

## Tolerância da bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus* a herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar

Sergio de O. Procópio<sup>1</sup>, Marcelo F. Fernandes<sup>1</sup>, Daniele A. Teles<sup>2</sup>,  
José G. Sena Filho<sup>1</sup>, Alberto Cargnelutti Filho<sup>3</sup> & Leandro Vargas<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Embrapa Tabuleiros Costeiros, Av. Beira Mar, 3250, Jardins, CEP 49025-040, Aracaju-SE, Brasil. E-mail: sergio.procopio@embrapa.br; marcelo.fernandes@embrapa.br; jose-guedes.sena@embrapa.br

<sup>2</sup> Universidade Federal de Sergipe, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Av. Marechal Rondon, s/n, Jardim Rosa Elze, CEP 49100-000, São Cristovão-SE, Brasil. E-mail: daniaraujo\_bio@hotmail.com

<sup>3</sup> Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Fitotecnia, Avenida Roraima, s/n, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria-RS, Brasil. E-mail: alberto.cargnelutti.filho@gmail.com

<sup>4</sup> Embrapa Trigo, Rodovia BR 285 km 294, CEP 99001-970, Passo Fundo-RS, Brasil. E-mail: leandro.vargas@embrapa.br

### RESUMO

Objetivou-se, nesse trabalho, identificar herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar que não afetam o crescimento ou não causem prejuízos à capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Dezoito herbicidas (paraquat, ametryne, amicarbazone, diuron, metribuzin, [hexazinone + diuron], [hexazinone + clomazone], clomazone, isoxaflutole, sulfentrazone, oxyfluorfen, imazapic, imazapyr, [trifloxysulfuron sodium + ametryne], s-metolachlor, glyphosate, MSMA e 2,4-D) foram testados em suas respectivas doses comerciais. Os parâmetros analisados foram a duração da fase lag, tempo de geração e densidade celular máxima; também foi avaliado o impacto dos herbicidas na atividade da nitrogenase de *G. diazotrophicus* quantificada pela técnica da atividade de redução do acetileno. O paraquat apresentou efeito bactericida sobre *G. diazotrophicus in vitro*. Diuron, metribuzin, MSMA e 2,4-D ocasionaram pequena redução no crescimento máximo de *G. diazotrophicus*; todavia, amicarbazone, [hexazinone + clomazone] e clomazone apresentaram pequeno efeito bacteriostático. Os herbicidas paraquat e glyphosate acarretaram efeito inibitório sobre a FBN de *G. diazotrophicus*.

**Palavras-chave:** fixação biológica de nitrogênio, pesticidas, *Saccharum* spp.

## Tolerance of diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* to herbicides used in the sugarcane crop

### ABSTRACT

The objective of this work was to identify herbicides used in the sugarcane crop that affects neither the growth of nor the process of biological nitrogen fixation (BNF) by the diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Eighteen herbicides (paraquat, ametryne, amicarbazone, diuron, metribuzin, [hexazinone + diuron], [hexazinone + clomazone], clomazone, isoxaflutole, sulfentrazone, oxyfluorfen, imazapic, imazapyr, [trifloxysulfuron sodium + ametryne], s-metolachlor, glyphosate, MSMA e 2,4-D) were tested in their respective commercial doses. For this, we determined the duration of lag phase, generation time and maximum cell density of *G. diazotrophicus*. We also evaluated the impact of herbicides on nitrogenase activity of *G. diazotrophicus* measured by the technique of acetylene reduction assay. Diuron, metribuzin, 2,4-D and MSMA caused a small reduction in maximum growth of *G. diazotrophicus in vitro*. Amicarbazone, [hexazinone + clomazone] and clomazone showed some bacteriostatic effect on *G. diazotrophicus*. Treatments containing the herbicide paraquat and glyphosate resulted inhibitory effect on BFN by *G. diazotrophicus*.

**Key words:** biological nitrogen fixation, pesticides, *Saccharum* spp.

## Introdução

A cana-de-açúcar sempre teve importante papel na atividade agrícola do Brasil, desde sua introdução pelos holandeses. No entanto, talvez a cultura esteja passando pelo seu principal momento na história do País, mais sublime até mesmo que a implantação do Pró-Álcool, em meados da década de 70. 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. As principais razões para este fluxo de migração de matriz energética são de cunho ambiental. É neste cenário que se encaixa o Brasil, um país que apresenta, em boa parte do seu território, clima propício ao cultivo da cana-de-açúcar, tecnologia de ponta desde o cultivo até o processamento da matéria-prima e a maior área agricultável para expansão no mundo.

A cana-de-açúcar extrai aproximadamente 205 kg de nitrogênio (N) a cada colheita de 100 t ha<sup>-1</sup> de colmos (Suman et al., 2008), sendo que para sustentar altos níveis de produtividade o N é introduzido anualmente com uma dose média de 150 kg ha<sup>-1</sup> nas soqueiras, via fertilizantes químicos.

Existe um consenso dentro da comunidade científica de que a aplicação de grandes quantidades de fertilizantes químicos nitrogenados nos sistemas agrícolas gera perda de sustentabilidade desses ambientes (Robinson et al., 2007). Estima-se que menos de 50% do nitrogênio (N) contido nos fertilizantes químicos são efetivamente utilizados pelas culturas agrícolas (Tilman et al., 2002). Na cana-de-açúcar as perdas estimadas do N aplicado são ainda maiores, acima de 60%, principalmente por lixiviação de nitrato, volatilização de amônia e desnitrificação com consequente emissão de N<sub>2</sub>O (Thorburn et al., 2005).

