

DESENVOLVIMENTO E FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO DA BACTÉRIA BURKHOLDERIA TROPICA EM DIFERENTES DOSES DOS HERBICIDAS

Willian Pies ¹

Lucas Andrey Schwerz ²

Ana Caroline Pereira da Luz ³

Sandra Petry ⁴

Tadeu Werlang ⁵

Siumar Pedro Tironi ⁶

Resumo:

O Brasil é o maior produtor mundial da cultura da cana-de-açúcar, e é reconhecido mundialmente como um grande produtor de bioenergia, especialmente pela produção de etanol. A cultura demanda grandes quantidades de nutrientes e recursos externos para atingir altas produtividades. Dentre os nutrientes, o que apresenta maior importância é o nitrogênio, necessitando fazer adubações de cobertura. A cultura possui algumas estratégias para aumentar a capacidade de absorção de N, dentre elas se destaca a associação com bactérias diazotróficas endofíticas. Esses microrganismos apresentam capacidade de colonização dos tecidos internos do vegetal, sem ocasionar danos, criando uma relação simbiótica, onde recebem abrigo enquanto produzem compostos benéficos e ajudam na fixação de nutrientes. O presente trabalho foi conduzido nos laboratórios de microbiologia e bromatologia da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), campus Chapecó - SC. Os tratamentos foram constituídos em um fatorial 4x4, com quatro repetições. O primeiro fator foi composto por diferentes herbicidas, sendo eles: diuron (Diuron Nortox®), imazapic (Pateau®), clomazone (Gamit®), sulfentrazone (Boral®), e o segundo fator, composto por concentrações dos herbicidas: (0, 50, 100 e 500 L L⁻¹ de meio de cultura). A bactéria foi obtida da coleção Embrapa Agrobiologia (*Burkholderia tropica*) e multiplicada em meio de cultura semissólido JMV. A cultura foi incubada a 30 °C por 48 horas, a densidade óptica (DO450 nm), padronizada para aproximadamente 0,7. O ensaio foi realizado com dois períodos de incubação, com 48 horas (para evitar deposição da massa de bactérias), para avaliação do crescimento bacteriano através de análise óptica (DO450 nm), turbidimetria e unidade formadora de colônias (UFC). E inoculação por 72 horas para avaliação da fixação de nitrogênio pelas bactérias. Os dados foram submetidos a análise de variância, pelo teste F, e quando apresentou significância, os dados foram comparados pelo teste Tukey, ambos ao nível de 5 % de probabilidade. Todos os herbicidas apresentaram interferências negativas sobre a fixação de nitrogênio, além de proporcionarem maiores quantidades de unidades formadoras de colônia da bactéria *Burkholderia tropica*. O herbicida diuron foi o único que apresentou influência positiva sobre os valores de turbidez. Os herbicidas diuron, imazapic e clomazone proporcionaram aumento nos valores de densidade óptica conforme o aumento das doses. Alguns herbicidas parecem estimular o desenvolvimento populacional da bactéria.

Palavras-chave: Herbicidas, Cana-de-açúcar, Bactérias diazotróficas

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

**DESENVOLVIMENTO E FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO DA BACTÉRIA BURKHOLDERIA TROPICA EM
DIFERENTES DOSES DOS HERBICIDAS**

¹ Aluno de graduação. piesuffs@gmail.com. Autor principal

² Aluno de graduação. lucas.schwerz1994@gmail.com. Co-autor

³ Aluno de graduação. anacarolinepdaluz@gmail.com. Co-autor

⁴ Aluno de graduação. tec.thebypetry@gmail.com. Co-autor

⁵ Aluno de graduação. tadeuwerlang@gmail.com. Co-autor

⁶ Docente. siumar.tironi@gmail.com. Orientador



DESENVOLVIMENTO E FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO DA BACTÉRIA *BURKHOLDERIA TROPICA* EM DIFERENTES DOSES DOS HERBICIDAS

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial da cultura da cana-de-açúcar, e é reconhecido mundialmente como um grande produtor de bioenergia, especialmente pela produção de etanol (MELLO et al., 2006). A cultura demanda grandes quantidades de nutrientes e recursos externos para atingir altas produtividades. Dentre os nutrientes, o que apresenta maior importância é o nitrogênio, necessitando fazer adubações de cobertura (SUMAN et al., 2008).

