



ARTIGO ORIGINAL

Marcelo Ferreira Fernandes¹
Sergio de Oliveira Procópio^{2*}
Daniele Araújo Teles³
José Guedes de Sena Filho¹
Alberto Cargnelutti Filho⁴
Clívia Rolemberg Andrade³

¹Embrapa Tabuleiros Costeiros, Av. Beira Mar, 3250, Sementeira, 49025-040, Aracaju, SE, Brasil

²Embrapa Soja, Rod. Carlos João Strass, s/n, Warta, 86001-970, Londrina, PR, Brasil

³Universidade Federal de Sergipe – UFS, Av. Marechal Rondon, s/n, Jardim Rosa Elze, 49100-000, São Cristóvão, SE, Brasil

⁴Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Av. Roraima, 1000, Campus Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

Autor Correspondente:

*E-mail: procopio.so@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE

Fixação biológica de nitrogênio
Pesticidas
Saccharum spp.

KEYWORDS

Biological nitrogen fixation
Pesticides
Saccharum spp.

Crescimento e fixação biológica de nitrogênio de *Gluconacetobacter diazotrophicus* na presença de inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar

Growth and biological nitrogen fixation of Gluconacetobacter diazotrophicus in the presence of insecticides used in sugarcane crop

RESUMO: Trabalhos mostram que a associação de bactérias diazotróficas a gramíneas pode resultar em menor necessidade da aplicação de adubos nitrogenados. Todavia, para que essas bactérias possam expressar todo o seu potencial de fixação de N atmosférico, é necessário que os pesticidas aplicados sejam seletivos a esses microrganismos. O objetivo foi identificar inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar que não afetem o crescimento ou que não causem prejuízos à capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) da bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Cinco inseticidas (imidacloprid, fipronil, thiamethoxam, endosulfan e carbofuran) foram testados em suas respectivas doses comerciais quanto ao impacto sobre o crescimento da bactéria em meio líquido DIGs. Para isso, determinaram-se as variáveis ‘capacidade de suporte de crescimento no meio de cultura empregado’, ‘duração da fase lag’ e ‘tempo de geração’. Também foi avaliado o impacto dos inseticidas na atividade da nitrogenase de *G. diazotrophicus* cultivada em meio semissólido LGI-P livre de N. Nenhum dos inseticidas avaliados afetou significativamente a capacidade de suporte de crescimento de *G. diazotrophicus*. No entanto, incrementos na duração da fase lag observados na presença de thiamethoxam e endosulfan, bem como do tempo de geração com o carbofuran, evidenciaram a ocorrência de efeitos inibitórios destes inseticidas sobre o crescimento de *G. diazotrophicus* nas condições testadas. Nenhum dos inseticidas avaliados resultou em efeito deletério à FBN *in vitro* de *G. diazotrophicus*.

ABSTRACT: Studies show that the association of diazotrophic bacteria with grasses can result in reduced need for nitrogen fertilization. However, it is necessary that the pesticides applied be selective to these microorganisms so that these rhizobia can express their whole potential of atmospheric nitrogen fixation. The objective of this study was to identify pesticides used in sugarcane crop that do not affect growth or cause harm to the ability of biological nitrogen fixation (BNF) of the diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Five insecticides (imidacloprid, fipronil, thiamethoxam, endosulfan and carbofuran) were tested in their respective doses regarding the commercial impact on the growth of bacteria in liquid medium DIGs. To this end, the variables support capacity growth (“carrying capacity”) in the culture medium used, duration of lag phase, and generation time were determined. The impact of pesticides on nitrogenase activity of *G. diazotrophicus* grown in semi-solid LGI-P-free N was also evaluated. None of the insecticides tested significantly affected the ability to growth support of *G. diazotrophicus*. However, increments in the duration of the lag phase observed in the presence of endosulfan and thiamethoxam, as well as in the generation time, with carbofuran, showed the occurrence of inhibitory effects of these insecticides on the growth of *G. diazotrophicus* under the conditions tested. None of the insecticides caused deleterious effect on BNF *in vitro* of *G. diazotrophicus*.

