comum	Marca comercial	Dose (g ha ⁻¹)	Modo de ação
imidacloprid	Actara 250 WG	250	Agonista da acetilcolina
fipronil	Regent 800 WG	400	Agonista do ácido gama-amino butírico (GABA)
thiamethoxam	Evidence	480	Agonista da acetilcolina
endosulfan	Dissulfan EC	2.800	Agonista do ácido gama-amino butírico (GABA)
carbofuran	Furadan 350 SC	1.650	Inibidor da acetilcolina esterase

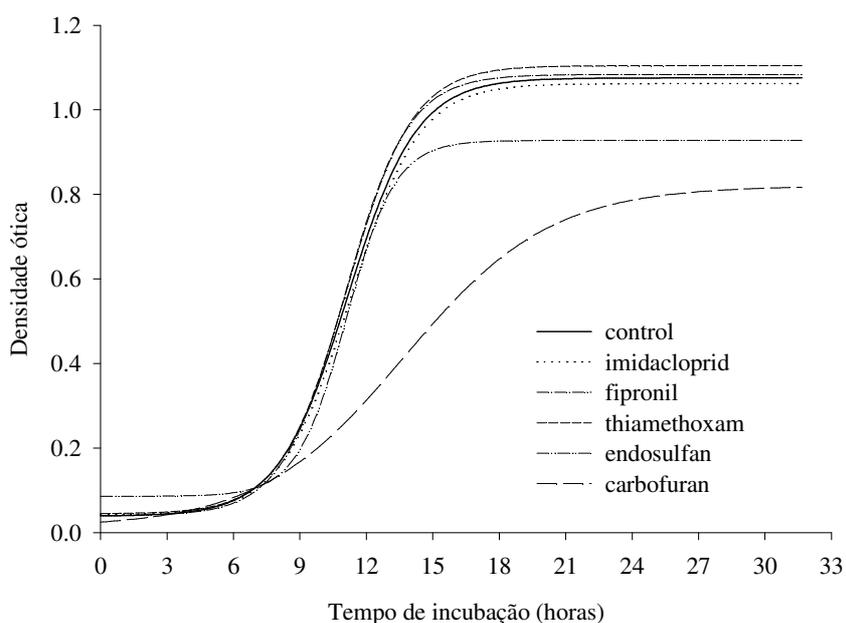


Figura 1. Crescimento da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*, mensurado pela densidade ótica (DO = 450 nm), em meio contendo cinco inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar.

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

Inseticida	$\hat{Y} = y_0 + a / (1 + \exp(-(x - x_0) / b))$	R ²
testemunha	$\hat{Y} = 0,0387 + 1,0367 / (1 + \exp(-(x - 11,1471) / 1,5638))$	0,99
imidacloprid	$\hat{Y} = 0,0422 + 1,0198 / (1 + \exp(-(x - 11,2548) / 1,5453))$	0,99
fipronil	$\hat{Y} = 0,0398 + 1,0437 / (1 + \exp(-(x - 11,0258) / 1,4284))$	0,99
thiamethoxam	$\hat{Y} = 0,0442 + 1,0602 / (1 + \exp(-(x - 11,1161) / 1,4888))$	0,99
endosulfan	$\hat{Y} = 0,0857 + 0,8420 / (1 + \exp(-(x - 11,0995) / 1,1095))$	0,99
carbofuran	$\hat{Y} = 0,0125 + 0,8077 / (1 + \exp(-(x - 13,7297) / 3,2908))$	0,99

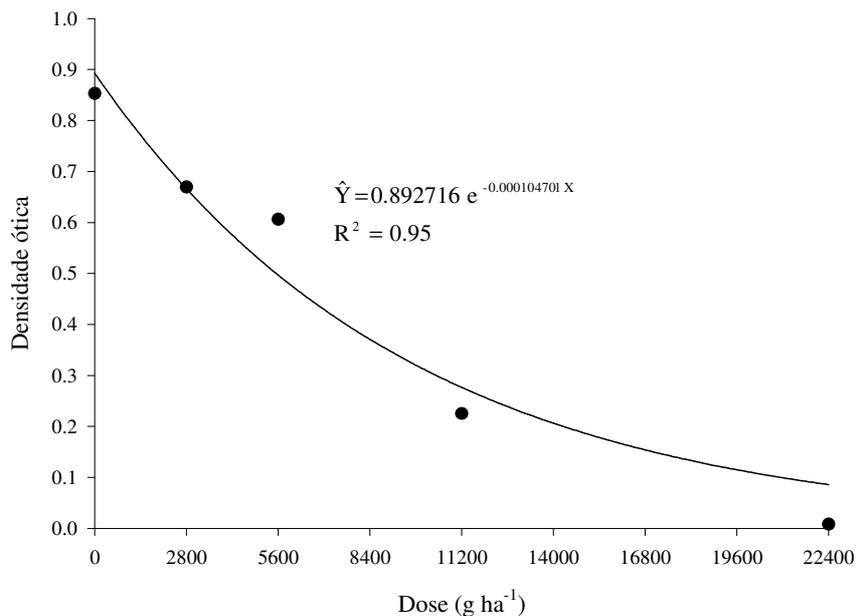


Figura 2. Crescimento da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*, mensurado pela densidade ótica (DO = 450 nm), em meio de cultura contendo doses crescentes do inseticida endossulfan. Dose que inibe o crescimento da bactéria em 50% = 6.620 g ha⁻¹.

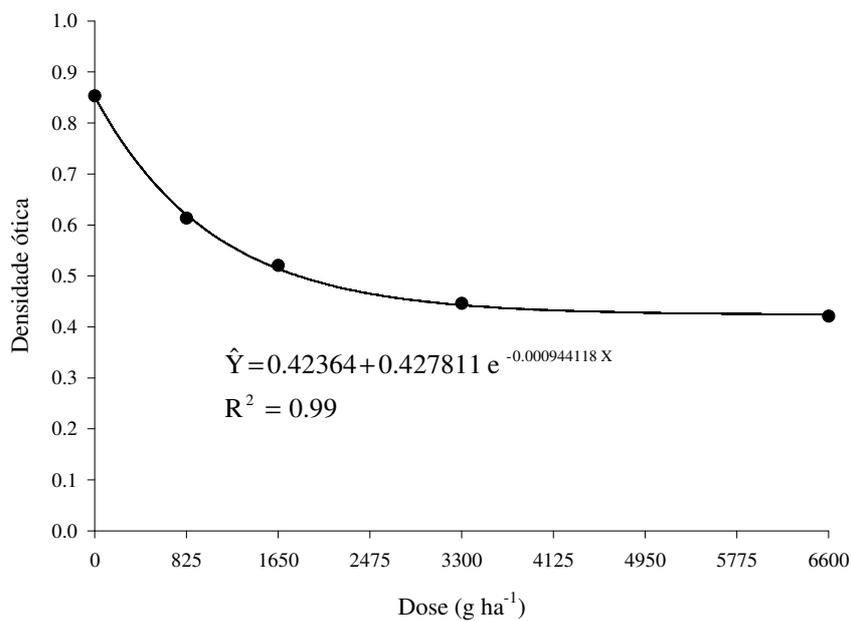


Figura 3. Crescimento da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*, mensurado pela densidade ótica (DO = 450 nm), em meio de cultura contendo doses crescentes do inseticida carbofuran. Dose que inibe o crescimento da bactéria em 50% = 5.639 g ha⁻¹.