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 (Meier et al., 2006) ou ao incremento da fixação biológica de N (FBN) pela associação da cultura com bactérias diazotróficas (Hoefsloot et al., 2005). Bactérias diazotróficas podem associar-se à cana-de-açúcar, naturalmente, ou ser inoculadas para promover efeitos benéficos (Silva et al., 2009). 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 (Reis et al., 1994; Perin, et al., 2006). Dentre essas espécies, a *Gluconacetobacter diazotrophicus* parece contribuir substancialmente para o suprimento de N na cana-de-açúcar, sendo encontrada em número elevado, em todas as partes da cana-de-açúcar (10<sup>2</sup> a 10<sup>6</sup> g<sup>-1</sup> de massa fresca) (Saravan et al., 2008). Experimentos conduzidos na Índia mostram que a inoculação de *G. diazotrophicus* com outras bactérias diazotróficas ou com micorrizas arbusculares na cultura da cana-de-açúcar pode proporcionar níveis de produção equivalentes à aplicação de 275 kg de N ha<sup>-1</sup> (Muthukumarasamy et al., 2002). De acordo com Pereira et al. (2013), a inoculação dos toletes de cana-de-açúcar com bactérias diazotróficas promove ganhos de biomassa na produção de colmos, sendo a contribuição

diferente entre variedades e estirpes inoculadas, sugerindo uma interação entre esses fatores.

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 e causar depreciação no valor da terra. Dentre os métodos de controle das plantas daninhas se sobressai, no Brasil, o controle químico, devido principalmente ao maior rendimento operacional e ao menor custo por área, comparado aos demais métodos. Vários estudos mostram que os pesticidas podem apresentar toxicidade também a organismos não-alvos. Como exemplo, são comprovados casos de herbicidas sendo tóxicos a bactérias (Santos et al., 2006; Procópio et al., 2011), a fungos (Andaló et al., 2004) e a insetos (Giolo et al., 2005; Stefanello Júnior et al., 2011). Neste 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 fixação biológica do nitrogênio (FBN) desses micro-organismos.

Decorrente deste cenário, o objetivo do trabalho foi identificar herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar que não afetam o crescimento ou que não causem prejuízos à capacidade de FBN da bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

## Material e Métodos

### Preparo do inóculo

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 DYGs (Rodrigues Neto et al., 1986). A cultura foi incubada a 25 °C, por 72 h, quando a densidade ótica (DO<sub>450nm</sub>) atingiu aproximadamente 0,6; este mesmo procedimento de ativação das bactérias foi utilizado para a preparação do inóculo, em todos os ensaios descritos abaixo.

### Efeito de doses comerciais de herbicidas sobre o crescimento de *G. diazotrophicus*

Dezoito herbicidas registrados para a cultura de cana-de-açúcar no Brasil (Tabela 1) foram avaliados quanto ao impacto sobre o crescimento e a fixação biológica de nitrogênio de *Gluconacetobacter 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. As concentrações dos herbicidas nas soluções estoques foram determinadas de modo que sua adição de 200 µL ao volume final de meio de cultura utilizado nos diferentes ensaios, resultasse nas concentrações previamente estabelecidas para cada tratamento.

O efeito de doses comerciais de herbicidas sobre os parâmetros de crescimento de *G. diazotrophicus* foi avaliado

pelo monitoramento do crescimento celular por turbidimetria das culturas inoculadas em meio líquido DYGs misturados com os herbicidas e incubados durante 60 h.

Um volume de 200 µL das soluções herbicidas filtradas foi adicionado a Erlenmeyers de 50 mL contendo 25 mL de meio líquido DYGs, 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 ( $DO_{450nm} = 0,6$ ). Após a inoculação, os frascos foram rapidamente agitados e seu conteúdo vertido em placas de Petri estéreis. Aliquotas de 200 µL dessas 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. Uma das colunas de poços foi preenchida com meio DYGs estéril para verificar a provável 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, determinando-se o crescimento máximo das bactérias.

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 se encontravam indubitavelmente em fase lag. Matematicamente, o comprimento da fase lag ( $t_{lag}$ ) foi calculado de acordo com a seguinte equação:  $t_{lag} = [(\ln OD_{lag}) - a]/b$ , em que:  $\ln OD_{lag}$  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. Os valores de  $g$  e  $t_{lag}$  foram estimados para cada uma das oito repetições, separadamente.

O tempo de geração de *G. diazotrophicus* exposta aos diferentes herbicidas foi calculado após transformação dos dados de DO em  $\ln(DO)$ . Para esses cálculos um mínimo

de cinco leituras de DO, tomadas do meio da fase log, foram consideradas.

As médias de cada tratamento herbicida foram comparadas à do tratamento controle (sem herbicida) pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

### Intensidade de inibição do crescimento por diferentes doses do herbicida paraquat

O herbicida paraquat, cuja dose comercial apresentou o efeito mais drástico sobre o crescimento de *G. diazotrophicus*, foi posteriormente avaliado para determinação da concentração requerida para inibir 50% do crescimento bacteriano *in vitro* ( $CI_{50}$ ).

Os procedimentos utilizados para este ensaio foram os mesmos descritos anteriormente, exceto que cinco doses deste herbicida foram testadas (0; 7,5; 15; 30 e 60 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 dessas soluções a 12,5 mL de meio de cultura líquido DYGs fosse suficiente para atingir as doses previamente estabelecidas para o herbicida. As microplacas foram incubadas por 40 h a 32°C no escuro, sendo a leitura da DO realizada ao final deste período.

Utilizou-se análise de regressão para avaliar a resposta do crescimento bacteriano ao incremento das doses do paraquat.

