

# XXXII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo

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

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

**RESUMO** - Objetivou-se no trabalho identificar inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar que não afetam o crescimento da bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAI-5). 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 *G. diazotrophicus* em condições de laboratório. Os efeitos das doses comerciais dos inseticidas sobre os parâmetros de crescimento de *G. diazotrophicus* foram avaliados pelo monitoramento do crescimento celular por turbidimetria. Os tratamentos inseticidas imidacloprid, fipronil e thiamethoxam não afetaram o crescimento da bactéria diazotrófica *G. diazotrophicus*, quando utilizados em concentração equivalente a dose comercial. Os tratamentos contendo os inseticidas endosulfan e carbofuran promoveram atraso na duração da fase lag e aumento no tempo de geração de *G. diazotrophicus*, indicando a ocorrência de um efeito bacteriostático. A dose do endosulfan que inibe o crescimento de *G. diazotrophicus* em 50% (CI<sub>50</sub>) foi estimada em 3.117 g ha<sup>-1</sup>. Em relação ao carbofuran a CI<sub>50</sub> foi calculada em 11.341 g ha<sup>-1</sup>.

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

### Introdução

O suprimento de nitrogênio vem assumindo um papel de extrema importância para a sustentabilidade da agricultura, devido ao crescente aumento da demanda e ao incremento significativo no preço dos fertilizantes químicos nitrogenados, adicionando-se ainda toda ênfase na poluição ambiental [1].

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância comercial que demanda significativas quantidades de nitrogênio e potássio [2].

As pesquisas envolvendo a problemática do N na cultura da cana-de-açúcar têm sido voltadas à melhoria de práticas agrônomicas, principalmente ligadas às técnicas de aplicação dos fertilizantes nitrogenados ou ao incremento da fixação biológica de N (FBN) pela associação da cultura com bactérias diazotróficas [3,4]. De acordo com quantificações pelos métodos do balanço e da abundância natural de isótopos de <sup>15</sup>N, a contribuição da FBN para a nutrição nitrogenada de diversas variedades de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil pode ser superior a 60% [5,6]. 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.

Além de fixar nitrogênio atmosférico, *Gluconacetobacter diazotrophicus* [7] produz hormônios de crescimento, como o ácido indol acético (AIA) [8], é tolerante a vários antibióticos, como estreptomicina, tetraciclina e rifampicina [9], e possui atividade antagonista a *Xanthomonas albilineans* [10] e ao fungo *Colletotrichum falcatum* [11]. *G. diazotrophicus* pode ainda produzir ácidos capazes de solubilizar fosfatos e zinco presentes no solo em formas insolúveis [9,12].

Os agroquímicos são amplamente utilizados para a proteção das plantas, permitindo que as culturas expressem seus potenciais produtivos [13]. Contudo, Pham et al. [14] afirmam que os pesticidas podem causar estresses específicos em células bacterianas como alterações no DNA, inibição na produção de proteínas, danos oxidativos e destruição de membranas.

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

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

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

<sup>(3)</sup> 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

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

<sup>(5)</sup> Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia. BR 465, Km 07, Seropédica, RJ, CEP 23890-000. Apoio financeiro: CNPq e FAPITEC.

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

## Material e Métodos

Os experimentos foram realizados 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.

### Preparo do inóculo

As células foram ativadas em 10 mL de meio líquido DIGs, cuja formulação, em g L<sup>-1</sup> de água destilada, é a seguinte: glicose, 2,0; peptona, 1,5; extrato de levedura, 2,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 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<sub>450nm</sub>) atingiu aproximadamente 0,6.

### Efeito de doses comerciais de inseticidas sobre o crescimento de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Cinco inseticidas 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 inseticidas 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 *G. diazotrophicus* foram avaliados pelo monitoramento do crescimento celular por turbidimetria das culturas inoculadas em meio líquido DIGs misturados com os inseticidas e incubados por 60 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 *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. 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 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 efeito significativo sobre o crescimento de *G. diazotrophicus*, foram posteriormente avaliados para determinação das concentrações requeridas para inibir 50% do crescimento bacteriano in vitro (CI<sub>50</sub>).