A cultura possui algumas estratégias para aumentar a capacidade de absorção de N, dentre elas se destaca a associação com bactérias diazotróficas endofíticas. Esses microrganismos apresentam capacidade de colonização dos tecidos internos do vegetal, sem ocasionar danos, criando uma relação simbiótica, onde recebem abrigo enquanto produzem compostos benéficos e ajudam na fixação de nutrientes (TAULÉ et al., 2011).

A incidência de plantas daninhas ocasiona um elevado período de controle com herbicidas (KUVA et al., 2003), por esse motivo, utilizam-se herbicidas pré-emergentes. A preocupação é como as bactérias vão se comportar na presença dos mesmos, sendo que podem manifestar efeitos negativos sobre as bactérias fixadoras de N (PROCÓPIO et al., 2014).

Estudos apontam que a utilização de alguns herbicidas na cana-de-açúcar, nas doses recomendadas, ocasionam impactos sobre a microfauna do solo, afetando o desenvolvimento da cultura (TIRONI et al., 2009). Também apresentam limitação no desenvolvimento de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* e *Herbaspirillum* (PROCÓPIO et al., 2011 e PROCÓPIO et al., 2014).

O objetivo do trabalho foi avaliar o progresso e fixação de nitrogênio *in vitro* de estirpes da bactéria diazotrófica *Burkholderia tropica* em diferentes doses dos herbicidas diuron, imazapic, clomazone e sulfentrazone.

2. METODOLOGIA

O presente trabalho foi conduzido nos laboratórios de microbiologia e bromatologia da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *campus* Chapecó – SC.

Os tratamentos foram constituídos em um fatorial 4x4, com quatro repetições. O primeiro fator foi composto por diferentes herbicidas, sendo eles: diuron (Diuron Nortox®), imazapic (Pateau®), clomazone (Gamit®), sulfentrazone (Boral®), e o segundo fator, composto por concentrações dos herbicidas: (0, 50, 100 e 500 µL L⁻¹ de meio de cultura).

A bactéria foi obtida da coleção Embrapa Agrobiologia (*Burkholderia tropica*) e multiplicada em meio de cultura semissólido JMV. Posteriormente foram multiplicadas em 10 mL de meio líquido, nas seguintes concentrações: 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de dextrose (D-glicose) e 20 g L⁻¹ de peptona, 0,5 g L⁻¹ de K₂HPO₄ e 0,5 g L⁻¹ de MgSO₄·7 H₂O (QUADROS et al., 2014). A cultura foi incubada a 30 °C por 48 horas, a densidade óptica (DO_{450 nm}), padronizada para aproximadamente 0,7.

Soluções estoque dos herbicidas foram preparadas, utilizando-se água destilada autoclavada e posteriormente exposta por 40 minutos em luz ultravioleta. As concentrações das soluções estoques foram determinadas de modo que a adição de 250 μL obtivesse a concentração desejada do herbicida, para cada tratamento, em 6 mL de meio de cultura.

A avaliação do efeito das concentrações dos herbicidas no crescimento e produção de nitrogênio da espécie de bactéria foi realizada em tubos de vidro, no qual foram adicionados: 5700 μL de meio do meio de cultura, com menor fonte de nitrogênio, utilizando-se 5 g L^{-1} de peptona; 250 μL de solução de herbicida; e 50 μL do cultivo de cada bactérias (DO de aproximadamente 0,7). O tratamento controle foi realizado sem a inoculação das bactérias, com volume de 50 μL de água destilada autoclavada.

