



ARTIGO ORIGINAL

Marcelo Ferreira Fernandes<sup>1</sup>  
Sergio de Oliveira Procópio<sup>2\*</sup>  
Daniele Araújo Teles<sup>3</sup>  
José Guedes de Sena Filho<sup>1</sup>  
Alberto Cargnelutti Filho<sup>4</sup>  
Thadeu Nascimento Machado<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Tabuleiros Costeiros, Av. Beira Mar, 3250, Jardins, 49025-040, Aracaju, SE, Brasil

<sup>2</sup>Embrapa Soja, Rod. Carlos João Strass, Distrito de Warta, 86001-970, Londrina, PR, Brasil

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

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

**Autor Correspondente:**

\*E-mail: [procopio.so@gmail.com](mailto:procopio.so@gmail.com)

**PALAVRAS-CHAVE**

Fixação biológica de nitrogênio  
Pesticidas  
*Saccharum* spp

**KEYWORDS**

Biological nitrogen fixation  
Pesticides  
*Saccharum* spp

## Toxicidade de inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar para a bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*

### *Toxicity of insecticides used in sugarcane crop to the diazotrophic bacteria Herbaspirillum seropedicae*

**RESUMO:** Apesar de a cana-de-açúcar responder à adubação nitrogenada, principalmente na cana-soca, o uso de fontes minerais de N constitui-se em um dos fatores de maior impacto sobre o custo de produção da cana-de-açúcar. Estudos apontam que a utilização de bactérias diazotróficas pode suprir parte da necessidade de nitrogênio da cana-de-açúcar. Objetivou-se, neste trabalho, identificar inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar que não afetam o crescimento – ou não causam prejuízos à capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) – da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*. Cinco inseticidas (imidacloprid, fipronil, thiamethoxam, endosulfan e carbofuran) foram testados, em suas respectivas doses comerciais, quanto ao impacto sobre os parâmetros de crescimento da bactéria. Os parâmetros analisados foram duração da fase lag, tempo de geração e densidade celular máxima. Também foi avaliado o impacto dos inseticidas na atividade da nitrogenase de *H. seropedicae* cultivada em meio semissólido. Os inseticidas endosulfan e carbofuran prejudicaram o crescimento da bactéria diazotrófica *H. seropedicae*, contudo não reduziram a FBN *in vitro*. Carbofuran promoveu aumento no tempo de geração e redução na duração da fase lag de *H. seropedicae*; o inseticida endosulfan, por sua vez, ocasionou aumento na duração da fase lag. Os inseticidas imidacloprid, fipronil e thiamethoxam não ocasionaram nenhum efeito deletério tanto no crescimento quanto ao FBN *in vitro* de *H. seropedicae*.

**ABSTRACT:** Although sugarcane crop responds to nitrogen fertilization, especially in sugarcane ratoon, the use of mineral sources of N is one of the factors of great economic impact in sugarcane production. Studies indicate that the use of diazotrophic bacteria can supply part of the need of nitrogen for this crop. The objective of this study was to identify pesticides used in the cultivation of sugarcane that do not affect the growth or cause harm to the ability of biological nitrogen fixation (BNF) of the diazotrophic bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. Five insecticides (imidacloprid, fipronil, thiamethoxam, endosulfan and carbofuran) were tested in their respective commercial doses regarding their impact on bacteria growth. The parameters analyzed were duration of the lag phase, generation time and maximum cell density. The impact of pesticides on the nitrogenase activity of *H. seropedicae* grown in semi-solid medium was also assessed. Endosulfan and carbofuran hindered the growth of diazotrophic bacteria *H. seropedicae*, but did not reduce the BNF *in vitro*. Carbofuran increased the generation time and reduced the lag phase duration of *H. seropedicae*. Endosulfan increased its lag phase duration. Imidacloprid, fipronil and thiamethoxam did not cause any toxic effects to the growth and BNF *in vitro* of the diazotrophic bacterium *H. seropedicae*.

## 1 Introdução

Apesar de a cultura da cana-de-açúcar responder à adubação nitrogenada – principalmente, quando em cana-soca –, o uso de fontes minerais de N constitui-se em um dos fatores de maior impacto sobre o custo de produção da cana-de-açúcar. Recentemente, tem-se registrado um aumento acentuado e contínuo no preço dos adubos nitrogenados, o qual está diretamente atrelado às consecutivas altas do petróleo no mercado internacional (NOVAIS et al., 2007). Esta associação na variação dos preços decorre do fato de a síntese destes fertilizantes depender da energia gerada a partir da queima de hidrocarbonetos fósseis. O principal fertilizante mineral utilizado na cultura da cana-de-açúcar, a ureia, apresenta problema de volatilidade, necessitando ser incorporada para a diminuição de perdas (DENMEAD et al., 1990). No entanto, com o advento da colheita sem queima, designada de cultivo de cana-crua, a densa camada de palha que pode ficar sobre a superfície do solo dificulta muito a operação de incorporação da ureia e pode reduzir drasticamente a eficiência dessa adubação.