Recebido: 28/05/2012

Aceito: 30/11/2012

1 Introdução

O suprimento de nitrogênio vem assumindo um papel de extrema importância para a sustentabilidade da agricultura, em função do crescente aumento da demanda e do incremento significativo no preço dos fertilizantes sintéticos nitrogenados, adicionando-se ainda toda ênfase na poluição ambiental (MADHAIYAN et al., 2006).

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância comercial, que demanda significativas quantidades de nitrogênio e potássio. As pesquisas envolvendo a problemática do N na cultura da cana-de-açúcar têm sido voltadas à melhoria de práticas agrônômicas, 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). Estudos relacionados ao balanço e à abundância de isótopos de ^{15}N mostram que mais de 60% do N absorvido por diversas variedades de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil é proveniente da FBN (YONEYAMA et al., 1997). Algumas espécies de bactérias endofíticas capazes de fixar N atmosférico – como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp., *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia* spp. – foram isoladas de colmos e raízes de plantas de cana-de-açúcar. O primeiro estudo que propôs a associação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* com a cana-de-açúcar data de 1952, com uma especulação de uma bactéria associada ao caldo extraído da cultura. No entanto, somente em 1988, é que se identificou o microrganismo envolvido na fixação de N atmosférico em plantas de cana-de-açúcar, no Brasil, sendo essa bactéria originalmente denominada de *Saccharobacter nitrocapitans* (CAVALCANTE; DOBEREINER, 1988). Quase uma década após esse fato, Yamada, Hoshino e Ishikawa (1998), com base em estudos de DNA, renomearam essa bactéria como *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria gram-negativa, pertencente ao filo Proteobacteria, à ordem Rhodospirillales e à família Acetobacteraceae (KERSTERS et al., 2006). Esta família contém três gêneros que possuem a capacidade de fixar N atmosférico, compreendendo sete espécies: *Acetobacter nitrogenifigens*, *Gluconacetobacter kombuchae*, *Gluconacetobacter johanna*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Swaminathania salitolerans* e *Acetobacter peroxydans* (DUTTA; GACHHUI, 2007).

Além de fixar nitrogênio atmosférico, *Gluconacetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTE; DOBEREINER, 1988) produz hormônios de crescimento, como o ácido indol acético (AIA), é tolerante a vários antibióticos, como estreptomicina, tetraciclina e rifampicina, e possui atividade antagonista a *Xanthomonas albilineans* e ao fungo *Colletotrichum falcatum* (MUTHUKUMARASAMY; REVATHI; VADIVELU, 2000). *Gluconacetobacter diazotrophicus* pode ainda produzir ácidos capazes de solubilizar fosfatos e zinco presentes no solo em formas pouco solúveis (MADHAIYAN et al., 2004).

Os agroquímicos são amplamente utilizados para a proteção das plantas, contribuindo para que as culturas expressem seus potenciais produtivos (KANUNGO; ADHYA; RAO, 1995). Contudo, Pham, Min e Gu (2004)

afirmam que os pesticidas podem causar danos específicos em células bacterianas, como alterações no DNA, inibição na produção de proteínas, danos oxidativos e destruição de membranas. O inseticida monochrotophos inibiu em 44 e 46% a atividade nitrogenase das bactérias *Rhodobacter spheroides* e *Rhodopsseudomonas palustris* (CHALAM et al., 1997). Gomez et al. (1998) registraram que a adição do inseticida methidathion em meio de cultura promoveu significativa redução do crescimento e da atividade nitrogenase de *Azospirillum brasilense*. Arruda, Lopes e Moura (2001), trabalhando com herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS), em diferentes concentrações, observaram que estes afetaram drasticamente o crescimento de diferentes estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*. Santos et al. (2006), avaliando a toxicidade de diversos herbicidas a duas estirpes de *Rhizobium tropici*, observaram 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.

O objetivo foi identificar inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar que não afetem o crescimento ou que não causem prejuízos à capacidade de FBN da bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

2 Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Tabuleiros Costeiros em Aracaju-SE. A estirpe de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAI-5) utilizada neste estudo foi obtida da Coleção de Bactérias Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia.

