DESENVOLVIMENTO E FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO IN VITRO DE AZOSPIRILLUM AMAZONENSE EM DIFERENTES DOSES DE HERBICIDAS

Lucas Andrey Schwerz [1]

Sandra Petry [2]

Willian Pies [3]

Ana Caroline Pereira da Luz [4]

Tadeu Werlang [5]

Siumar Pedro Tironi [6]

Resumo:

A cultura da cana-de-açúcar, demanda elevadas quantidades de nutrientes para que se possa obter elevada produtividade. O nitrogênio é um dos principais nutrientes, sendo necessário o suprimento desse com adubação. A cana-de-açúcar associa-se naturalmente a algumas bactérias diazotróficas endofíticas que possuem a capacidade de fixar nitrogênio. Essas bactérias são benéficas a cultura, e possuem a capacidade de colonizar os tecidos internos das plantas sem causar danos. Esses organismos desenvolvem uma relação simbiótica, em que as bactérias são abrigadas enquanto promovem o crescimento da planta através da fixação de nutrientes e produção de compostos benéficos, como aminoácidos e fitormônios. Uma das preocupações para a inoculação da cana-de-açúcar com bactérias diazotróficas fixadoras de nitrogênio é o comportamento dessas bactérias na presença de herbicidas, pois o principal método de controle das plantas daninhas é com uso desses produtos químico. Com isso objetivou-se avaliar o desenvolvimento e fixação de nitrogênio in vitro de estirpes da bactéria diazotrófica Azospirillum amazonense em ambiente com diferentes doses dos herbicidas diuron, impazapic, clomazone e sulfentrazone. 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 quatro herbicidas, sendo eles: diuron (Diuron Nortox®), imazapic (Pateau®), clomazone (Gamit®), sulfentrazone (Boral®), e o segundo fator, composto por quatro concentrações dos herbicidas: (0, 50, 100 e 500 L L-1 de meio de cultura). A bactéria Azospirillum amazonense foi obtida da coleção Embrapa Agrobiologia e multiplicada em meio de cultura semissólido LGI. Posteriormente as bactérias foram multiplicadas, e a cultura incubada a 30 ºC 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), turbiodimetria e unidade dormadora de colônias (UFC); e inoculação por 72 horas para avaliação da fixação de nitrogênio pelas bactérias. Os dados foram submetidos a análise de variância, apelo teste F, e quando apresentou significância, os dados foram comparados pelo teste Tukey, ambos ao nível de 5 % de probabilidade. Todos herbicidas apresentaram influência negativa no teor de nitrogênio, sendo o sulfentrazone o que apresentou os menores valores. O número de unidades formadoras de colônias (UFC), apresentou grande variação com os herbicidas e doses. Observa-se que o imazapic e o sulfentrazone reduziram o valor de UFC, enquanto que o diuron promoveu o crescimento de colonias. A densidade óptica apresentou elevada alteração com a presença dos herbicidas, observou-se menores valores nos tratamentos com clomazone e na maior dose com sulfentrazone. A turbidez do meio de cultura apresentou menores valores para o sulfentrazone, em todas as doses do herbicida. Todos herbicidas testados interferem negativamente na fixação de nitrogênio. O sulfentrazone é o herbicida que mais causa danos a A. amazonense, enquanto Alguns herbicidas parecem estimular o crescimento populacional da bactéria

Palavras-chave: Bactérias diazotróficas; Simbiose; Cana-de-Açúcar

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

DESENVOLVIMENTO E FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO IN VITRO DE AZOSPIRILLUM AMAZONENSE EM DIFERENTES DOSES DE HERBICIDAS

[1] Aluno de graduação. lucas.schwerz1994@gmail.com. Autor principal

[2] Aluno de graduação. tec.thebypetry@gmail.com. Co-autor

[3] Aluno de graduação. piesuffs@gmail.com. Co-autor

[4] Aluno de graduação. anacarolinepdaluz@gmail.com. Co-autor

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

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

9º SIEPE SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO
o conhecimento vai além das fronteiras
21 a 23 de novembro de 2017
Fronteira da Paz
Universidade Federal do Pampa
Campus Santana do Livramento