A capacidade de fixação biológica do N por bactérias associadas a plantas não leguminosas tem sido frequentemente 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 e 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 (REIS et al., 2000). Experimentos mostram que, dependendo da cultivar de cana-de-açúcar, a quantidade de N fixado pode variar de 4 a 70% do total de N contido nas plantas (ASIS et al., 2002).

Uma das espécies de bactérias diazotróficas que vêm sendo estudadas com resultados extremamente promissores é a *Herbaspirillum seropedicae*. Essa bactéria endofítica é encontrada em grandes populações nos tecidos da cana-de-açúcar, sendo capaz de fixar N atmosférico em locais com altas concentrações de sacarose e pH variando de 5,3 a 8,0 (OLIVARES et al., 1996). Estudos de dinâmica populacional de bactérias do gênero *Herbaspirillum* mostram que a população parece ser maior nas raízes e na parte basal dos colmos, diminuindo gradualmente em direção à parte superior dos colmos e nas folhas (QUADT-HALLMANN; KLOEPPER, 1996).

O elevado uso de pesticidas na agricultura moderna pode causar efeitos indesejados sobre organismos não alvos, incluindo microrganismos envolvidos no ciclo do nitrogênio, que são essenciais na manutenção da fertilidade do solo (DOMSCH; JAGNOW; ANDERSON, 1983). Um meio de se testar a toxicidade de pesticidas para bactérias é avaliando a inibição que esses compostos possam causar sobre o crescimento desses microrganismos (BITTON; KOOPMAN, 1992). Costa et al. (2004) concluíram que os herbicidas butafenacil, 2,4-D, metribuzin, s-metolachlor e trifloxysulfuron-sodium reduzem significativamente tanto o crescimento vegetativo como a reprodução do fungo *Metharizium anisopliae*. Laatikainen e Tanski (2002) mostraram que o glyphosate, em concentrações acima de 10 ppm, inibiu o crescimento dos fungos ectomicorrízicos *Hebeloma crustuliniforme*, *Laccaria laccata* e *Suillus tomentosum*.

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 deste trabalho foi identificar inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar que não afetam o crescimento ou que não causam prejuízos à capacidade de FBN da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*. Também, em caso de comprovação de alteração no crescimento da bactéria pelo inseticida, verificar qual o tipo de alteração promovida pelo agrotóxico.

## 2 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<sup>-1</sup> de água destilada, é a seguinte: glicose, 2,0; ácido málico, 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, pH 6,0. A cultura foi incubada a 25 °C por 24 horas, quando a densidade ótica (DO<sub>450nm</sub>) atingiu aproximadamente 0,7. Este mesmo procedimento de ativação das bactérias foi utilizado para a preparação do inóculo em todos os ensaios descritos a seguir.

Cinco inseticidas registrados para a cultura de cana-de-açúcar no Brasil foram avaliados (Tabela 1) quanto ao impacto sobre o crescimento e a fixação biológica de nitrogênio de

**Tabela 1.** Inseticidas utilizados e modo de ação.

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

*Herbaspirillum seropedicae* em condições de laboratório. Soluções estoques dos inseticidas foram preparadas com água destilada e filtrada por meio 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.

O efeito de doses comerciais de 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 inseticidas e incubados por 33 horas. 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 por meio de membrana Millipore. Os frascos foram inoculados com 40 µL de uma cultura de *H. seropedicae* ativa ( $DO_{450nm} = 0,6$ ). Após inoculação, os frascos foram rapidamente agitados e o conteúdo dos mesmos foi vertido 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. Com os resultados das leituras, foram traçadas curvas de crescimento bacteriano durante o período de avaliação, para os diferentes tratamentos.

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:

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

em que:  $\ln OD_{lag}$  =  $\ln$  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.

Os valores de 'g' e ' $t_{lag}$ ' foram estimados para cada uma das oito repetições separadamente.

O tempo de geração de *H. seropedicae* 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.