### Efeito de doses comerciais de herbicidas sobre a atividade de nitrogenase de *G. diazotrophicus*

Os herbicidas foram testados quanto ao impacto na atividade da nitrogenase de *G. diazotrophicus* quando esta foi cultivada em meio semissólido LGI-P livre de N (Döbereiner et al., 1995). Aliquotas de 20 µL de uma cultura de *G. diazotrophicus* crescida sob agitação por 36 h em meio DYGs líquido ( $DO = 0,7$ ) foram utilizadas para inocular frascos de 50mL contendo 25 mL do meio semissólido com as diferentes concentrações de herbicidas a serem testadas. Os herbicidas foram adicionados ao meio semissólido utilizando-se 200 µL de soluções estoques

**Tabela 1.** Lista de herbicidas avaliados no presente estudo

Nome comum	Marca comercial	Dose (g ha <sup>-1</sup> )	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Modo de ação
paraquat	Gramoxone 200®	600	8,48	Inibição do fotossistema I
ametryne	Gesapax®	4.000	56,54	Inibição do fotossistema II
amicarbazone	Dinamic®	1.400	19,79	Inibição do fotossistema II
diuron	Herburon 500 BR®	3.200	45,23	Inibição do fotossistema II
metribuzin	Sencor 480®	1.920	27,14	Inibição do fotossistema II
hexazinone + diuron	Velpar K WG®	396 + 1.404	5,60 + 19,85	Inibição do fotossistema II + Inibição do fotossistema II
hexazinone + clomazone	Discover 500 WP®	250 + 1.000	3,53 + 14,14	Inibição do fotossistema II + Inibição da biossíntese de carotenóides (local de ação desconhecido)
clomazone	Gamit®	1.100	15,55	Inibição da biossíntese de carotenóides (local de ação desconhecido)
isoxaflutole	Provence 750 WG®	262,5	3,71	Inibição da 4-hidroxiifenil-piruvato-dioxigenase (4-HPPD)
sulfentrazone	Boral 500 SC®	800	11,31	Inibição da protoporfirínogeno oxidase (PPO)
oxyfluorfen	Goal BR®	1.200	16,96	Inibição da protoporfirínogeno oxidase (PPO)
imazapic	Plateau®	245	3,46	Inibição da acetolactatosintase (ALS)
imazapyr	Contain®	500	7,07	Inibição da acetolactatosintase (ALS)
trifloxysulfuronosodium + ametryne	Krismat®	37 + 1.463	0,52 + 20,70	Inibição da acetolactatosintase (ALS) + Inibição do fotossistema II
s-metolachlor	Dual Gold®	1.920	27,14	Inibição da divisão celular
glyphosate	Roundup®	1.800	25,44	Inibição da 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs)
MSMA	MSMA Sanachem 720 SL®	2.880	40,71	Desconhecido
2,4-D	Aminol 806®	1.005	14,21	Mimetizador de auxinas

de herbicidas esterilizadas por filtração. Essas soluções foram preparadas de modo que sua adição de 200 µL a 25 mL de meio semissólido resultasse nas concentrações finais dos produtos, determinada para cada tratamento (Tabela 1). Nos frascos utilizados como controle adicionaram-se 200 µL de água destilada esterilizada por filtração em membrana Millipore com poros de 0,22 µm de diâmetro. Quatro frascos foram preparados para cada tratamento; esses frascos foram fechados com tampão de algodão e incubados por 48 h, a 32 °C, no escuro. Após este período uma película bem desenvolvida foi observada na subsuperfície de todos os frascos controle. Cada frasco foi, então, fechado com um septo de borracha, sendo 10% da atmosfera dos mesmos (2,5 mL) substituídos por acetileno de alta pureza através de uma seringa hipodérmica.

A produção de etileno foi determinada após 12 h de incubação a 32 °C, no escuro. Tubos sem acetileno também foram incluídos para a quantificação do etileno endógeno; em seguida, para a determinação de etileno, 100 µL de amostra gasosa da atmosfera dos frascos foram injetados em um cromatógrafo a gás (Perkin-Elmer, Clarus 500) com um detector de ionização de chamas (FID) e uma coluna capilar com fase estacionária GS-CarbonPLOT (Agilent J&W Scientific, Santa Clara, CA, USA). As temperaturas de operação da coluna, do injetor e do detector, foram 100, 150 e 180 °C, respectivamente. Nitrogênio de alta pureza foi utilizado como gás de arraste, com fluxo de 1,8 mL min<sup>-1</sup>. A atividade da nitrogenase foi calculada em nmoles de etileno produzido por frasco por hora. Os efeitos dos herbicidas sobre a atividade de redução do acetileno (ARA) foram comparados com os do tratamento controle, pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ). As eventuais porcentagens de inibição causadas pelos herbicidas foram calculadas.

### Intensidade de inibição da atividade de nitrogenase por diferentes doses de herbicidas

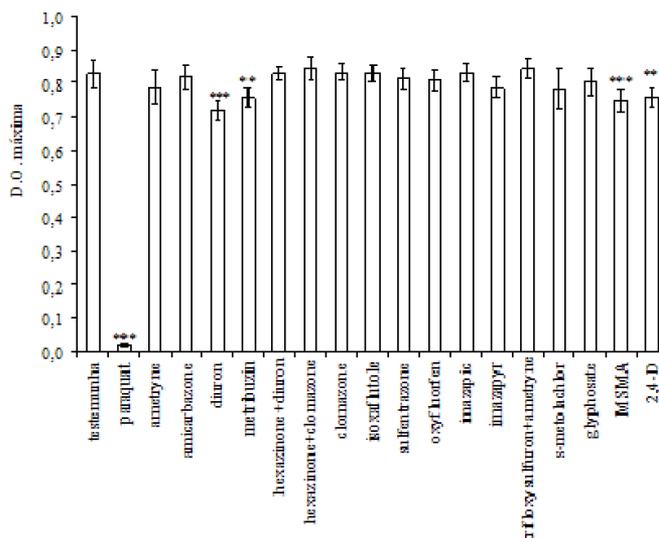
Os herbicidas glyphosate e paraquat, cujas doses comerciais apresentaram efeitos significativos sobre a atividade de nitrogenase de *H. seropedicae*, foram avaliados posteriormente para determinação da concentração requerida para inibir 50% da atividade nitrogenase ( $CI_{50at}$ ).

