



XXIX Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas
XIII Reunião Brasileira sobre Micorrizas
XI Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo
VIII Reunião Brasileira de Biologia do Solo
Guarapari – ES, Brasil, 13 a 17 de setembro de 2010.
Centro de Convenções do SESC

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

Daniele Araújo Teles⁽¹⁾; Marcelo Ferreira Fernandes⁽²⁾; Sergio de Oliveira Procópio⁽³⁾; Alberto Cargnelutti Filho⁽⁴⁾ & Selenobaldo Alexinaldo Cabral de Sant'Anna⁽⁵⁾

(1) Discente do Curso de Biologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, CEP: 49100-000, daniaraujo03@gmail.com; (2) Pesquisador, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, CEP: 49025-040 marcelo@cpatc.embrapa.br (apresentador do trabalho); (3) Pesquisador, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, CEP: 49025-040- Bolsista CNPq – procopio@cpatc.embrapa.br; (4) Professor, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, CEP: 97105-900, cargnelutti@ufrgs.br; (5) Doutorando, PPG de Agronomia – Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, CEP: 23890-000, selenobaldo@yahoo.com.br

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar sobre o crescimento in vitro da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* (Z 67). Cinco inseticidas (imidacloprid, thiamethoxam, fipronil, endosulfan, carbofuran) foram testados em suas doses comerciais quanto ao impacto na duração da fase lag, tempo de geração e densidade celular máxima, calculados a partir de dados de densidade óptica, obtidos em intervalos regulares, durante a incubação de culturas em meio DIGs líquido por 33 h (32°C). Foram utilizadas oito repetições. Os tratamentos com inseticidas foram comparados ao controle pelo teste de Dunnett. A densidade celular máxima para todos os tratamentos foi obtida entre 15 e 20 h. Apenas endosulfan e carbofuran reduziram a densidade celular máxima. A fase lag foi aumentada na presença de endosulfan. O tempo de geração na presença de carbofuran foi aumentado para 1,06 h, comparativamente a 0,84 h no controle. Sugere-se que endosulfan e carbofuran reduzam o coeficiente de rendimento de *H. seropedicae*, sendo este efeito derivado do custo energético para manutenção de mecanismos que conferem tolerância relativa da bactéria a estes inseticidas.

Palavras-chave: *Saccharum* spp.; fixação biológica do nitrogênio; tempo de geração.

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 (FNP Consultoria & Comércio, 2008).

A capacidade de fixação biológica do N por bactérias associadas a plantas não-leguminosas tem sido freqüentemente relatada (Balota et al., 1997; Chiarini et al., 1998). Diversas espécies de bactérias têm sido isoladas da rizosfera e de órgãos aéreos de diferentes culturas, apresentado crescimento abundante em meio de cultura livre de N, indicando possuírem capacidade de fixação biológica desse elemento. Entre estas bactérias, Enterobacteriaceae dos gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter*, bem como outras bactérias gram-negativas, como *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Alcaligenes*, foram observadas na rizosfera ou na parte aérea de diversas culturas (Engelhard et al., 2000; Reis et al., 2000). Dependendo da cultivar de cana-de-açúcar, a quantidade de N fixado pode variar de 4 a 70% do N das plantas (Asis et al., 2002).

Uma das espécies de bactérias diazotróficas que vêm sendo estudadas com resultados 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 sob altas concentrações de sacarose e pH variando de 5,3 a 8,0 (Olivares et al., 1996).

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 (Domsch et al., 1983). O inseticida monochrotophos inibiu em 44 e 46% a atividade nitrogenase das bactérias

Rhodobacter spheroids e *Rhodopseudomonas palustris* (Chalam et al., 1997).

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.

O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos de inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar sobre parâmetros de 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* (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; ácido málico, 2,0; peptona, 1,5; extrato de levedura, 2,0; K₂HPO₄, 0,5; MgSO₄.7H₂O, 0,5; e ácido glutâmico, 1,5, pH 6,0. A cultura foi incubada a 32°C por 24 h, quando a densidade ótica (DO_{450nm}) atingiu aproximadamente 0,7.

Cinco inseticidas registrados para a cultura de cana-de-açúcar no Brasil foram avaliados (Tabela 1) quanto ao impacto sobre o crescimento de *H. seropedicae* em laboratório. Soluções estoques dos herbicidas foram preparadas com água destilada e filtradas através de membranas Millipore® com poros de 0,22 • m. As concentrações dos herbicidas nas soluções estoques foram determinadas de modo que a adição de 200 • L destas ao volume final de meio de cultura utilizado nos diferentes ensaios resultasse nas concentrações previamente estabelecidas para cada tratamento.