As células foram ativadas em 10 mL de meio líquido DIGs, cuja formulação, em g L⁻¹ de água destilada, é a seguinte: glicose, 2,0; peptona, 1,5; extrato de levedura, 2,0; K₂HPO₄, 0,5; MgSO₄.7H₂O, 0,5; e ácido glutâmico, 1,5, pH 6,0. A cultura foi incubada a 25 °C por 72 h, quando a densidade óptica (DO_{450nm}) atingiu aproximadamente 0,6. Este mesmo procedimento de ativação das bactérias foi utilizado para a preparação do inóculo em todos os ensaios descritos a seguir.

O efeito das doses comerciais de cinco inseticidas registrados para a cultura de cana-de-açúcar no Brasil (Tabela 1) sobre os parâmetros de crescimento de *G. diazotrophicus* foi avaliado pelo monitoramento do crescimento celular por turbidimetria das culturas inoculadas em meio líquido DIGs misturadas com os inseticidas e incubadas por 60 h. Detalhes deste procedimento são descritos a seguir.

Soluções estoques dos inseticidas foram preparadas com água destilada e filtradas através de membranas Millipore com poros de 0,22 µm. As concentrações dos inseticidas nas soluções estoques foram determinadas de modo que a adição de 200 µL destas ao volume final de meio de cultura utilizado nos diferentes ensaios resultasse nas concentrações previamente estabelecidas para cada tratamento.

As soluções inseticidas foram adicionadas a Erlenmeyers de 50 mL contendo 25 mL de meio líquido DIGs (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 inoculação, os frascos foram

Tabela 1. Lista de inseticidas avaliados no presente estudo.

Princípio ativo	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

rapidamente agitados e os conteúdos dos mesmos vertidos em placas de Petri 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. 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, por 66 h.

A diferença entre os valores máximos e mínimos de absorbância obtidos no período de incubação foi interpretada como a capacidade de suporte de crescimento bacteriano (“carrying capacity”) do meio de cultura contendo os diferentes produtos.

O comprimento da fase lag foi estimado como o tempo no qual o logaritmo neperiano - 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 1:

$$t_{lag} = [(\ln DO_{lag}) - a]/b \quad (1)$$

em que: $\ln DO_{lag}$ = ln da média das três primeiras leituras de DO; a e b = intercepto e inclinação da equação ajustada para o ln de DO na fase log em função do tempo de incubação.

O tempo de geração de *G. diazotrophicus* exposta aos diferentes inseticidas 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 tempo de geração e de duração da fase lag foram estimados para cada uma das oito repetições separadamente.

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

O inseticida carbofuran, cuja dose comercial apresentou efeito significativo sobre o tempo de geração 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 esse ensaio foram os mesmos descritos anteriormente, exceto que cinco doses deste inseticida foram testadas (0, 1.650, 3.300, 6.600 e 13.200 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 o inseticida.

As microplacas foram incubadas por 40 h a 32 °C no escuro, sendo a leitura da DO realizada ao final desse período.

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

Os cinco inseticidas, em suas respectivas doses comerciais (Tabela 1), 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; BALDANI; BALDANI, 1995). Alíquotas de 20 µL de uma cultura de *G. diazotrophicus*, crescida sob agitação por 36 h em meio DIGs líquido (DO = 0,7), foram utilizadas para inocular frascos de 50 mL contendo 25 mL do meio semissólido. Os inseticidas foram adicionados ao meio semissólido utilizando-se 200 µL de soluções estoques de inseticidas esterilizadas por filtração. Nos frascos utilizados como controle, adicionaram-se 200 µL de água destilada esterilizada por filtração em membrana Millipore com poros de 0,22 µ de diâmetro. Quatro frascos foram preparados para cada tratamento. Os 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) substituída por acetileno de alta pureza, utilizando-se uma seringa hipodérmica (HAAHTELA et al., 1981).