Os procedimentos utilizados para este ensaio foram os mesmos descritos para o ensaio anterior, exceto que cinco doses desses herbicidas foram testadas (glyphosate - 0, 90, 270, 540 e 1.080g ha<sup>-1</sup>, paraquat - 0, 30, 90, 180, 360 g ha<sup>-1</sup>).

Utilizou-se análise de regressão para avaliar a resposta da atividade da nitrogenase ao incremento das doses dos herbicidas.

## Resultados e Discussão

Embora a avaliação de crescimento tenha sido realizada durante 60 h de incubação, o crescimento final máximo de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, medido pela densidade óptica máxima (DO máxima) a 450 nm, foi atingido entre 48 e 52 h, para todos os tratamentos; apenas cinco dos 18 herbicidas testados reduziram significativamente a DO máxima quando adicionados em suas respectivas doses comerciais: paraquat, diuron, metribuzin, MSMA e 2,4-D (Figura 1). Madhaiyan et al. (2006) observaram que o herbicida 2,4-D reduziu em 50%



**Figura 1.** Crescimento máximo da bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus*, mensurado pela densidade óptica (DO = 450 nm), em meio contendo diversos herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. \*\* Significativo a 1% pelo teste de Dunnett. \*\*\* Significativo a 0,1% pelo teste de Dunnett

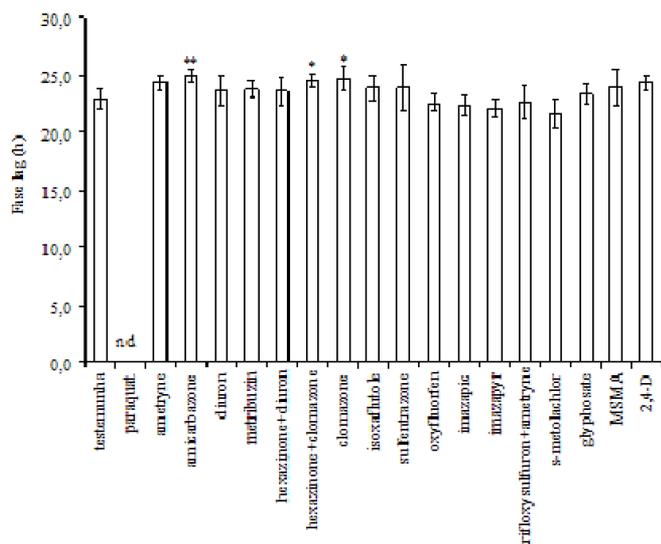
o crescimento de *G. diazotrophicus*, quando foi adicionado ao meio, na concentração de 22 mg L<sup>-1</sup>.

Especificamente para o paraquat, a inibição do crescimento foi muito acentuada com a DO máxima na presença deste herbicida correspondendo a menos de 5% da observada no tratamento sem herbicida (Figura 1). Santos et al. (2006) observaram, avaliando a toxicidade de diversos herbicidas a duas estirpes de *Rhizobium tropici*, que o paraquat foi o produto que promoveu maior inibição do crescimento das estirpes e que o metolachlor resultou em pequena redução no crescimento de apenas uma das estirpes.

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 carbono e energia do meio de cultura para o crescimento bacteriano. Desses mecanismos, os dois primeiros foram testados pela estimativa da duração da fase lag e do tempo de geração. É importante observar que os valores de DO máxima dos tratamentos paraquat, diuron, metribuzin, MSMA e 2,4-D não se igualaram aos máximos observados no tratamento controle, mesmo após um período prolongado de incubação (Figura 1) indicando que os recursos disponíveis no meio de cultura foram usados menos eficientemente para o crescimento bacteriano (menor coeficiente de rendimento) na presença desses cinco herbicidas do que nos demais tratamentos. Sugere-se que o menor coeficiente de rendimento de *G. diazotrophicus* na presença desses herbicidas seja derivado do custo energético requerido para manutenção de mecanismos metabólicos que conferem esta tolerância relativa da bactéria a esses herbicidas.

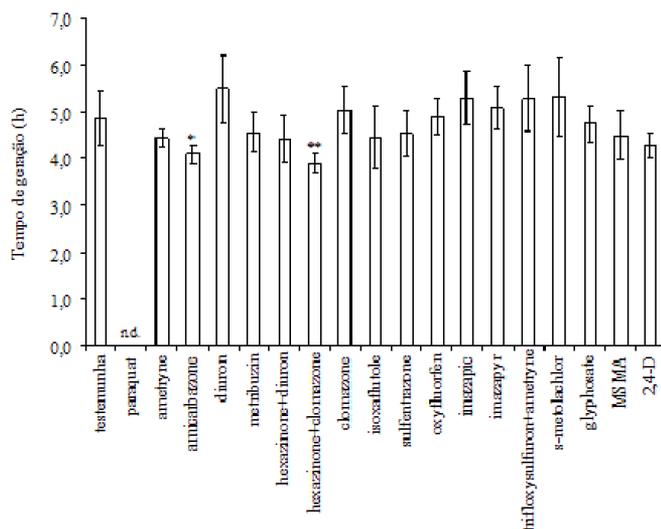
Em virtude da forte inibição do paraquat sobre o crescimento de *G. diazotrophicus*, não foi possível estimar a duração da fase lag nem do tempo de geração para este herbicida. A fase lag no tratamento controle teve duração média de 23 h (Figura 2). Três herbicidas, amicarbazone [hexazinone+clomazone] e clomazone, apresentaram um pequeno aumento na fase

lag (cerca de 1 a 2 h), o qual não chegou a afetar a DO máxima desses tratamentos, demonstrando pequeno efeito bacteriostático. É importante ressaltar que a fase lag representa um período inicial de adaptação da bactéria ao meio, antes do início da sua fase de crescimento.