Os procedimentos utilizados para esse ensaio foram os mesmos descritos acima, exceto que cinco doses destes inseticidas foram testadas (endosulfan - 0, 1.400, 2.800, 5.600 e 11.200 g ha<sup>-1</sup>; carbofuran - 0, 1.650, 3.300, 6.600 e 13.200 g ha<sup>-1</sup>).

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 inseticida.

As microplacas foram incubadas por 40 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 *G. diazotrophicus*, estirpe PAI-5, quando utilizados em concentração equivalente a dose comercial (Figura 1 e Tabela 2).

Os tratamentos contendo os inseticidas endosulfan e carbofuran promoveram 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.

A dose do endosulfan que inibe o crescimento de *G. diazotrophicus* em 50% (CI<sub>50</sub>) foi estimada em 3.117 g ha<sup>-1</sup> (Figura 2), sendo esta, aproximadamente, 10% superior à dose recomendada desse produto. Em relação ao carbofuran a CI<sub>50</sub> foi calculada em 11.341 g ha<sup>-1</sup> (Figura 3), valor este que corresponde, aproximadamente, a uma dose quase sete vezes maior que 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 [15]. 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 *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.

Para se sugerir que os inseticidas endossulfan 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 *G. diazotrophicus*. Isso pelo fato de que esses inseticidas apresentaram um efeito bacteriostático não tão pronunciado, e também por o  $CI_{50}$  dos compostos estarem acima das suas respectivas doses comerciais, principalmente em relação ao carbofuran.

Observou-se que os dois inseticidas, imidacloprid e thiamethoxam, que são agonistas da acetilcolina, não reduziram o crescimento de *G. diazotrophicus*, 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 *G. diazotrophicus*, enquanto que endossulfan foi o mais tóxico entre os compostos avaliados. 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, um outro grupo de bactérias fixadoras de N.

## Conclusões

Os tratamentos inseticidas imidacloprid, fipronil e thiamethoxam não afetam o crescimento da bactéria diazotrófica *G. diazotrophicus*, estirpe PAI-5.

Os tratamentos contendo os inseticidas endossulfan e carbofuran apresentam efeito bacteriostático a *G. diazotrophicus*.

## Referências

[1]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.

- [2]WOOD, R.A. 1990. The roles of nitrogen, phosphorous and potassium in the production of sugarcane in South Africa. **Fert. Res.**, 26: 89-98.
- [3]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.
- [4]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.
- [5]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.
- [6]YONEYAMA, T.; MURAOKA, T.; KIM, T.H.; DACANAY, E.V. & NAKANISHI, Y. 1997. The natural  $^{15}N$  abundance of sugarcane and neighboring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). **Plant and Soil**, 189: 239-244.
- [7]CAVALCANTE, V.A. & DOBEREINER, J. 1988. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, 108: 23-31.
- [8]FUENTES-RAMÍREZ, L.E.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I.R. & CABALERO-MELLADO, J. 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, an indole-acetic producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, 154: 145-150.
- [9]MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; SESHADRI, S. & LAKSHMINARASIMHAN, C. 2002. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. **Current Science**, 83: 137-145.
- [10]PIÑÓN, D.; CASAS, M.; BLANCH, M.; FONTANIELLA, B.; BLANCO, Y.; VICENTE, C.; SOLAS, M.T. & LEGAZ, M.E. 2002. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. **Research in Microbiology**, 153: 345-351.
- [11]MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; VADIVELU, M. Antagonistic potential of  $N_2$ -fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went.: a causal organism of red-rot of sugarcane. **Current Science**, v.78, p.1063-1065, 2000.
- [12]MADHAIYAN, M.; SARAVANAN, V.S.; BHAKIYA, S.S.J.D.; LEE, H.S.; THENMOZHI, R.; HARI, K. & SA, T.M. 2004. Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. **Microbiol. Res.**, 159: 233-243.
- [13]KANUNGO, P.K.; ADHYA, T.K. & RAO, V.R. 1995. Influence of repeated application of carbofuran on nitrogenase activity and nitrogen fixing bacteria associated with rhizosphere of tropical rice. **Chemosphere**, 31: 3249-3257.
- [14]PHAM, C.H.; MIN, J. & GU, M.B. 2004. Pesticide induced toxicity and stress response in bacterial cells. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 72: 380-386.
- [15]CAVALCANTI, R.S.; MOINO JR., A.; SOUZA G.C. & ARNOSTI, A. 2002. Efeito dos produtos fitossanitários fenpropatrina, imidacloprid, iprodione e tiameoxam 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 inseticidas avaliados no presente estudo.