A produção de etileno foi determinada após 12 h de incubação a 32 °C, no escuro. Tubos sem acetileno foram também 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 °C, 150 °C e 180 °C, respectivamente. Nitrogênio de alta pureza foi utilizado como gás de arraste, com fluxo de 1,8 mL min⁻¹. A atividade da nitrogenase foi calculada em nmoles de etileno produzido por frasco por hora. Os efeitos dos inseticidas sobre a atividade de redução do acetileno (ARA) foram comparados ao tratamento controle pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$). As porcentagens de eventuais inibições causadas pelos inseticidas foram calculadas.

3 Resultados e Discussões

Embora a avaliação de crescimento tenha sido realizada por 66 h de incubação, o crescimento final máximo de *G. diazotrophicus*, medido pela densidade ótica máxima (DO máxima) a 450 nm, foi atingido entre 48 e 52 h, para todos os tratamentos. Nenhum dos inseticidas, avaliados nas suas respectivas doses comerciais, promoveu diminuição na capacidade de suporte do crescimento de *G. diazotrophicus* em meio DIGs (Figura 1). É importante ressaltar que os valores da densidade ótica podem expressar não somente o crescimento bacteriano, mas também a produção de outros compostos extracelulares, como alguns polissacarídeos, que podem também influenciar na densidade ótica. Segundo Madhaiyan et al. (2006), os inseticidas malathion e dichlorvos não apresentaram inibição significativa do crescimento de *G. diazotrophicus*. A ausência de efeitos de inseticidas sobre o crescimento de diversos outros microrganismos também tem sido relatada na literatura. Andaló et al. (2004) observaram que os inseticidas imidacloprid, thiamethoxam e carbofuran foram seletivos ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. Moino Junior e Alves (1998) verificaram que o inseticida imidacloprid não causou efeitos prejudiciais sobre a esporulação e o crescimento vegetativo dos fungos *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. Batista Filho, Almeida e Lamas (2001) evidenciaram que thiamethoxam foi compatível com dez diferentes microrganismos testados.

A fase lag no tratamento controle teve duração média de 23 h (Figura 2). Os inseticidas endosulfan e thiamethoxam aumentaram a duração da fase lag em aproximadamente 2 e 4 h, respectivamente, o que demonstra um leve efeito bacteriostático desses inseticidas sobre *G. diazotrophicus*. Todavia, esse atraso promovido por esses inseticidas na fase lag não foi suficiente para diminuir a capacidade de suporte

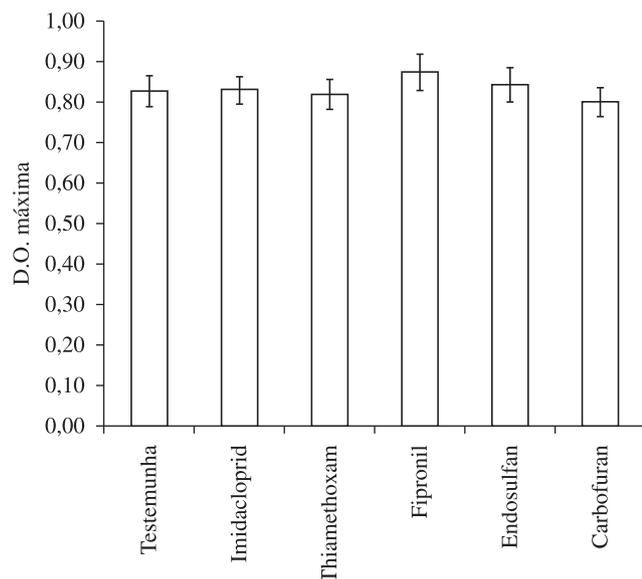


Figura 1. Capacidade de suporte do crescimento de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, mensurada pela densidade ótica (DO = 450 nm), em meio DIGs contendo cinco inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. Nenhum tratamento diferiu da testemunha pelo teste de Dunnett a 5% de significância.