DESENVOLVIMENTO E FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO *IN VITRO* DE *AZOSPIRILLUM AMAZONENSE* EM DIFERENTES DOSES DE HERBICIDAS

1. INTRODUÇÃO

Para se obter elevada produtividade, a cultura da cana-de-açúcar, demanda muitos recursos ambientais, dentre eles os nutrientes. Um dos nutrientes de maior demanda para a cana-de-açúcar é o nitrogênio, sendo necessário a realização do suprimento desse nutriente com adubação (SUMAN et al., 2008).

No entanto, a cana-de-açúcar associa-se naturalmente a algumas bactérias diazotróficas endofíticas que possuem a capacidade de fixar nitrogênio. Esses são microrganismos benéficos às plantas e possuem a capacidade de colonizar os tecidos internos do vegetal, sem causar enfermidades. Esses organismos desenvolvem uma relação simbiótica, em que as bactérias são abrigadas enquanto promovem o crescimento da planta através da fixação de nutrientes e produção de compostos benéficos (TAULÉ et al., 2011). Essas bactérias, além de fornecer nutrientes às plantas de cana-de-açúcar, podem promover seu crescimento através da síntese de compostos orgânicos, como aminoácidos e fitormônios.

Uma das preocupações para a inoculação da cana-de-açúcar com bactérias diazotróficas fixadoras de nitrogênio é o comportamento dessas bactérias na presença de herbicidas, pois o principal método de controle das plantas daninhas é com uso desses produtos químicos (PROCÓPIO et al., 2010).

Estudos apontaram que alguns herbicidas utilizados em cana-de-açúcar, em suas doses comerciais, podem causar a limitação do crescimento e/ou atividade de nitrogenase das bactérias diazotróficas *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* (PROCÓPIO et al., 2011 e PROCÓPIO et al., 2014). Outros estudos apontam que esses herbicidas podem causar impacto aos outros microrganismos do solo de elevada importância para a cultura da cana-de-açúcar (TIRONI et al., 2009).

Com isso objetivou-se avaliar o desenvolvimento e fixação de nitrogênio *in vitro* de estirpes da bactéria diazotrófica *Azospirillum amazonense* em ambiente com diferentes doses dos herbicidas diuron, impazapic, 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 quatro herbicidas, sendo eles: diuron (Diuron Nortox®), imazapic (Pateau®), clomazone (Gamit®), sulfentrazone (Boral®), e o segundo fator, composto por quatro concentrações dos herbicidas: (0, 50, 100 e 500 µL L^{-1} de meio de cultura).

A bactéria foi obtida da coleção Embrapa Agrobiologia e multiplicada em meio de cultura semissólido LGI. 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 K_2HPO_4 e 0,5 g L^{-1} de $MgSO_4.7\ H_2O$ (QUADROS et al., 2014). A cultura foi incubada a 30 ºC 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 essa solução foi exposta, por 40 minutos em luz ultra violeta. 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 realizado 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 ($DO_{450\ nm}$), turbiodimetria e unidade dormadora de colônias (UFC); e inoculação por 72 horas para avaliação da fixação de nitrogênio pelas bactérias. As inoculações foram realizadas a temperatura de 30 ºC.

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 foi submetido a avaliação de densidade óptica em espectrofotômertro (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 utilizada como padrão para calibração do equipamento. Após essa avaliação o meio foi submetido a análise de turbiodimetria, utilizando se um turbidimetro (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).

Na avaliação do nitrogênio total incorporado pelas bactérias, foram utilizados 0,5 mL do meio, que 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 ºC, 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 a 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 *A. amazonense* apresentaram interação entre os fatores herbicidas e doses (Tabela 1).