O ensaio foi realizado com dois períodos de incubação, com 48 horas (para evitar deposição da massa de bactérias), para avaliação do crescimento bacteriano através de análise óptica ($\text{DO}_{450 \text{ nm}}$), turbidimetria e unidade formadora de colônias (UFC). E inoculação por 72 horas para avaliação da fixação de nitrogênio pelas bactérias.

Após as 48 horas de incubação foi realizada a diluição seriada, até a diluição 10^{10} , para contagem da população de bactérias diazotróficas, para isso foi realizada a tabela de McCrady para três repetições por diluição, somente nas maiores diluições (DÖBEREINER et al., 1995), para isso utilizou-se o meio YPD sólido, com adição de 20 g L^{-1} ágar.

Em seguida o meio submetido à avaliação de densidade óptica em espectrofotômetro (Gehaka, modelo UV-380G) com comprimento de ondas de 450 nm. Para melhorar a eficiência desta análise o meio foi diluído em 50% com água destilada. A testemunha sem inoculação com bactérias foi utilizado como padrão para calibração do equipamento.

Após essa avaliação o meio foi submetido a análise de turbidimetria, utilizando se um turbidímetro (PoliControl, modelo Ap 2000), em que os valores da testemunha sem inoculação foram subtraído dos valores das amostras, em que os resultados foram expressos em NTU (Unidade de Turbidez Nefelométrica).

No ensaio para avaliação do nitrogênio total incorporado pelas bactérias, o tempo de incubação foi de 72 horas, a 30 °C. Passado esse período, 0,5 mL do meio foi transferido para tubos de digestão, que posteriormente foi adicionado 2 mL de ácido sulfúrico e realizada a digestão em bloco de digestão, utilizando a temperatura de 380 °C, seguindo o método de Kjeldahl para quantificação de N total (COTTA et al., 2007), com avaliação do nitrogênio diretamente das bactérias e do meio líquido (KUSS et al., 2007).

Os dados foram submetidos à análise de variância, apelo teste F, e quando apresentou significância, os dados foram comparados pelo teste Tukey, ambos ao nível de 5 % de probabilidade.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Todas as variáveis analisadas para a bactéria *B. tropica* apresentaram interação entre os fatores herbicidas e doses. A variável teor de N do meio de cultura, avaliando os diferentes herbicidas, apresentou maiores valores no diuron na dose 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ e para o imazapic na dose de 500 $\mu\text{L L}^{-1}$. Nas demais doses não observou-diferença entre os herbicidas para essa variável (Tabela 1).

Considerando as doses, dentro de cada herbicida, observou-se redução do teor de N, quando comparadas com a testemunha (dose zero), dado que para o

herbicida imazapic apenas as doses 100 e 500 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram redução, porém nos tratamentos com imazapic, clomazone e sulfentrazone observou-se redução em todas as doses. Com esses resultados pode-se perceber a redução da fixação de N atmosférico mesmo em baixas doses dos herbicidas testados. Os aumentos nas doses dos herbicidas podem modificar o metabolismo das células bacterianas alterando a atividade da nitrogenase, como observado para os herbicidas butachlor, alachlor e atrazine, utilizados na dose recomendada, que inibiram a atividade da nitrogenase da bactéria *G. diazotrophicus* em 22,8; 73,6 e 65,3%, respectivamente (MADHAIYAN et al., 2006).

O número de unidades UFC, apresentou grande variação com os herbicidas e doses. Analisando os herbicidas, dentro das doses, observa-se que na dose de 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ o imazapic reduziu o valor dessa variável, já na dose acima de 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ somente o diuron apresentou valor superior. Na maior dose o sulfentrazone proporcionou menor valor da UFC (Tabela 1). Algumas bactérias são naturalmente resistentes a alguns herbicidas, como algumas dos gêneros *Burkholderia* e *Bradyrhizobium*, que foram selecionados como potencialmente degradadoras do herbicida atrazine (FANGA et al., 2015), herbicida que apresenta o mesmo mecanismo de ação do diuron.