de crescimento da bactéria. Esses resultados corroboram os relatados por Madhaiyan et al. (2006), que observaram que o inseticida endosulfan, na sua dose comercial, promoveu, em meio de cultura, um atraso inicial no crescimento de *G. diazotrophicus*; contudo, após 70 h de avaliação, o crescimento já se apresentava similar ao do tratamento controle. A presença dos demais inseticidas avaliados não alterou a duração da fase lag da bactéria. É importante ressaltar que a fase lag representa um período inicial de adaptação da bactéria ao meio antes do início da sua fase de reprodução e crescimento. Assim, é possível que o incremento da fase lag na presença de endosulfan e thiamethoxam deva-se ao tempo requerido pela bactéria para induzir e expressar mecanismos metabólicos que conferem tolerância a estes inseticidas, os quais não são expressos pela bactéria na ausência destes compostos.

O único inseticida, aplicado na dose comercial, que aumentou o tempo de geração de *G. diazotrophicus* foi o carbofuran, que acarretou um aumento em torno de 1 h no tempo de geração da bactéria (Figura 3). Esse aumento representou um atraso no crescimento da bactéria quando na presença do carbofuran, mas que não resultou em prejuízos na capacidade de suporte de crescimento de *G. diazotrophicus* em meio DIGs, conforme já comentado anteriormente. Novamente, é importante salientar a possibilidade da produção de compostos extracelulares que também podem influenciar na determinação do tempo de geração. Em função da menor taxa de crescimento na presença de carbofuran, é razoável supor que o esgotamento de nutrientes ou o acúmulo de compostos tóxicos no meio de cultura tenha ocorrido mais lentamente. Deste modo, a bactéria na presença do carbofuran teria um tempo mais prolongado de crescimento, o que compensaria a taxa mais lenta de crescimento e resultaria em uma DO máxima similar ao tratamento controle. Visto que o esgotamento de nutrientes ou o acúmulo de compostos tóxicos seja menos provável de ocorrer em sistemas abertos, como os tecidos da

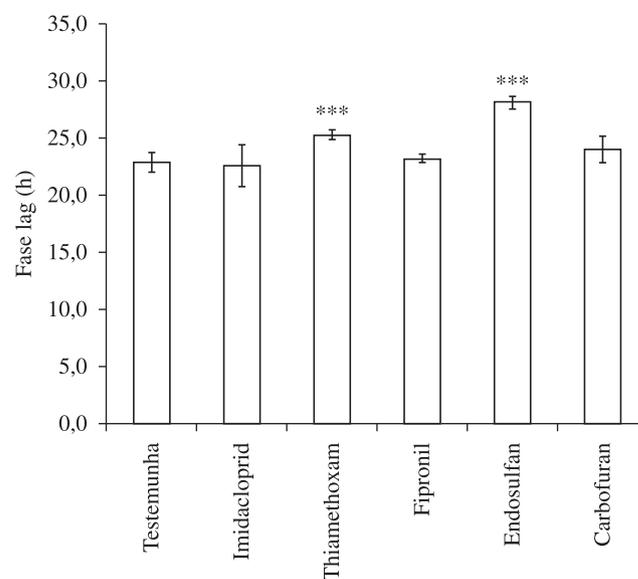


Figura 2. Duração da fase lag de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em meio contendo cinco inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. ***Significativo a 0,1% pelo teste de Dunnett.

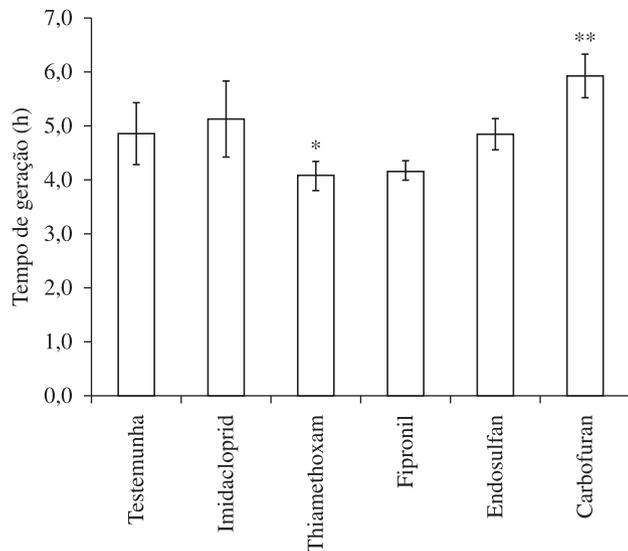


Figura 3. Tempo de geração de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em meio contendo cinco inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. *Significativo a 5% pelo teste de Dunnett; **Significativo a 1% pelo teste de Dunnett.