O teor de nitrogênio (N) do meio de cultura, na análise dos diferentes herbicidas, observa-se menores valores para o herbicida sulfentrazone, especialmente nas doses superiores a 100 µL L^{-1} do herbicida no meio de cultura. No entanto, os outros herbicidas apresentaram valores superiores para essa variável na maior dose. Esses resultados demonstram que o sulfentrazone causa maior interferência na fixação de nitrogênio (N) atmosférico pela *A. amazonense*.

Considerando as doses, de cada herbicida, observa-se redução do teor de N na maior dose de diuron, todas as doses de imazapic, nas doses de 50 e 500 µL L^{-1} de clomazone e nas duas maiores doses de sulfentrazone (Tabela 1). Esses herbicidas podem atuar de diversas formas na bactéria *A. amazonense* e promover a menor fixação de N. No entanto, alguns herbicidas como diuron, clomazone, imazapic e oxyfluorfen, este último que apresenta o mesmo mecanismo de ação do sulfentrazone, que não interferem na atividade da nitrogenase da bactéria *A. amazonense* (PROCÓPIO et al., 2011). Considerando, que nesse mesmo estudo, observou-se grande inibição da atividade dessa enzima pelo herbicida 2,4-D.

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 *Azospirillum amazonense*, em função de diferentes herbicidas e doses

	Herbicida			
Dose (µL L^{-1})	Diuron	Imazapic	Clomazone	Sunfrentazone
	Teor de nitrogênio (g L^{-1})			
0	0,288 aA*	0,297 aA	0,293 aA	0,297 aA
50	0,276 aA	0,220 bB	0,247 bAB	0,254 aAB
100	0,261 aA	0,178 bB	0,261 abA	0,103 bC
500	0,185 bA	0,192 bA	0,220 bA	0,069 bB
CV %		8,63		
	Unidade formadora de colônia (milhões mL^{-1})			
0	84,31cA	81,96 aA	82,51 aA	83,75 aA
50	179,16 aA	37,20 bB	28,89 bB	53,75 abB
100	124,61 bA	42,78 bB	44,97 bB	30,34 bcB
500	112,12 bA	55,18 bB	89,46 aB	20,52 cC
CV %		21,77		
	Densidade ótica (450 nm)			
0	0,34 cA	0,33 aA	0,33 aA	0,34 aA
50	0,72 aA	0,15 bB	0,12 bB	0,22 abB
100	0,50 bA	0,17 bB	0,18 bB	0,11 bcB
500	0,45 bA	0,24 bB	0,36 aB	0,09 cC
CV %		21,78		
	Turbidez (NTU)			
0	54,50 aA	49,00 aA	50,75 aA	53,75 aA
50	63,45 aA	58,95 aAB	26,85 aB	28,03 abB
100	72,00 aA	47,38 aAB	49,73 aAB	28,02 abB
500	69,55 aA	65,98 aA	59,20 aA	19,93 bB
CV %		35,29		

* 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 número de unidades formadoras de colônias (UFC), apresentou grande variação com os herbicidas e doses (Tabela 1). Em análise dos herbicidas, observa-se na dose de 50 µL L^{-1} que o imazapic reduziu o valor dessa variável, já na dose acima de 100 µL L^{-1} o sulfentrazone promoveu maior redução (Tabela 1).

Analisando as doses, em cada herbicida, observa-se que para o diuron houve um aumento dos valores da UFC em qualquer dose do herbicida. Já os herbicidas imazapic e clomazone apresentavam maiores valores na testemunha. Isso evidencia que os herbicidas podem estressar as células bacterianas, mas de alguma forma estimula o crescimento da população desses microrganismos. O estímulo de

acúmulo de biomassa da bactéria diazotrófica *Azospirillum* sp., quando exposta ao herbicida 2,4-D foi observado por do Patnaik & Rao (1994).