**Figura 2.** Duração da fase lag de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em meio contendo diversos herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. \* Significativo a 5% pelo teste de Dunnett. \*\* Significativo a 1% pelo teste de Dunnett. nd Não detectada

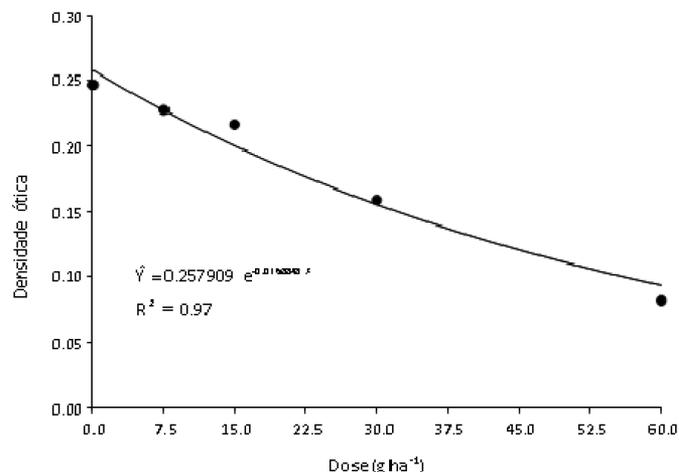
Exceto para o paraquat, nenhum herbicida causou aumento no tempo de geração de *G. diazotrophicus* (Figura 3). Os tratamentos amicarbazone e [hexazinone + clomazone] acarretaram pequena redução no tempo de geração dessa bactéria endofítica, indicando que referidos herbicidas promoveram pequenos incrementos na taxa de crescimento de *G. diazotrophicus*. Das & Debnath (2006) observaram que a aplicação do herbicida oxyfluorfen em solo rizosférico em área cultivada com arroz ocasionou aumento de 42,8% na população de micro-organismos fixadores de N aeróbios não-



**Figura 3.** Tempo de geração de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em meio contendo diversos herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. \* Significativo a 5% pelo teste de Dunnett. \*\* Significativo a 1% pelo teste de Dunnett. nd Não detectado

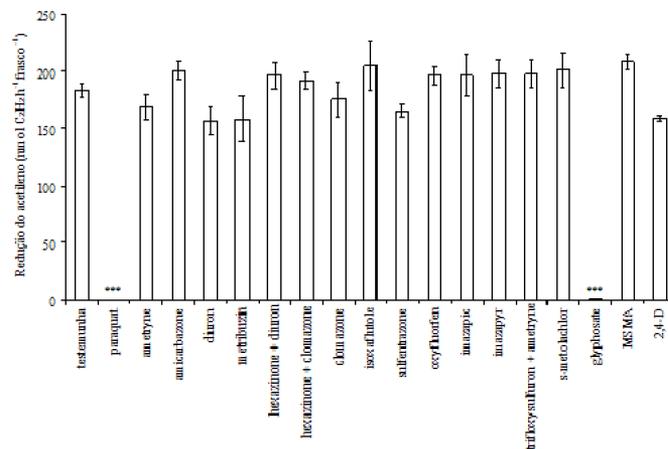
simbióticos com consequente aumento de 37,5% na fixação de N.

A dose de paraquat que inibiu o crescimento de *G. diazotrophicus* em 50% (CI<sub>50</sub>) foi estimada em 41 g ha<sup>-1</sup> (Figura 4), valor este que corresponde a aproximadamente uma dose de oito a quinze vezes menor que a recomendada para este herbicida.