As médias de cada tratamento inseticida foram comparadas à do tratamento controle (sem inseticida) pelo teste de Dunnett ( $p < 0.05$ ).

Os inseticidas endossulfan e carbofuran, cujas doses comerciais apresentaram efeito significativo sobre o

crescimento de *H. seropedicae*, foram posteriormente avaliados para determinação das concentrações requeridas 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 destes inseticidas foram testadas (endossulfan – 0, 2.800, 5.600, 11.200 e 22.400 g ha<sup>-1</sup>; carbofuran – 0, 825, 1.650, 3.300 e 6.600 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 9 horas a 32 °C no escuro, sendo a leitura da DO realizada ao final desse período, que foi suficiente para a obtenção dos resultados.

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

Os inseticidas foram testados quanto ao impacto na atividade da nitrogenase de *H. seropedicae* quando esta foi cultivada em meio semissólido JNFb livre de N (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995). Alíquotas de 20 µL de uma cultura de *H. seropedicae* crescida sob agitação por 24 horas em meio DIGs líquido ( $DO = 0,7$ ) foram utilizadas para inocular frascos de 50 mL contendo 25 mL do meio semissólido com as diferentes concentrações de inseticidas a serem testadas. Os inseticidas foram adicionados ao meio semissólido utilizando-se 200 µL de soluções estoques de inseticidas esterilizadas por filtração. Estas soluções foram preparadas de modo que a adição de 200 µL destas a 25 mL de meio semissólido resultasse nas concentrações finais dos produtos determinadas 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. Os frascos foram fechados com tampão de algodão e incubados por 24 horas, 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 por meio de uma seringa hipodérmica.

A produção de etileno foi determinada após 12 horas 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, 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 inseticidas sobre a atividade de redução do acetileno (ARA) foram comparados

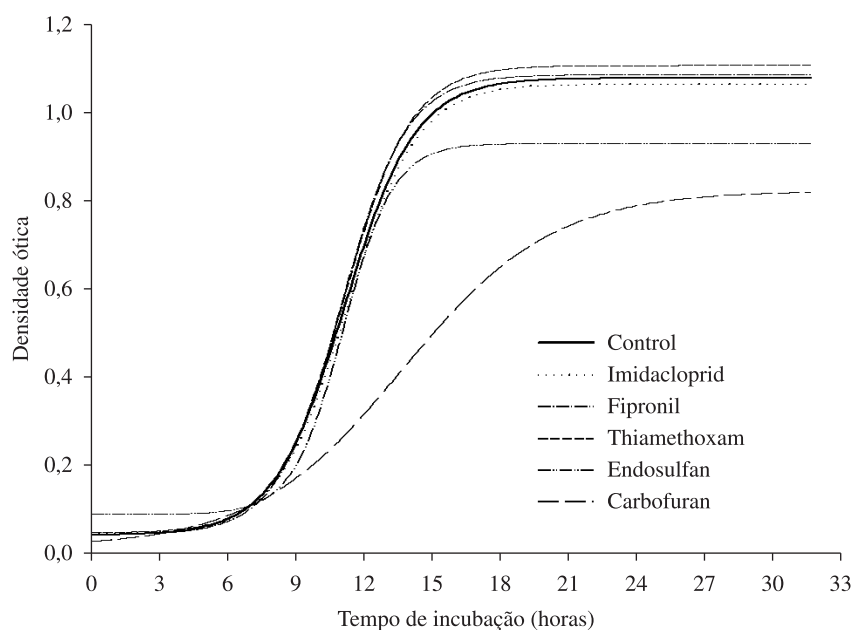
ao tratamento controle pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ). As eventuais porcentagens de inibição causadas pelos inseticidas foram calculadas.

### 3 Resultados e Discussão

A curva de crescimento, baseada no aumento da densidade ótica, da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* sob o efeito de todos os tratamentos avaliados é visualizada na Figura 1, sendo as equações, que representam o modelo sigmoidal de regressão, apresentadas na Tabela 2. Observa-se que as curvas de crescimento da bactéria em meio de cultura contendo os inseticidas imidacloprid, fipronil e thiamethoxam, nas suas respectivas doses comerciais, ficaram muito próximas à curva confeccionada quando a bactéria cresceu em meio isento de inseticidas (Figura 1). No entanto, nota-se que a presença dos inseticidas endosulfan e carbofuran alterou a dinâmica de crescimento de *H. seropedicae*.