Nome comum	Marca comercial	Dose (g ha <sup>-1</sup> )	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

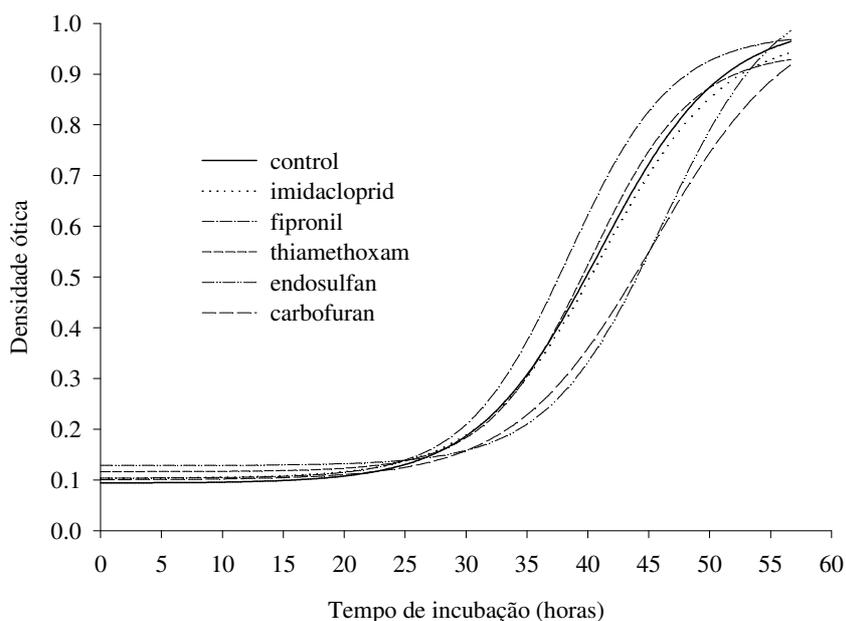


Figura 1. Crescimento da bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus*, mensurado pela densidade ótica (DO = 450 nm), em meio contendo cinco inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar.

Tabela 2. Equações de regressões expressando o crescimento da bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus*, 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 <sup>2</sup>
testemunha	$\hat{Y}=0.0937+0.9083/(1+\exp(-(x-40.9210)/ 5.0255))$	0,99
imidacloprid	$\hat{Y}=0.1036+0.8768/(1+\exp(-(x-41.1440)/ 5.0008))$	0,99
fipronil	$\hat{Y}=0.1037+0.8761/(1+\exp(-(x-38.4354)/ 4.2391))$	0,99
thiamethoxam	$\hat{Y}=0.1164+0.8276/(1+\exp(-(x-40.1377)/ 4.1660))$	0,99
endosulfan	$\hat{Y}=0.1284+0.9474/(1+\exp(-(x-46.0810)/ 4.6910))$	0,99
carbofuran	$\hat{Y}=0.1001+0.9298/(1+\exp(-(x-45.3907)/ 5.6672))$	0,99