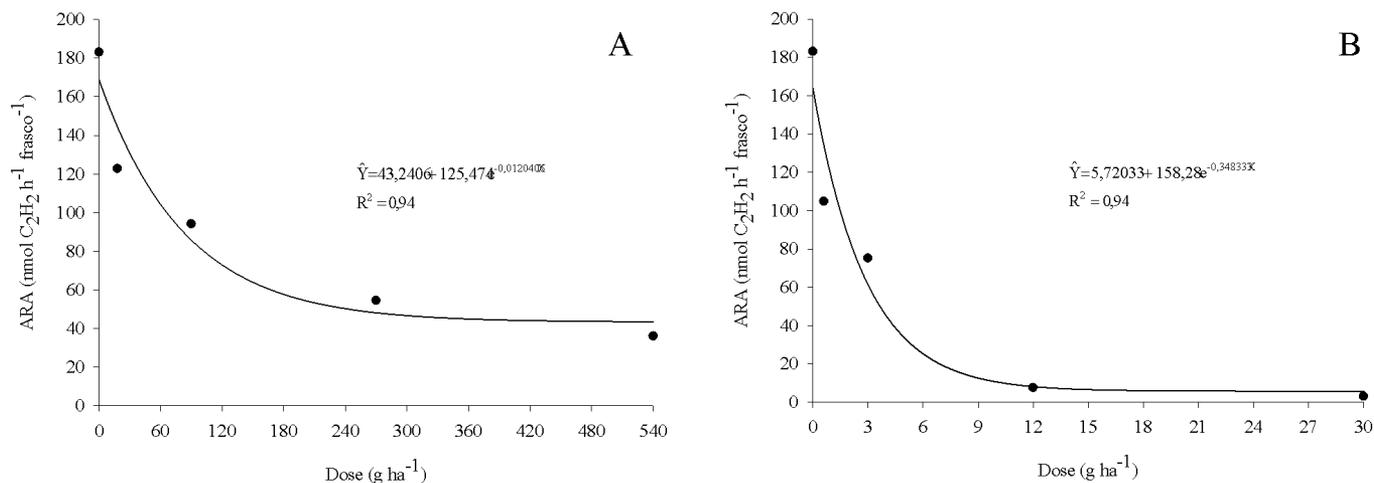


**Figura 4.** Crescimento da bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus*, mensurado pela densidade ótica (DO = 450 nm), em meio de cultura contendo doses crescentes do herbicida paraquat. Dose que inibe o crescimento da bactéria em 50% = 41 g ha<sup>-1</sup>

Os únicos herbicidas que prejudicaram a fixação biológica de nitrogênio (FBN), quando em contato com a bactéria *G. diazotrophicus*, foram o glyphosate e o paraquat (Figura 5). A magnitude dessas reduções foi extremamente drástica pois foram necessários apenas 92,7 g ha<sup>-1</sup> de glyphosate ou 2,1 g ha<sup>-1</sup> de paraquat para que 50% da FBN fossem inibidos (Figura 6). Essas doses estimadas pelas equações de regressão são muito baixas, quando comparadas com a dose normalmente aplicada desses herbicidas nas diversas lavouras brasileiras (glyphosate - 720 a 1.800 g ha<sup>-1</sup> e paraquat - 300 a 600 g ha<sup>-1</sup>). Referidos resultados não corroboram com os encontrados por Madhaiyan et al. (2006), que reportaram que o herbicida 2,4-D, na sua dose recomendada, ocasionou 59,8% de redução na atividade de nitrogenase de



**Figura 5.** Atividade de nitrogenase (produção de etileno) por *Gluconacetobacter diazotrophicus* na presença de diversos herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. \*\*\* Significativo a 0,1% pelo teste de Dunnett



**Figura 6.** Atividade da nitrogenase (redução do acetileno a etileno) por *Gluconacetobacter diazotrophicus* sob doses crescentes dos herbicidas glyphosate (A) e paraquat (B). Doses que inibiram 50% da atividade da nitrogenase foram de 92,7 e 2,1 g ha<sup>-1</sup> para o glyphosate e o paraquat, respectivamente

*Gluconacetobacter diazotrophicus*, enquanto os herbicidas butachlor, alachlor e atrazine inibiram a atividade nitrogenase dessas bactérias, em 22,8; 73,6 e 65,3%, respectivamente.

Observa-se que o glyphosate não afetou os parâmetros de crescimento da bactéria mas reduziu significativamente a FBN. Nos ensaios envolvendo a avaliação do crescimento de *G. diazotrophicus* o nitrogênio era fornecido no próprio meio de cultura, ou seja, a bactéria para garantir seu suprimento de compostos nitrogenados, como aminoácidos, não necessitava retirar este elemento do ar, por meio do processo de fixação biológica. Já nos ensaios envolvendo os testes de FBN o N não era disponibilizado no meio de cultura obrigando as bactérias a retirar o nutriente do ar; decorrente desses resultados fica claro que o glyphosate não é tóxico a bactéria, como foi verificado com o paraquat; simplesmente ele anula a ação da nitrogenase dessa diazotrófica.

De acordo com Gonzalez et al. (1996), o risco de intoxicação de herbicidas sobre os micro-organismos é maior quando os produtos inibem processos bioquímicos comuns entre as plantas e os micro-organismos. Glyphosate [(N-phosphonomethyl) glycine] é um herbicida não-seletivo que inibe a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfatossintase (EPSPs) que atua na rota do ácido chiquímico, envolvida na síntese de aminoácidos aromáticos (Silva et al., 2012). A rota do chiquimato ocorre também em micro-organismos e somente alguns grupos são capazes de utilizar o glyphosate como fonte de energia e nutrientes; consequentemente, este herbicida pode ser tóxico a vários grupos de micro-organismos (Busse et al., 2001).

Em condições de campo, o contato entre *G. diazotrophicus* e os herbicidas glyphosate e paraquat deverá ser, provavelmente, muito pequeno, haja vista que esses herbicidas não são aplicados diretamente sobre as plantas de cana-de-açúcar por não apresentarem seletividade a esta cultura. Excetuando a utilização como maturador do glyphosate, o uso na lavoura canavieira desses herbicidas está centrado em aplicações dirigidas à folhagem das plantas daninhas, preservando as plantas de cana-de-açúcar. Também se ressalta, que esses xenobióticos não apresentam atividade no solo, não havendo, portanto, a possibilidade de serem absorvidos pelas raízes das plantas de cana-de-açúcar, e assim entrar em contato

com as bactérias que estão colonizando o interior da planta mas, como as quantidades requeridas de cada herbicida para prejudicar a FBN foram extremamente baixas, principalmente para o paraquat e mesmo que esses herbicidas sejam utilizados na maioria das vezes em jato dirigido, ou seja, evitando-se o contato dos produtos com a folhagem da cana-de-açúcar, essas quantidades, a depender das condições ambientais no momento da aplicação, podem atingir as plantas da cultura simplesmente sendo decorrentes de deriva. Também é importante ressaltar que o paraquat vem sendo utilizado em algumas situações na cultura da cana-de-açúcar em subdoses em pós-emergência total, ou seja, sobre a folhagem da cana-de-açúcar, substituindo o herbicida MSMA; entretanto, essas subdoses são maiores que as verificadas como críticas nesta pesquisa podendo, assim, causar prejuízos na fixação biológica de nitrogênio.