Analisando as doses, dentro de cada herbicida, observa-se que nos tratamentos com clomazone o menor valor da UFC foi observado na testemunha e no diuron na testemunha e na dose 50 $\mu\text{L L}^{-1}$, não havendo diferenças nas demais doses. No entanto, o imazapic promoveu aumento da UFC nas doses de 100 e 500 $\mu\text{L L}^{-1}$. O sulfentrazone proporcionou maior valor para essa variável nas doses intermediárias. Esses resultados evidenciam que os herbicidas podem causar distúrbios no meio que promovem a multiplicação das células da bactéria *B. tropica*.

Tabela 1. Teor de nitrogênio (g L^{-1}), unidade formadora de colônia (milhões mL^{-1}), densidade ótica (450 nm) e turbidez (NTU) do meio de cultura cultivado com a bactéria *Burkholderia tropica*, em função de diferentes herbicidas e doses

Bactéria <i>Enterobacter</i> tropical, em função de diferentes herbicidas e doses				
Dose ($\mu\text{L L}^{-1}$)	Herbicida			
	Diuron	Imazapic	Clomazone	Sunfrentazone
Teor de nitrogênio (g L^{-1})				
0	0,343 aA*	0,350 aA	0,322 aA	0,353 aA
50	0,316 aA	0,281 bAB	0,240 bB	0,238 bB
100	0,238 bA	0,254 bA	0,233 bA	0,238 bA
500	0,224 bB	0,274 bA	0,233 bAB	0,238 bAB
CV %	7,42			
Unidade formadora de colônia (milhões mL^{-1})				
0	838,40 bA	846,78 cA	910,98 bA	774,20 cA
50	1151,24 aA	859,72 cB	1094,23 abA	1099,98 aA
100	1273,41 aA	1132,56 bAB	1068,84 abB	918,69 abB
500	1246,58 aA	1379,76 aA	1207,29 aA	927,51 bcB
CV %	9,89			
Densidade ótica (450 nm)				
0	0,88 bA	0,88 cA	0,95 bA	0,81 cA
50	1,20 aA	0,90 cB	1,14 abA	1,15 aA
100	1,33 aA	1,18 bAB	1,12 abB	0,96 bB
500	1,30 aA	1,44 aA	1,26 aA	0,97 bcB
CV %	9,89			

Turbidez (NTU)				
0	84,13 bA	73,33 abA	76,85 abA	54,95 aA
50	101,80 abA	47,58 bB	36,95 cB	60,05 aB
100	123,68 aA	51,00 bB	54,73 bcB	39,28 aB
500	127,13 aA	82,85 aB	90,83 aB	30,77 aC
CV %	23,16			

* Médias seguidas de letras iguais, minúsculas na coluna, dentro de cada variável e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O estímulo do crescimento bacteriano com a aplicação de herbicidas foram relatados em alguns estudos (PATNAIK & RAO, 1994; DAS & DEBNATH, 2006), no entanto, os mecanismos que levam a esse comportamento não foram completamente elucidados. Apesar do fato de alguns herbicidas serem degradados por algumas bactérias (FANGA et al., 2015), que podem utilizar o composto químico como fonte de energia e carbono.

Na variável densidade óptica observa-se, na análise entre os herbicidas, dentro das doses, menor valor no herbicida imazapic na dose de 50 $\mu\text{L L}^{-1}$, maior valor no tratamento com diuron na dose de 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ e menor valor no tratamento com sulfetrazone na maior dose (500 $\mu\text{L L}^{-1}$) (Tabela 1).