Embora a avaliação de crescimento tenha sido realizada por 33 horas de incubação, o crescimento final máximo de

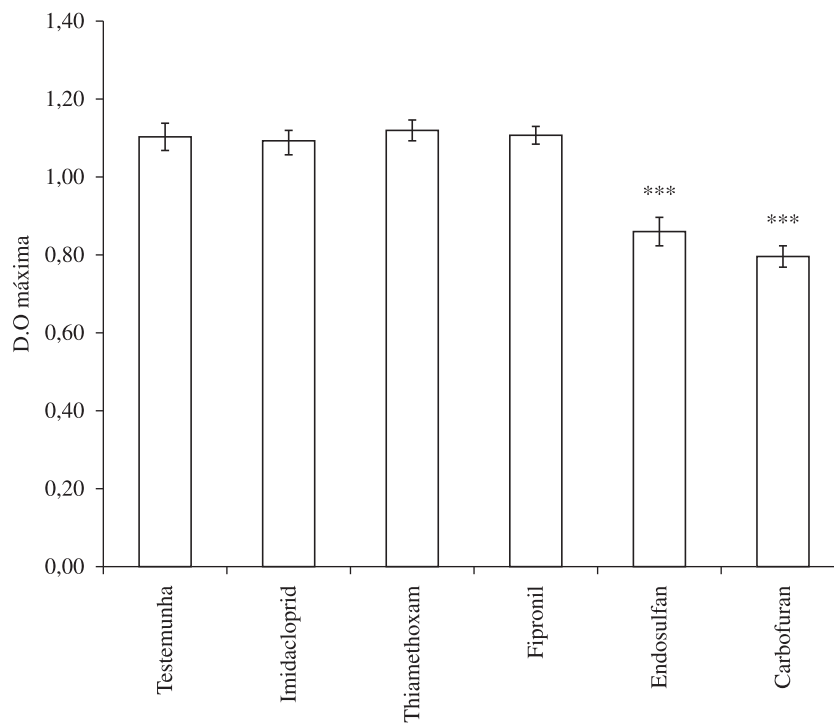
*H. seropedicae*, medido pela densidade ótica máxima (DO máxima) a 450 nm, foi atingido entre 15 e 20 horas, para todos os tratamentos. Este crescimento foi reduzido por apenas dois dos cinco inseticidas testados na dose comercial: endosulfan e carbofuran (Figura 2). Três mecanismos potencialmente associados 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 horas. Ao contrário do esperado, o inseticida carbofuran reduziu a fase lag em cerca de 1 hora, comparativamente ao controle sem inseticida (Figura 3). Madhaiyan et al. (2006) observaram que o inseticida endosulfan, na sua dose comercial, promoveu, em meio de cultura, um atraso inicial no crescimento de *Gluconacetobacter diazotrophicus*; contudo, após 70 horas de avaliação, o crescimento já se apresentava nos mesmos moldes



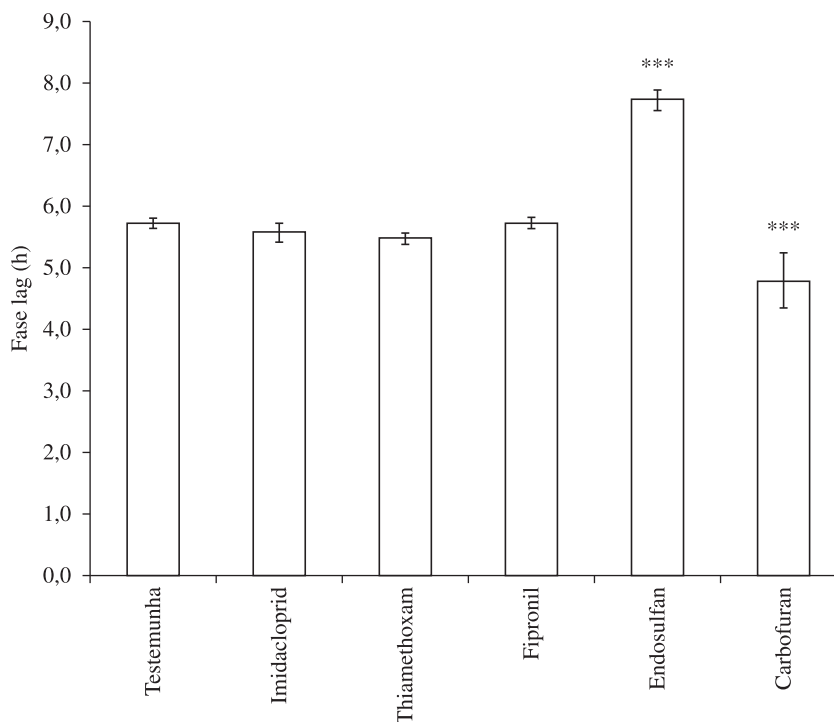
**Figura 1.** Crescimento da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*, mensurado pela densidade ótica (DO = 450 nm), em meio contendo cinco inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar.