cana-de-açúcar, o maior tempo de geração na presença de carbofuran poderá afetar negativamente a colonização da cana-de-açúcar pela bactéria, quando comparado à condição sem aplicação deste inseticida. É interessante ressaltar ainda que a similaridade na capacidade de suporte entre os tratamentos sugere que a conversão dos recursos disponíveis no meio de cultura em biomassa microbiana foi semelhante entre o controle e os tratamentos nos quais a duração da fase lag (endosulfan e thiamethoxam) ou o tempo de geração foram incrementados (carbofuran). Thiamethoxan reduziu levemente o tempo de geração da bactéria (Figura 3), ou seja, acelerou a multiplicação de *G. diazotrophicus*; contudo, isso também não alterou a DO máxima desse tratamento em comparação com o tratamento controle (sem inseticidas). Efeitos positivos de inseticidas sobre o crescimento microbiano têm sido relatados, como os apresentados por Kanungo, Adhya e Rao (1995), que mostraram que aplicações sequenciadas de carbofuran promoveram incremento na população de *Azospirillum* sp. e *Azotobacter* sp. na rizosfera de plantas de arroz. Imidacloprid, fipronil e endosulfan não influenciaram no tempo de geração de *G. diazotrophicus*.

A dose do carbofuran que inibiu o crescimento de *G. diazotrophicus* em 50% (CI_{50}) foi estimada em 11.341 g ha^{-1} (Figura 4), valor este que corresponde, aproximadamente, a uma dose sete vezes maior que a recomendada para este inseticida. Madhaiyan et al. (2006) reportam que o inseticida endosulfan reduziu em 50% o crescimento de *G. diazotrophicus*, quando foi adicionado ao meio na concentração aproximada de $8 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo esse valor muito acima da sua dose recomendada comercialmente.

Os tratamentos inseticidas avaliados – imidacloprid, fipronil, thiamethoxam, endosulfan e carbofuran – não ocasionaram nenhum efeito deletério à FBN de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, estirpe PAI-5 (Figura 5),

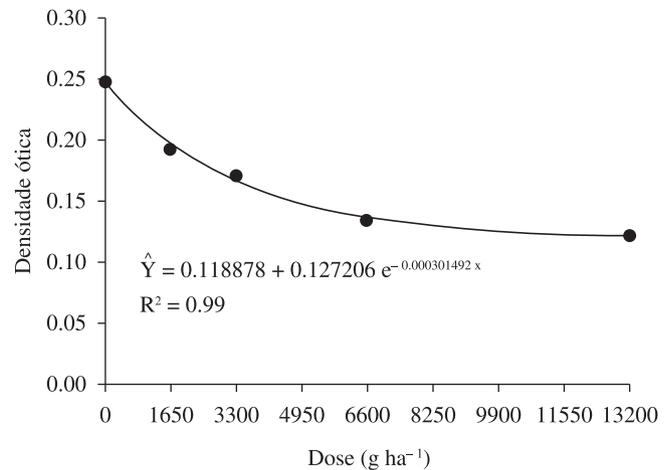


Figura 4. Crescimento de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, mensurado pela densidade ótica (450 nm), em meio de cultura contendo doses crescentes do inseticida carbofuran. Dose que inibe o crescimento da bactéria em 50% = 11.341 g ha^{-1} .