Outra preocupação relevante seria no cultivo da cana-de-açúcar transgênica, resistente ao glyphosate, que deve ser lançada no Brasil nos próximos cinco anos. Neste cultivo o herbicida glyphosate será aplicado em pós-emergência da cultura, sobre a folhagem. Pela sua alta taxa de absorção e de translocação (sistemicidade) suas moléculas facilmente encontrariam as bactérias diazotróficas, podendo assim causar efeitos deletérios sobre a capacidade de FBN, o que praticamente anularia os efeitos benéficos de uma possível técnica de inoculação dos toletes de cana-de-açúcar e a consequente redução da necessidade de adubação nitrogenada.

É importante salientar que os dados obtidos no presente trabalho foram decorrentes da utilização dos inseticidas na formulação comercial, ou seja, princípio ativo mais todos os demais ingredientes da formulação, tal qual o mesmo é comercializado e, consequentemente, utilizado na agricultura. Conforme o “Working Group Pesticides and Beneficial Arthropods” of the “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 (Hassan et al., 2000), pois se sabe que alguns adjuvantes reduzem a tensão superficial e facilitam a penetração do pesticida. Segundo Malkones (2000), os aditivos presentes na formulação dos agroquímicos podem

afetar os micro-organismos e, em certos casos, até mesmo modificar o efeito do agrotóxico.

Os resultados deste trabalho já são suficientes para propor que os herbicidas paraquat e glyphosate sejam avaliados em nível de campo uma vez que, a partir dos mesmos, é possível afirmar que esses compostos ocasionam paralisação no crescimento (paraquat) e redução drástica na fixação de nitrogênio (paraquat e glyphosate) a essa estirpe de *G. diazotrophicus*. Os demais herbicidas avaliados não necessitariam desse tipo de investigação, pois testes *in vitro* mantêm o micro-organismo 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 (Cavalcanti et al., 2002). Desta forma, espera-se que produtos considerados compatíveis nesse tipo de teste também o sejam quando aplicados em condições de campo.

## Conclusões

Paraquat apresenta forte inibição sobre o crescimento de *Gluconacetobacter diazotrophicus in vitro*.

Diuron, metribuzin, MSMA e 2,4-D, ocasionam pequena redução no crescimento máximo da bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus in vitro*.

Amicarbazone, [hexazinone + clomazone] e clomazone apresentam pequeno efeito bacteriostático sobre *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Amicarbazone e [hexazinone + clomazone] diminuem levemente o tempo de geração de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Os tratamentos contendo os herbicidas paraquat e glyphosate acarretam efeito inibitório sobre a fixação biológica de nitrogênio *in vitro* de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

## Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apoio à Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC/SE), pelo apoio financeiro.

## Literatura Citada

- Andaló, V.; Moino Jr., A.; Santa-Cecília, L. V. C.; Souza, G. C. Compatibilidade de *Beauveria bassiana* com agrotóxicos visando o controle da cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). *Neotropical Entomology*, v.33, n.4, p.463-467, 2004. <<http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2004000400011>>.
- Busse, M. D.; Ratcliff, A. W.; Shestak, C. J.; Powers, R. F. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, v.33, n.12-13, p.1777-1789, 2001. <[http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00103-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00103-1)>.
- Cavalcanti, R. S.; Moino Jr., A.; Souza, G. C.; Arnosti, A. Efeito dos produtos fitossanitários fenpropatrina, imidacloprid, iprodione e tiametoxam sobre o desenvolvimento do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.69, n.3, p.17-22, 2002. <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V69\\_3/Cavalcanti.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V69_3/Cavalcanti.pdf)>. 29 Mar. 2013.
- Das, A. C.; Debnath, A. Effect of systemic herbicides on N<sub>2</sub>-fixing and phosphate solubilizing microorganisms in relation to availability of nitrogen and phosphorus in paddy soils of West Bengal. *Chemosphere*, v.65, n.6, p.1082-1086, 2006. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.02.063>>.
- Döbereiner, J.; Baldani, V. L. D.; Baldani, J. I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: Embrapa - SPI; Itaguaí, RJ: Embrapa - CNPAB, 1995. 60p.
- Giolo, F. P.; Grützmacher, A. D.; Procópio, S. O.; Manzoni, C. G.; Lima, C. A. B.; Nörnberg, S. D. Seletividade de formulações de glyphosate a *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Planta Daninha*, v.23, n.3, p.457-462, 2005. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582005000300009>>.
- Gonzalez, A.; Gonzalez-Murua, C.; Royuela, M. Influence of imazethapyr on *Rhizobium* growth and its symbiosis with Pea (*Pisum sativum*). *Weed Science*, v.44, n.1, p.31-37, 1996. <<http://www.jstor.org/discover/10.2307/4045779>>. 29 Mar. 2013.
- Hassan, S. A.; Halsall, N.; Gray, A. P.; Kuehner, C.; Moll, M.; Bakker, F. M.; Roembke, J.; Yousef, A.; Nasr, F.; Abdelgader, H. A. A laboratory method to evaluate the side effects of plant protection products on *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hym., Trichogrammatidae). In: Candolfi, M. P. (Eds.) Guidelines to evaluate side-effects of plant protection products to non-target arthropods. Reinheim: IOBC/ WPRS, 2000. p.107-119.
- Hoefsloot, G.; Termorshuizen, A. J.; Watt, D. A.; Cramer, M. D. Biological nitrogen fixation is not a major contributor to the nitrogen demand of a commercially grown South African sugarcane cultivar. *Plant and Soil*, v.277, n.1-2, p.85-96, 2005. <<http://dx.doi.org/10.1007/s11104-005-2581-0>>.
- Madhaiyan, M.; Poonguzhali, S.; Hari, K.; Saravanan, V. S.; Sa, T. Influence of pesticides on the growth rate and plant-growth promoting traits of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Pesticides Biochemistry and Physiology*, v.84, n.2, p.143-154, 2006. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.06.004>>.
- Malkones, H. P. Comparison of the effects of differently formulated herbicides on soil microbial activities - a review. *Journal of Plant Diseases and Protection*, v.8, n.5, p.781-789, 2000.
- Meier, E. A.; Thorburn, P. J.; Wegener, M. K.; Basford, K. E. The availability of nitrogen from sugarcane trash on contrasting soils in the wet tropics of north Queensland. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, v.75, n.1-3, p.101-114, 2006. <<http://dx.doi.org/10.1007/s10705-006-9015-0>>.
- Muthukumarasamy, R.; Revathi, G.; Seshadri, S.; Lakshminarasimhan, C. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. *Current Science*, v.83, n.2, p.137-145, 2002. <<http://www.iisc.ernet.in/currsci/jul252002/137.pdf>>. 29 Mar. 2013.