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

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



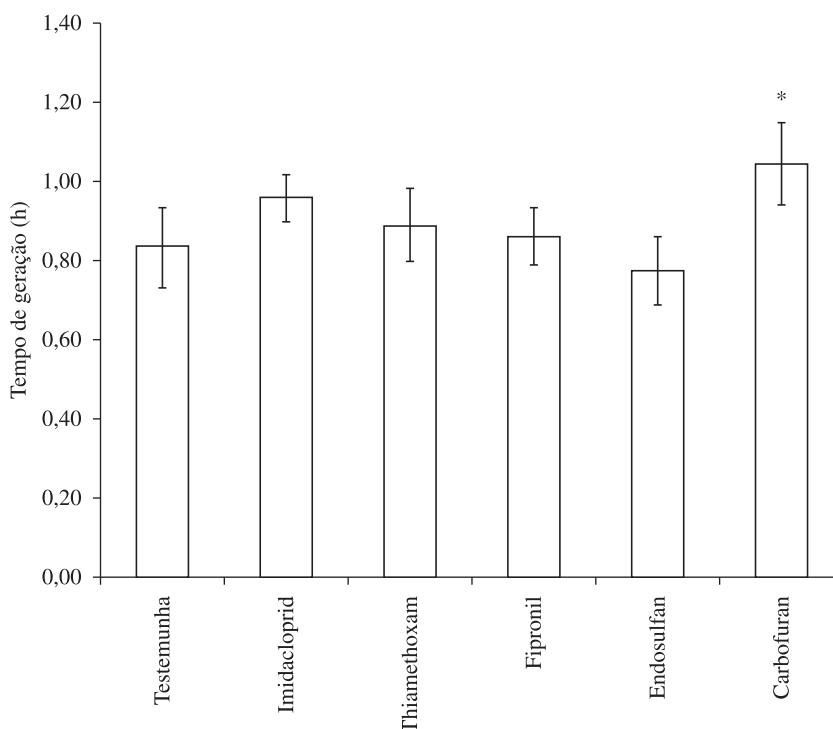
**Figura 2.** Crescimento máximo da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*, mensurado pela densidade ótica (DO = 450 nm), em meio contendo cinco inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. \*\*\*Significativo a 0,1% pelo teste de Dunnett.



**Figura 3.** 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.

do tratamento controle. 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.

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 horas (Figura 4).



**Figura 4.** 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.

Comparativamente, o tempo de geração médio para *H. seropedicae* em meio DIGs sem adição de herbicidas foi de 0,84 horas. Andaló et al. (2004) observaram que os inseticidas imidacloprid, thiamethoxam e carbofuran foram seletivos ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. Batista Filho, Almeida e Lamas (2001) evidenciaram que thiamethoxam foi compatível com os microrganismos *Aschersonia aleyrodis*, *Bacillus thuringiensis*, *Baculovirus anticarsia*, *Beauveria bassiana*, *Hirsutella thompsonii*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomurea rileyi*, *Paecilomyces farinosus*, *Sporothrix insectorum* e *Verticillium lecanii*.

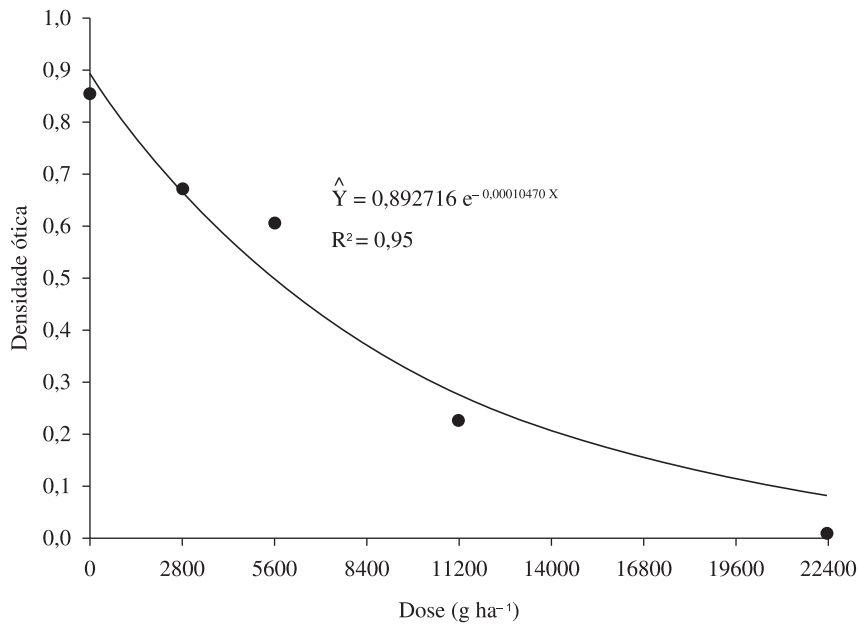
Observou-se que os dois inseticidas, imidacloprid e thiamethoxam, que atuam como agonistas da acetilcolina, não reduziram o crescimento de *H. seropedicae*, fato que pode ser uma característica de compostos com esse mecanismo de ação.