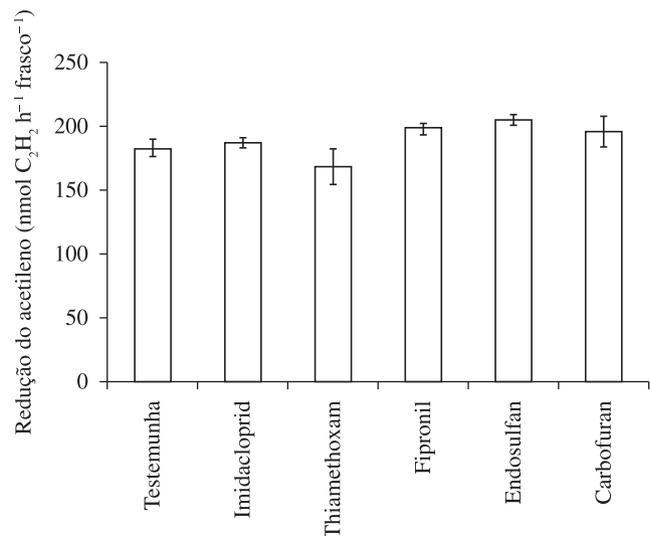


Figura 5. Atividade de nitrogenase (produção de etileno) por *Gluconacetobacter diazotrophicus* na presença de cinco inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. Nenhum tratamento diferiu da testemunha pelo teste de Dunnett a 5% de significância.

o que demonstra alto nível de seletividade desses xenobióticos a essa bactéria diazotrófica. Os dados encontrados neste trabalho não corroboram os de Madhaiyan et al. (2006), que relataram que o inseticida endosulfan, na sua dose recomendada, ocasionou 33,4% de redução na atividade de nitrogenase de *G. diazotrophicus*, em contraste com os inseticidas monochlorophos, dichlorvos e lindane, que inibiram totalmente a atividade de nitrogenase dessas bactérias. Os autores ainda descrevem que os inseticidas malathion e chlorpyrifos inibiram a atividade de nitrogenase dessa espécie em 80,9 e 83,3%, respectivamente. Estes resultados também diferem dos encontrados por Fox et al. (2007), que apresentaram evidências *in vivo* de redução da atividade da

nitrogenase em alfafa inoculada com *Sinorhizobium meliloti* na presença de um grupo de pesticidas organoclorados.

É importante salientar que os dados obtidos no presente trabalho foram decorrentes da utilização dos inseticidas na formulação comercial, ou seja, o princípio ativo mais todos os demais ingredientes da formulação, tal qual o mesmo é comercializado e, conseqüentemente, utilizado na agricultura. Segundo Malkones (2000), 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. (1988), é possível que solventes, surfactantes e agentes molhantes presentes nas formulações comerciais de pesticidas contribuam para os efeitos inibitórios desses produtos no crescimento de rizóbios, outro grupo de bactérias fixadoras de N.

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 (CAVALCANTI et al., 2002). Dessa forma, espera-se que produtos considerados compatíveis nesse tipo de teste também o sejam quando aplicados em condições de campo.

4 Conclusões

Os inseticidas endossulfan e thiamethoxam aumentam o tempo necessário para se elevar a absorvância em meio contendo a bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus*, refletido possivelmente pelo aumento na duração da fase lag.

Os inseticidas imidacloprid, fipronil, thiamethoxam, endossulfan e carbofuran não ocasionam nenhum efeito deletério à fixação biológica de nitrogênio (FBN) *in vitro* de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Referências

ANDALÓ, V.; MOINO JUNIOR, A.; SANTA-CECÍLIA, L. V. V.; 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, p. 463-467, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2004000400011>

ARRUDA, J. S.; LOPES, N. F.; MOURA, A. B. Behavior of *Bradyrhizobium japonicum* strains under different herbicide concentrations. *Planta Daninha*, v. 19, p. 111-117, 2001. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582001000100013>

BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; LAMAS, C. Effect of thiamethoxan on entomopathogenic microorganisms. *Neotropical Entomology*, v. 30, p. 437-447, 2001. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2001000300017>

CAVALCANTE, V. A.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, v. 108, p. 23-31, 1988. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02370096>

CAVALCANTI, R. S.; MOINO JUNIOR, 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, p. 17-22, 2002.