O efeito de doses comerciais dos inseticidas sobre os parâmetros de crescimento de *H. seropedicae* foi avaliado pelo monitoramento do crescimento celular por turbidimetria das culturas inoculadas em meio líquido DIGs misturados com os herbicidas e incubados por 33 h. Detalhes deste procedimento são descritos a seguir. Um volume de 200 • L 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 • L de água destilada filtrada através de membrana Millipore. Os frascos foram inoculados com 40 • L de uma cultura de *H. seropedicae* ativa (DO_{450nm} = 0,6). Após inoculação, alíquotas de 200 • L destas misturas foram transferidas para microplacas de 96 poços, de modo que cada coluna da placa (8 poços) recebesse

um tratamento herbicida diferente. Uma das colunas de poços foi preenchida com meio DIGs estéril para verificar a possível ocorrência de contaminação da microplaca durante os ensaios. As placas foram incubadas a 32°C, no escuro, e as leituras realizadas em intervalos regulares em um leitor de microplacas no comprimento de ondas de 450 nm. O comprimento da fase lag foi estimado como o tempo no qual o ln (DO) da fase lag equivaleu à média do ln (DO) das três primeiras leituras de DO, quando as células encontravam-se indubitavelmente em fase lag. Matematicamente, o comprimento da fase lag (t_{lag}) foi calculado de acordo com a seguinte equação: t_{lag} = [(ln OD_{lag}) - a]/b, onde ln OD_{lag} corresponde ao ln da média das três primeiras leituras de DO, e “a” e “b” ao intercepto e à inclinação da equação ajustada para o ln de DO na fase log em função do tempo de incubação. O tempo de geração (g) de *H. seropedicae* exposta aos diferentes herbicidas foi calculado após transformação dos dados de DO em ln (DO). Para estes cálculos um mínimo de cinco leituras de DO, tomadas do meio da fase log, foram consideradas. Os valores de g e t_{lag} foram estimados para cada uma das oito repetições separadamente. As médias de cada tratamento herbicida foram comparadas à do tratamento controle pelo teste de Dunnett.

RESULTADOS E DISCUSSÃO - Embora a avaliação de crescimento tenha sido realizada por 33 h de incubação, o crescimento final máximo de *H. seropedicae*, medido pela densidade ótica máxima (DO máxima) a 450 nm, foi atingido entre 15 e 20 h, para todos os tratamentos. Este crescimento foi reduzido por apenas dois dos cinco inseticidas testados na dose comercial: endosulfan e carbofuran (Figura 1). Três mecanismos potencialmente associados a esses decréscimos na DO máxima foram antevistos: (i) aumento da duração da fase lag, (ii) aumento do tempo de geração e (iii) redução da eficiência de utilização de C e energia do meio de cultura para o crescimento bacteriano. Destes mecanismos, os dois primeiros foram testados pela estimativa do tempo de duração da fase lag e do tempo de geração. Endosulfan resultou em um aumento da fase lag de cerca de 2 h. Ao contrário do esperado, o carbofuran reduziu a fase lag em cerca de 1 h, comparativamente ao controle sem inseticida (Figura 2). O inseticida carbofuran reduziu a velocidade de crescimento de *H. seropedicae*, o que foi evidenciado pelo aumento do tempo de geração desta bactéria para 1,06 h (Figura 3). Comparativamente, o tempo de geração médio para *H. seropedicae* em meio DIGs sem adição de herbicidas foi de 0,84 h.

É importante observar que os valores de DO máximo dos tratamentos endosulfan e carbofuran

não se igualaram aos máximos observados no tratamento controle, mesmo após um período prolongado de incubação. Isto indica que os recursos disponíveis no meio de cultura foram menos eficientemente usados para o crescimento bacteriano (menor coeficiente de rendimento) na presença destes inseticidas do que nos demais tratamentos. Sugere-se que o menor coeficiente de rendimento de *H. seropedicae* na presença de endosulfan e carbofuran seja derivado do custo energético requerido para manutenção de mecanismos metabólicos que conferem esta tolerância relativa da bactéria a estes compostos. Os demais inseticidas não apresentaram nenhum efeito significativo sobre os parâmetros de crescimento.

CONCLUSÕES – Os inseticidas carbofuran e endosulfan, em suas doses comerciais, reduzem o crescimento da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* em meio de cultura. No caso do carbofuran, este menor crescimento está associado ao aumento no tempo de geração da bactéria.

REFERÊNCIAS

ASIS, C.A.; KUBOTA, M.; OHTA, H.; ARIMA, Y.; OHWAKI, Y.; YONEYAMA, T.; TSUCHIYA, K.; HAYASHI, N.; NAKANISHI, Y. & AKAO, S. 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, 2002.

BALOTA, E.L.; LOPES, E.S.; HUNGRIA, M. & DÖBEREINER, J. Inoculação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízico-arbusculares na cultura da mandioca. **Pesq. Agropecu. Bras.**, 32:627-639, 1997.

CHALAM, A.V.; SASIKALA, C.; RAMANA, C.V.; UMA, N.R. & RAO, P.R. Effect of pesticides on the diazotrophic growth and nitrogenase activity of purple nonsulfur bacteria. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 58:463- 468, 1997.

CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S. & DALMASTRI, C. Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp. on *Sorghum bicolor*: root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. **Soil Biol. Biochem.**, 30:81-87, 1998.

DOMSCH, K.H.; JAGNOW, G. & ANDERSON, T.H. An ecological concept for the assessment of side-effects of agrochemicals on soil microorganisms. **Resid. Rev.**, 86:65-105, 1983.

ENGELHARD, M.; HUREK, T. & REINHOLD-HUREK, B. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. **Environ. Microbiol.**, 2:131-141, 2000.

FNP Consultoria e Comércio. **Anuário estatístico**. Disponível em <http://www.fnp.com.br>. Acesso em 30/09/2008.

OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. & DOBEREINER, J. Occurrence of endophytic diazotroph *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly in gramineae. **Biol. Fertil. Soils**, 21:197–200, 1996.

REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. & DOBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Crit. Rev. Plant Sci.**, 19:227-247, 2000.

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 |

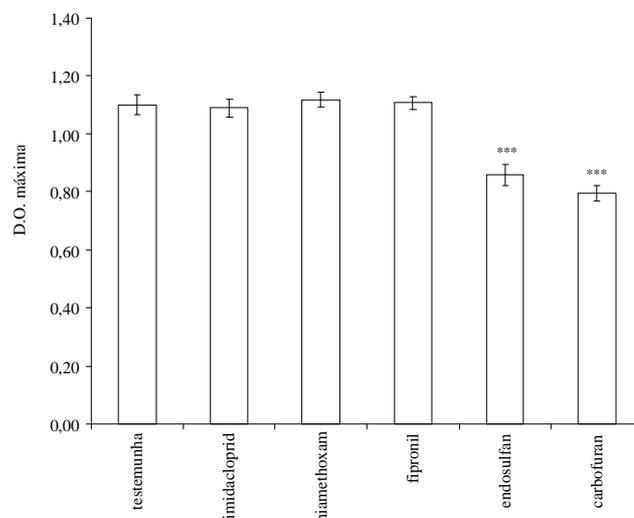


Figura 1. Crescimento máximo da bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, mensurado pela densidade ótica (DO = 450 nm), em meio contendo cinco inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. ***Significativo a 0,1% pelo teste de Dunnett. Hastes verticais indicam ± 1 D.P.

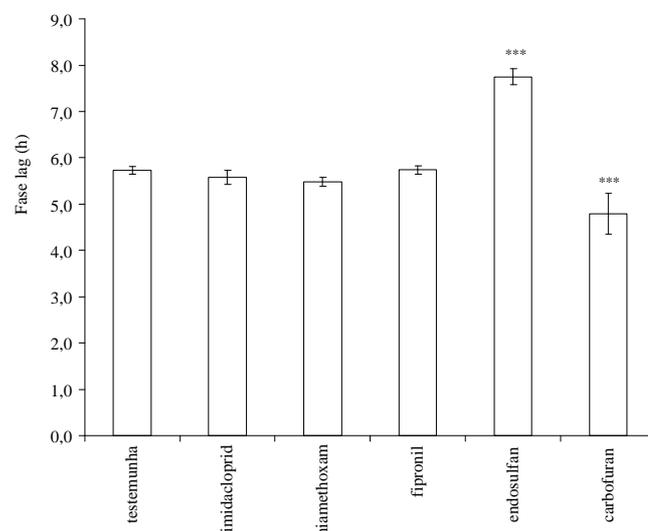


Figura 2. Duração da fase lag de *Herbaspirillum seropedicae* em meio contendo cinco inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. ***Significativo a 0,1% pelo teste de Dunnett. Hastes indicam ± 1 D.P.

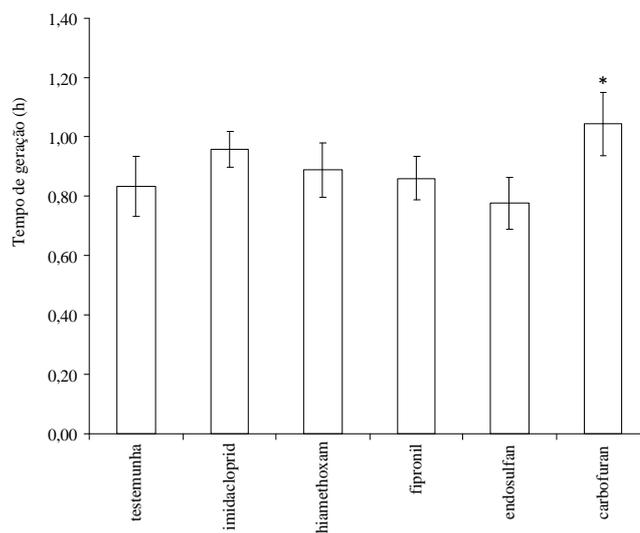


Figura 3. Tempo de geração de *Herbaspirillum seropedicae* em meio contendo cinco inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. * Significativo a 5% pelo teste de Dunnett. Hastes indicam ± 1 D.P.