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.

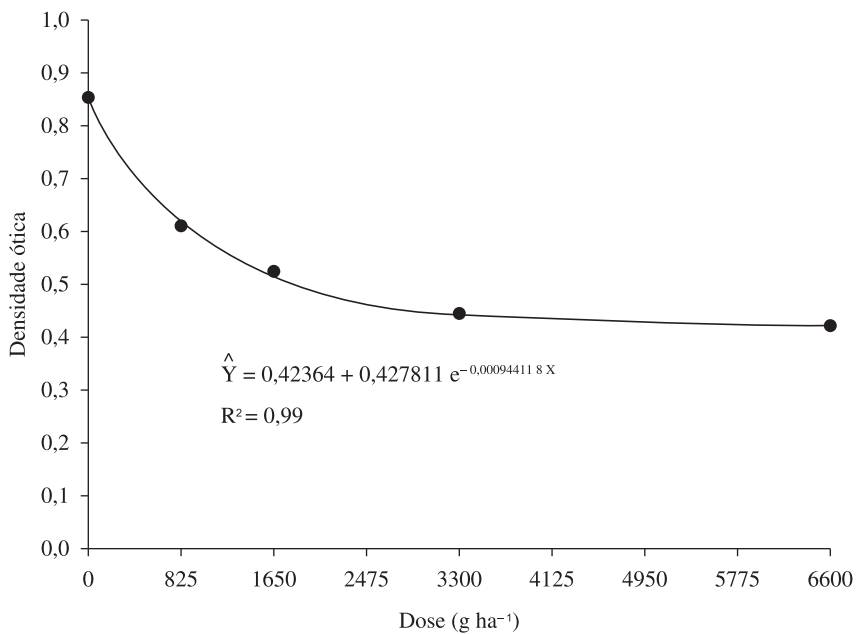
A dose do endosulfan que inibiu o crescimento de *H. seropedicae* em 50% ( $CI_{50}$ ) foi estimada em 6.620 g ha<sup>-1</sup>

(Figura 5), valor este que corresponde a uma dose maior que o dobro da dose recomendada para este inseticida. Para o carbofuran, a dose que inibiu o crescimento da bactéria em 50% ( $CI_{50}$ ) foi estimada em 5.639 g ha<sup>-1</sup> (Figura 6), valor superior ao triplo da dose recomendada do produto. Esses resultados representam doses que dificilmente ocorrerão em condições de campo, o que aumenta a segurança na aplicação desses compostos, no intuito de não prejudicar o crescimento dessa bactéria no ambiente de produção da cana-de-açúcar. Madhaiyan et al. (2006) relatam que o inseticida endosulfan reduziu em 50% o crescimento de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, quando foi adicionado ao meio na concentração aproximada de 8 µg mL<sup>-1</sup>, sendo esse valor muito acima da sua dose recomendada comercialmente. Resultados apresentados por Kanungo, Adhya e Rao (1995) mostram que aplicações sequenciadas do inseticida carbofuran promoveram incremento na população de *Azospirillum* sp. e *Azotobacter* sp. na rizosfera de plantas de arroz.

Os tratamentos inseticidas avaliados – imidacloprid, fipronil, thiamethoxam, endosulfan e carbofuran – não ocasionaram nenhum efeito deletério à fixação biológica de nitrogênio (FBN) de *H. seropedicae*, estirpe Z67 (Figura 7). Madhaiyan et al. (2006) reportaram que o inseticida endosulfan, na sua dose recomendada, ocasionou 33,4% de redução na atividade de nitrogenase de *Gluconacetobacter 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.