- Pereira, W.; Leite, J. M.; Hipólito, G. S.; Santos, C. L. R.; Reis, V. M. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. *Revista Ciência Agronômica*, v.44, n.2, p.363-370, 2013. <<http://dx.doi.org/10.1590/S1806-66902013000200020>>.
- Perin, L.; Martinez-Aguilar, L.; Paredes-Valdez, G.; Baldani, J. I.; Estrada-de Los Santos, P.; Reis, V. M.; Caballero-Mellado, J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. *International Journal System Evolution Microbiology*, v.56, n.8, p.1931-1937, 2006a. <<http://dx.doi.org/10.1099/ijms.0.64362-0>>.
- Procópio, S. O.; Fernandes, M. F.; Teles, D. A.; Sena Filho, J. G.; Cargnelutti Filho, A.; Vargas, L.; Sant'anna, S. A. C. Toxicidade de herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar à bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense*. *Planta Daninha*, v.29, n.special, p.1079-1089, 2011. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582011000500015>>.
- Reis, V. M.; Olivares, F. L.; Döbereiner, J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.10, n.4, p.101-104, 1994. <<http://dx.doi.org/10.1007/BF00144460>>.
- Robinson, N.; Fletcher, A.; Whan, A.; Critchley, C.; Von Wirén, N.; Lakshmanan, P.; Schmidt, S. Sugarcane genotypes differ in internal nitrogen use efficiency. *Functional Plant Biology*, v.34, n.12, p.1122-1129, 2007. <<http://dx.doi.org/10.1071/FP07183>>.
- Rodrigues Neto, J.; Malavolta Júnior, V. A.; Victor, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. *Summa Phytopathologica*, v.12, n.1-2, p.16, 1986.
- Santos, J. B.; Silva, A. A.; Costa, M. D.; Jakelaitis, A.; Vivian, R.; Santos, E. A. Ação de herbicidas sobre o crescimento de estirpes de *Rhizobium tropici*. *Planta Daninha*, v.24, n.3, p.457-465, 2006. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582006000300006>>.
- Saravan, V. S.; Madhaiyan, M.; Osborne, J.; Thangaraju, M.; Sa, T. M. Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing Acetobacteraceae members: their possible role in plant growth promotion. *Microbial Ecology*, v.55, n.1, p.130-140, 2008. <<http://dx.doi.org/10.1007/s00248-007-9258-6>>.
- Silva, J. C.; Arf, G.; Gerlach, G. A. X.; Kuriyama, C. S.; Rofrigues, R. A. F. Efeito hormese de glyphosate em feijoeiro. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v.42, n.3, p.295-302, 2012. <<http://dx.doi.org/10.1590/S1983-40632012000300008>>.
- Silva, M. F.; Oliveira, P. J.; Xavier, G. R.; Rumjanek, N. G.; Reis, V. M. Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.44, n.11, p.1437-1443, 2009. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2009001100010>>.
- Stefanello Júnior, G. J.; Grutzmacher, A. D.; Pasini, R. A.; Bonez, C.; Moreira, D. C.; Spagnol, D. Seletividade de herbicidas registrados para a cultura do milho aos estádios imaturos de *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Planta Daninha*, v.29, n.special, p.1069-1077, 2008. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582011000500014>>.
- Suman, A.; Shrivastava, A. K.; Gaur, A.; Singh, P.; Singh, J.; Yadav, R. L. Nitrogen use efficiency of sugarcane in relation to its BNF potential and population of endophytic diazotrophs at different N levels. *Plant Growth Regulation*, v.54, n.1, p.1-11, 2008. <<http://dx.doi.org/10.1007/s10725-007-9219-6>>.
- Thorburn, P. J.; Meier, E. A.; Probert, M. E. Modelling nitrogen dynamics in sugarcane systems: recent advances and applications. *Field Crops Research*, v.92, n.2-3, p.337-351, 2005. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2005.01.016>>.
- Tilman, D.; Cassman, K. G.; Matson, P. A.; Naylor, R.; Polasky, S. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, v.418, n.6898, p.671-677, 2002. <<http://dx.doi.org/10.1038/nature01014>>.