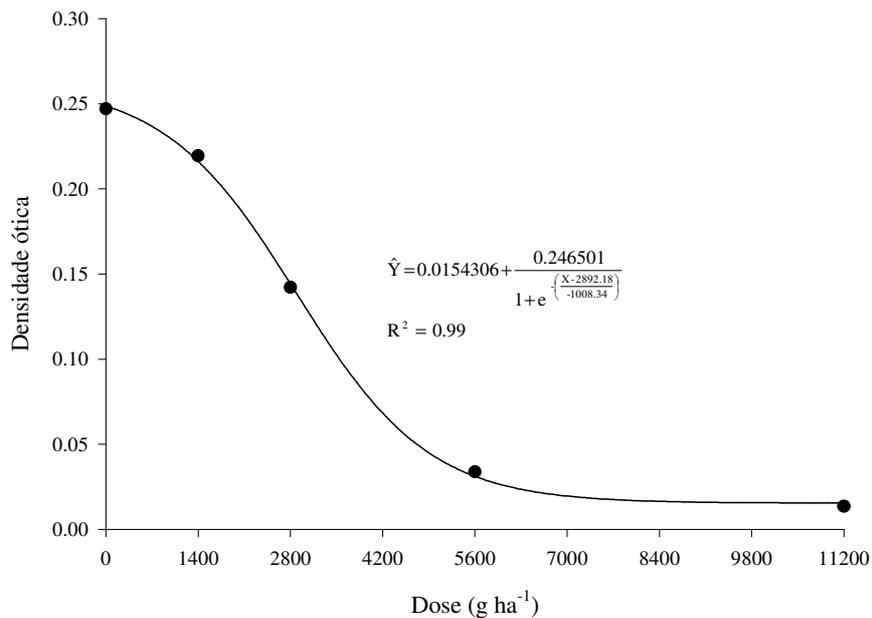


Figura 2. Crescimento da bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus*, mensurado pela densidade ótica (DO = 450 nm), em meio de cultura contendo doses crescentes do inseticida endossulfan. Dose que inibe o crescimento da bactéria em 50% = 3.117 g ha<sup>-1</sup>.

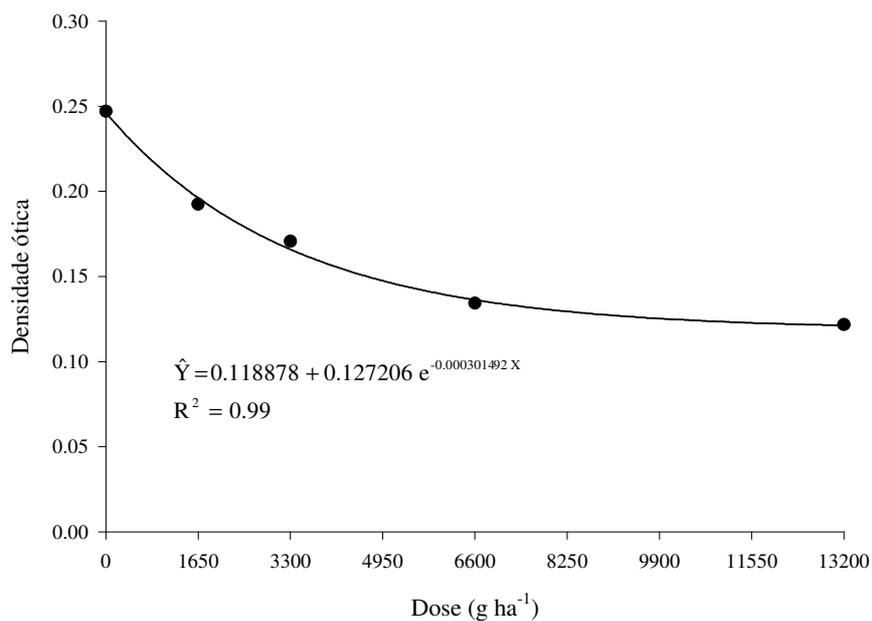


Figura 3. Crescimento da bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus*, mensurado pela densidade ótica (DO = 450 nm), em meio de cultura contendo doses crescentes do inseticida carbofuran. Dose que inibe o crescimento da bactéria em 50% = 11.341 g ha<sup>-1</sup>.