**Figura 5.** Crescimento da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*, mensurado pela densidade ótica (DO = 450 nm), em meio de cultura contendo doses crescentes do inseticida endossulfan.

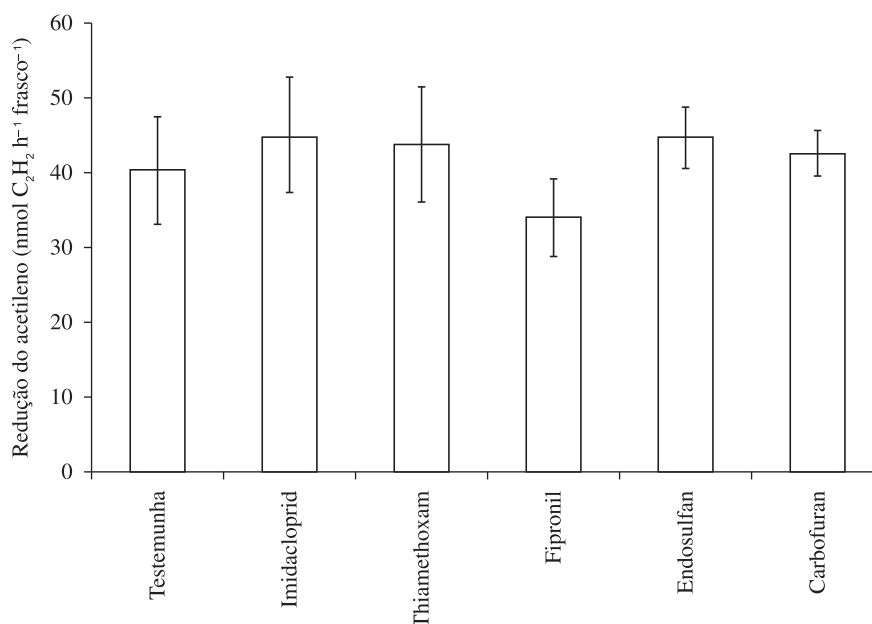


**Figura 6.** Crescimento da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*, mensurado pela densidade ótica (DO = 450 nm), em meio de cultura contendo doses crescentes do inseticida carbofuran.

Trabalhos mostram que os inseticidas bromopropylate (GOMEZ et al., 1998), carbaryl (GALLORI et al., 1991), diazinon (GOMEZ et al., 1999), dieldrin (GALLORI et al., 1991), malathion (GALLORI et al., 1991) e pyrethrin (GALLORI et al., 1991) são seletivos para bactérias do gênero *Azospirillum*. Já os inseticidas endossulfan (BUFF; MANO; LANGENBACH, 1992), methidathion (GOMEZ et al., 1998) e profenofos (GOMEZ et al., 1999) são colocados como tóxicos ou como compostos que diminuem o crescimento

ou a atividade metabólica dessas diazotróficas. Em relação ao inseticida carbofuran, trabalhos mostram que este pode incrementar a capacidade de fixação de N por *Azospirillum* sp. (KANUNGO; RAMAKRISSHAN; RAJARAMAMOHAN, 1998).

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 é comercializado, e



**Figura 7.** Atividade de nitrogenase (produção de etileno) por *Herbaspirillum seropedicae* na presença de cinco inseticidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. Teste de Dunnett a 5% de significância.

consequentemente 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, surfatantes 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.

Pela análise dos resultados de crescimento de *H. seropedicae* sob a influência dos inseticidas endosulfan e carbofuran, seria recomendável a realização de testes de campo a fim de se avaliarem os efeitos desses xenobióticos no desempenho dessa diazotrófica no fornecimento de N à cultura da cana-de-açúcar, quando da aplicação do inoculante comercial. Mesmo que esses pesticidas não tenham prejudicado a FBN *in vitro*, o que é um ótimo indicativo de seletividade, o ensaio de campo ainda assim é justificável e importante para dirimir qualquer dúvida sobre a compatibilidade desses inseticidas com a técnica da inoculação. É relevante ressaltar que 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 endosulfan e carbofuran prejudicam o crescimento da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*, contudo não reduzem a fixação biológica de nitrogênio *in vitro*.

Carbofuran promove aumento no tempo de geração de *Herbaspirillum seropedicae* e redução na duração da fase lag.

Endosulfan aumenta a duração da fase lag de *Herbaspirillum seropedicae*.

Os inseticidas imidacloprid, fipronil e thiamethoxam não ocasionam nenhum efeito deletério tanto ao crescimento quanto à fixação biológica de nitrogênio *in vitro* de *Herbaspirillum seropedicae*.