O sulfentrazone promoveu menores valores de UFC nas maiores doses (Tabela 1), demonstrando o efeito negativo desse herbicida sobre a *A. amazonense*. Essa bactéria pode apresentar maior suscetibilidade aos herbicidas do grupo dos inibidores da PROTOX, pois essa bactéria apesentou menor desenvolvimento quando presente ao herbicida oxyfluorfen (PROCÓPIO et al., 2011).

A densidade óptica, análise que estima a qualidade de células bacterianas em meio líquido, apresentou elevada alteração com a presença dos herbicidas no meio de cultura com a *A. amazonense* (Tabela 1). Na dose de 50 µL L^{-1} observou-se menores valores nos tratamentos com clomazone e na maior dose o sulfentrazone apresentou os menores valores (Tabela 1). Esses resultados demonstram que o sulfentrazone é o herbicida que mais causa danos a *A. amazonense*.

Considerando as doses, em cada herbicida, observa-se maiores valores nas testemunhas e quando aplicados os herbicidas imazapic, clomazone e sulfenrazone. O tratamento com sulfentrazone apresentou menor valor de densidade óptica na maior dose (Tabela 1).

O desenvolvimento em meio de cultura da bactéria *A. amazonense* apresenta baixa interferência por herbicidas, como diuron, imazapic e clomazone, nas doses comerciais, não interferiram no desenvolvimento da mesma (Procópio et al., 2011).

Com relação do possível efeito estimulante de alguns herbicidas no desenvolvimento da *A. amazonense*, a relatos que o herbicida oxyfluorfen aplicado em solo rizosférico em área cultivada com arroz ocasionou aumento de 42,8% na população de microrganismos fixadores de N, com aumento de 37,5% na fixação de N (DAS & DEBNATH, 2006)

A turbidez do meio de cultura, também é uma variável que estima, de forma indireta, a quantidade de células bacterianas no meio de cultura. Essa varável apresentou menores valores para o sulfentrazone, em todas as doses desse herbicida, que diferiu, de forma geral, do diuron (Tabela 1).

Observando as doses, dentro de cada herbicida, percebe-se que nenhuma das doses do diuron, imazapic e clomazone causaram interferência na turbidez do meio, apresentando valores símiles as testemunhas sem aplicação. Isso demonstra que esses herbicidas apresentam menor efeito negativo para o desenvolvimento da *A. amazonense*.

O herbicida sulfentrazone apresentou menor valor de turbidez quando aplicados na maior dose testada (Tabela 1), que indica o maior impacto desse herbicida na bactéria *A. amazonense*. Resultado semelhante aos encontrados por Procópio et al. (2011), em que a bactéria *A. brasilense* apresentou menor biomassa quando recebeu aplicação dos herbicidas paraquat, oxyfluorfen, trifloxysulfuron-sodium + ametryn e glyphosate, sem no entanto, apresentar influência negativamente de outros 14 herbicidas testados.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os herbicidas testados interferem negativamente na fixação de nitrogênio da bactéria *A. amazonense*.

O herbicida sulfentrazone apresentou maior efeito na limitação do crescimento da bactéria, com maiores efeitos nas maiores doses.

Alguns herbicidas parecem estimular o crescimento 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 N_2-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.

KUSS, A.V. et al. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. Pesquisa Agropecuaria 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.

QUADROS, P.D. et al. Desempenho agronômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum.* Revista Ceres, v.61, n.2, p. 209-218, 2014.

PATNAIK, G. K.; RAO, R. Influence of ammonium and 2,4-dichlorofhenoxy 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. Manejo de plantas daninhas. In: SANTOS, F.; BORÉM, A; CALDAS, C. Cana-de-açúcar Bionergia, açúcar e álcool: Tecnologias e Perspectivas. Editora UFV; Viçosa-MG, p.181-215, 2010.

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-deaçúcar à bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense*. Planta Daninha, v.29, n. esp., p.1079-1089, 2011.

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.