O diuron pode não causar nenhuma interferência no desenvolvimento das bactérias do gênero *Burkholderia*, pois algumas espécies desse gênero, inoculadas na cultura da cana-de-açúcar, são potencialmente degradadoras desse herbicida (NGIGI et al., 2011), dessa forma o herbicida possivelmente não apresenta toxicidade aos microrganismos, podendo até servir de alimento para o mesmo. Considerando as doses, dentro de cada herbicida, observa-se menor valor para densidade óptica na testemunha (dose zero) para os herbicidas diuron e clomazone. Nos tratamentos com imazapic observou-se aumento do valor de densidade óptica com o aumento da dose, e nos tratamentos com sulfentrazone o maior valor foi observado na dose 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Tabela 1).

A turbidez do meio de cultura apresentou alteração com os tratamentos testados. Em análise dos herbicidas, observam-se valores superiores para o diuron em qualquer uma das doses (menos dose zero), os demais tratamentos não diferiram entre si, com exceção para o sulfentrazone na maior dose, que apresentou menores valores para essa variável (Tabela 1). Observando as doses, dentro de cada herbicida, verifica-se maior valor para a testemunha no tratamento com diuron, testemunha e maior dose para o imazapic e clomazone e não se verificou diferença entre as doses do sulfentazone.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os herbicidas apresentaram interferências negativas sobre a fixação de nitrogênio, além de proporcionarem maiores quantidades de unidades formadoras de colônia da bactéria *Burkholderia tropica*.

O herbicida diuron foi o único que apresentou influencia positiva sobre os valores de turbidez.

Os herbicidas diuron, imazapic e clomazone proporcionaram aumento nos valores de densidade óptica conforme o aumento das doses.

Alguns herbicidas parecem estimular o desenvolvimento populacional da bactéria.

5. REFERÊNCIAS

- COTTA, J.A.O. et al. Validação do método para determinação de Nitrogênio Kjeldahl Total. **Revista Analytica**, v.5, n.26, p.68-75, 2007.
- DAS, A. C.; DEBNATH, A. Effect of systemic herbicides on N₂-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.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília, EMBRAPA-SPI e Seropédica, EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60p.
- FANGA, H. et al. Exploring bacterial community structure and function associated with atrazine biodegradation in repeatedly treated soils. **Journal of Hazardous Materials**, v.286, n.2, p.457–465, 2015.
- KUSS, A.V. et al. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.10, p.1459-1465, 2007.
- KUVA, M.A. et al. Períodos de interferência das plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar. III – Capim-brachiaria (*Brachiaria decumbens*) e capim-colonião (*Panicum maximum*). **Planta Daninha**, v.21, n.1, p-37-44, 2003.
- MADHAIYAN, M. et al. Influence of pesticides on the growth rate and plant-growth promoting traits of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.84, n.2, p.143–154, 2006.
- MELLO, S. Q. S. et al. Parâmetros do valor nutritivo de nove variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob irrigação. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 373-380, 2006.
- PATNAIK, G. K.; RAO, R. Influence of ammonium and 2,4-dichlorophenoxy acetic acid on nitrogenase activity in *Azospirillum* species from rice rhizosphere. **Microbios**, v.80, n.1, p.17-22, 1994.
- PROCÓPIO, S.O. et al. Toxicidade de herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar à bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*. **Semina: Ciências Agrárias**, v.35, n.5, p.2383-2398, 2014.
- PROCÓPIO, S.O. et al. Toxicidade de herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar à bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense*. **Planta Daninha**, v.29, n. esp., p.1079-1089, 2011.
- QUADROS, P.D. et al. Desempenho agrônomo a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v.61, n.2, p. 209-218, 2014.
- SUMAN, A. et al. Nitrogen use efficiency of sugarcane in relation to its BNF potential and population of endophytic diazotrophs at different N levels. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 54, n. 1, p. 1-11, 2008.
- TAULÉ, C. et al. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant Soil**, v.356, n.1, p.35–49, 2012.
- TIRONI, S.P. et al. Ação de herbicidas na atividade de bactérias solubilizadoras de fosfato da rizosfera de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 27, n. 4, p. 747-754, 2009.