## Referências

- ANDALÓ, V.; MOINO JUNIOR, 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, p. 463-467, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2004000400011>
- 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 Science & Plant Nutrition*, v. 48, p. 283-285, 2002. <http://dx.doi.org/10.1080/00380768.2002.10409202>
- BALOTA, E. L.; LOPES, E. S.; HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J. Inoculação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízico-arbusculares na cultura da mandioca. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 32, p. 627-639, 1997.
- 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>
- BITTON, G., KOOPMAN, B. Bacterial and enzymatic bioassays for toxicity testing in the environment. *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology*, v. 125, p. 1-22, 1992. PMID:1509175. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4612-2890-5\\_1](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4612-2890-5_1)



- BUFF, K.; MANO, D. M. S.; LANGENBACH, T. Effect of endosulfan on *Azospirillum lipoferum* growth, morphology, nitrogenase activity, and protein binding. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, p. 3173-3176, 1992. PMID:16348777 PMCID:183067.
- 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.
- 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 Biology & Biochemistry*, v. 30, p. 81-87, 1998. [http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(97\)00096-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(97)00096-5)
- COSTA, E. A. D.; MATALLO, M. B.; ALMEIDA, J. E. M.; LOUREIRO, E. S.; SANO, A. H. Efeito de herbicidas utilizados em can-de-açúcar no desenvolvimento invitro do fungo entomopatogênico *Matarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 14, p. 19-24, 2004.
- DENMEAD, O. T.; FRENEY, J. R.; JACKSON, A. V.; SMITH, J. W. B.; SAFFIGNA, P. G.; WOOD, A. W.; CHAPMAN, L. S. Volatilization of ammonia from urea and ammonium sulfate applied to sugarcane trash in North Queensland. *Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists*, v. 12, p. 72-78, 1990.
- 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.
- DOMSCH, K. H.; JAGNOW, G.; ANDERSON, T. H. An ecological concept for the assessment of side-effects of agrochemicals on soil microorganisms. *Residue Reviews*, v. 86, p. 65-105, 1983. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4612-5473-7\\_2](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4612-5473-7_2)
- GALLORI, E.; CASALONE, E.; COLELLA, C. M.; DALY, S.; POLSINELLI, M. 1,8-Naphthalic anhydride antidote enhances the toxic effects of captan and thiram fungicides on *Azospirillum brasilense* cells. *Research in Microbiology*, v. 142, p. 1005-1012, 1991. [http://dx.doi.org/10.1016/0923-2508\(91\)90011-X](http://dx.doi.org/10.1016/0923-2508(91)90011-X)
- GOMEZ, F.; MARTINEZ-TOLEDO, M. V.; SALMERON, V.; RODELAS, B.; GONZALEZ-LOPEZ, J. Influence of the insecticide profenofos and diazinon on the microbial activities of *Azospirillum brasilense*. *Chemosphere*, v. 39, p. 945-957, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00026-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00026-0)
- GOMEZ, F.; SALERON, V.; RODELAS, B.; MARTINEZ-TOLEDO, 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>
- 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)
- KANUNGO, P.; RAMAKRISHNAN, B.; RAJARAMAMOHAN, V. Nitrogenase activity of *Azospirillum* sp. isolated from rice as influenced by a combination of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N and an insecticides, carbofuran. *Chemosphere*, v. 36, p. 339-344, 1998. [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00274-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00274-9)
- 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>
- LAATIKAINEN, T.; TANSKI, H. H. Mycorrhizal growth in pure culture in the presence of pesticides. *Microbiological Research*, v. 157, p. 127-137, 2002. PMID:12002401. <http://dx.doi.org/10.1078/0944-5013-00139>
- 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>
- MALKONES, H. P. Comparison of the effects of differently formulated herbicides on soil microbial activities – a review. *Journal of Plant Diseases and Plant Protection*, v. 8, p. 781-789, 2000.
- NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. *Fertilidade do solo*. Viçosa: Sociedade Brasileira da Ciência do Solo, 2007. 1017 p.
- 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. *Biology and Fertility of Soils*, v. 21, p. 197-200, 1996. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00335935>
- QUADT-HALLMANN, A.; KLOEPPER, J. W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 42, p. 1144-1154, 1996. <http://dx.doi.org/10.1139/m96-146>
- REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. *Critical Reviews Plant Science*, v. 19, p. 227-247, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S0735-2689\(00\)80003-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0735-2689(00)80003-9)