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. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 58, p. 463-468, 1997. PMID:9008058. <http://dx.doi.org/10.1007/s001289900357>

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas*. Brasília: Embrapa/SPI; Itaguaí: Embrapa/CNPAB, 1995. 60 p.

DUTTA, D.; GACHHUI, R. Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov. isolated from Kombucha tea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 57, p. 353-357, 2007. PMID:17267978. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.64638-0>

FOX, J. E.; GULLEDGE, J.; ENGELHAUPT, E.; BUROW, M. E.; McLACHLAN, J. A. Pesticides reduce symbiotic efficiency of nitrogen-fixing rhizobia and host plants. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 104, p. 10282-10287, 2007. PMID:17548832 PMID:1885820. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0611710104>

GOMEZ, F.; SALERON, V.; RODELAS, B.; MARTINEZ-TALEDO, M. V.; GONZALEZ-LOPEZ, J. Response of *Azospirillum brasilense* to the pesticides bromopropylate and methidathion on chemically defined media and dialysed-soil media. *Ecotoxicology*, v. 7, p. 43-47, 1998. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008807701523>

HAAHTELA, K.; WARTIOVAARA, T.; SUNDMAN, V., SKUJINS, J. Root-associated N₂ fixation (acetylene reduction) by Enterobacteriaceae and *Azospirillum* strains in cold-climate spodosols. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 41, p. 203-206, 1981. PMID:16345687 PMID:243664.

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, p. 85-96, 2005. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-005-2581-0>

KANUNGO, P. K.; ADHYA, T. K.; RAO, V. R. Influence of repeated application of carbofuran on nitrogenase activity and nitrogen fixing bacteria associated with rhizosphere of tropical rice. *Chemosphere*, v. 31, p. 3249-3257, 1995. [http://dx.doi.org/10.1016/0045-6535\(95\)00186-C](http://dx.doi.org/10.1016/0045-6535(95)00186-C)

KERSTERS, K.; LISDIYANTI, P.; KOMAGATA, K.; SWINGS, J. The Family *Acetobacteraceae*: The genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. (Eds.). *The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria: Proteobacteria: Alpha and beta sub classes*. New York: Springer, 2006. v. 5, p.163-200.

KISHINEVSKY, B.; LOBEL, R.; LIFSHITZ, N.; GURFEL, D. Effects of some commercial herbicides on rhizobia and their symbiosis with peanuts. *Weed Research*, v. 28, p. 291-296, 1988. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3180.1988.tb00806.x>

- 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, p. 143-154, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.06.004>
- MADHAIYAN, M.; SARAVANAN, V. S.; BHAKIYA, S. S. J. D.; LEE, H. S.; THENMOZHI, R.; HARI, K.; SA, T. M. Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. *Microbiological Research*, v. 159, p. 233-243, 2004. PMID:15462523. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2004.04.001>
- 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, 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, p. 101-114, 2006. <http://dx.doi.org/10.1007/s10705-006-9015-0>
- MOINO JUNIOR, A.; ALVES, S. B. Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 27, p. 611-619, 1998. <http://dx.doi.org/10.1590/S0301-80591998000400014>
- MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; VADIVELU, M. Antagonistic potential of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophic* against *Colletotrichum falcatum* Went.: a causal organism of red-rot of sugarcane. *Current Science*, v. 78, p. 1063-1065, 2000.
- PHAM, C. H.; MIN, J.; GU, M. B. Pesticide induced toxicity and stress response in bacterial cells. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 72, p. 380-386, 2004. PMID:15106776. <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-003-8845-6>
- 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, p. 457-465, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582006000300006>
- YAMADA, Y.; HOSHINO, K. I.; ISHIKAWA, T. *Gluconacetobacter* nom.corrig. *Gluconacetobacter* (sic). In: Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List no. 64. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 48, p. 327-328, 1998. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-48-1-327>
- YONEYAMA, T.; MURAOKA, T.; KIM, T. H.; DACANAY, E. V.; NAKANISHI, Y. The natural ¹⁵N abundance of sugarcane and neighboring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). *Plant and Soil*, v. 189, p. 239-244, 1997. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1004288008199>