

**Compatibilidade entre ativos biológicos
bacterianos e agroquímicos utilizados na
produção de mudas de cana-de-açúcar**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Meio Ambiente
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO**
77

Compatibilidade entre ativos biológicos
bacterianos e agroquímicos utilizados na
produção de mudas de cana-de-açúcar

*Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira
Michelli de Souza dos Santos*

Embrapa Meio Ambiente
Jaguariúna, SP
2018

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Meio Ambiente
Rodovia SP-340, Km 127,5, Tanquinho Velho
Caixa Postal 69, CEP: 13820-000, Jaguariúna, SP
Fone: +55 (19) 3311-2610
Fax: +55 (19) 3311-2640
www.embrapa.br/meio-ambiente/
SAC: www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Meio Ambiente

Presidente
Ana Paula Contador Packer

Secretária-Executiva
Cristina Tiemi Shoyama

Membros
Rodrigo Mendes, Joel Leandro de Queiroga, Marco Antonio Ferreira Gomes, Maria Cristina Tordin, Nilce Chaves Gattaz, Ricardo Antonio Almeida Pazianotto, Vera Lucia Ferracini, Victor Paulo Marques Simão

Revisão de texto
Nilce Chaves Gattaz

Normalização bibliográfica
Maria de Cléofas Faggion Alencar

Projeto gráfico
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Silvana Cristina Teixeira

Foto da capa
Michelli de Souza dos Santos

1ª edição eletrônica (2018)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Meio Ambiente

Halfeld-Vieira, Bernardo de Almeida

Compatibilidade entre ativos biológicos bacterianos e agroquímicos utilizados na produção de mudas de cana-de-açúcar / Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira, Michelli de Souza dos Santos. -- Jaguariúna : Embrapa Meio Ambiente, 2018.

27 p. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Meio Ambiente, ISSN 1516-4675 ; 77).

1. Bactéria diazotrófica 2. Bactéria osmotolerante 3. Antagonismo 4. Antibiose 5. Incompatibilidade I. Santos, Michelli de Souza dos. II. Título. IV. Série.

CDD 633.69

© Embrapa, 2018

Sumário

| | |
|--------------------------|----|
| Resumo | 5 |
| Abstract | 6 |
| Introdução..... | 7 |
| Material e Métodos | 8 |
| Resultados | 12 |
| Discussão | 23 |
| Conclusões | 25 |
| Referências | 25 |

Compatibilidade entre ativos biológicos bacterianos e agroquímicos utilizados na produção de mudas de cana-de-açúcar

Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira¹

Michelli de Souza dos Santos²

Resumo - O objetivo deste trabalho foi determinar a compatibilidade entre ativos biológicos bacterianos e produtos químicos utilizados no sistema de produção de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar, e a compatibilidade mútua entre cinco bactérias diazotróficas e uma estirpe osmotolerante. Os produtos químicos utilizados foram o promotor de crescimento vegetal Biozyme TF, o inseticida Regent 800 WG (fipronil) e os fungicidas Priori Xtra (azoxistrobina + ciproconazol) e Comet (piraclostrobina). Os ativos biológicos compreenderam a bactéria osmotolerante *Bacillus aryabhattachai* (CMAA 1363), e as diazotróficas *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335), *H. rubrisubalbicans* (BR 11504), *Paraburkholderia tropica* (BR 11366), *Azospirillum amazonense* (BR 11145) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281). Cada bactéria foi exposta aos produtos na concentração máxima recomendada e semeadas em meio de cultura após 1, 6 e 24h de exposição, avaliando-se a sobrevivência celular para cada período com base no número de $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$. Foram construídas curvas de crescimento utilizando-se dados empregando a transformação logarítmica $\ln(\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1})$ juntamente com os respectivos intervalos de confiança para cada tratamento determinado. Para avaliar a compatibilidade mútua entre as bactérias promotoras de crescimento e a osmotolerante foram realizados ensaios de inibição em sobre-camada. O isolado de *A. amazonense* foi incompatível com todos os produtos testados, enquanto que *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *P. tropica* e *G. diazotrophicus* se mantiveram viáveis quando expostos a todos os produtos, independentemente do período de exposição. *Bacillus aryabhattachai* tolerou a exposição apenas ao Regent 800 WG. Não houve inibição mútua entre as bactérias diazotróficas e a bactéria osmotolerante, de modo que esta poderá ser introduzida no pool de bactérias diazotróficas utilizadas na produção de mudas de cana-de-açúcar.

Termos para indexação: bactérias diazotróficas, bactéria osmotolerante, antagonismo, antibiose, incompatibilidade.

¹ Engenheiro-agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

² Engenheira-agrônoma, pós-doutoranda em Fitotecnologia, bolsista da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

Compatibility between bacterial assets and agrochemicals used in the production of sugarcane seedlings

Abstract - The objective of this study was to determine the compatibility between bacterial biological assets and chemical products commonly employed in the production system of pre-sprouted sugarcane seedlings. Besides, it was investigated the mutual compatibility among five diazotrophic bacteria and one osmotolerant bacterial strain. The chemical products used were the plant growth promoter Biozyme TF, the insecticide Regent 800 WG (fipronil), the fungicides Priori Xtra (azoxystrobin + cyproconazole), and Comet (pyraclostrobin). The bacteria biological assets included the osmotolerant bacterium *Bacillus aryabhattai* (CMAA 1363) and the diazotrophic bacteria *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335), *H. rubrisubalbicans* (BR 11504), *Paraburkholderia tropica* (BR 11366), *Azospirillum amazonense* (BR 11145) and *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281). Each isolate was exposed to the mentioned products in the highest recommended concentration, and then they were transferred to the culture medium after 1, 6 and 24h of exposition. The evaluation was performed for each period based on the number of cfu. mL⁻¹. Growth curves were constructed employing logarithmic transformation data for ln(cfu.mL⁻¹) accompanied by their respective confidence intervals for each treatment in order to determine bacterial survivorship. To evaluate the compatibility among growth promoting and osmotolerant bacteria, the inhibition assays in overlay were performed. *Azospirillum amazonense* isolate was incompatible with all products tested, however *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Paraburkholderia tropica* and *Gluconacetobacter diazotrophicus* were able to remain viable when exposed to all products, regardless the period of exposure. The bacterium *Bacillus aryabhattai* was tolerant only to Regent 800 WG. There was no mutual inhibition between the diazotrophic bacteria and the osmotolerant bacteria, which implies the possibility of formulating a biological product with the osmotolerant bacterium in the pool of diazotrophic bacteria for using on pre-sprouted sugarcane seedlings production system.

Index terms: diazotrophic bacteria, osmotolerant bacteria, antagonism, antibiosis, incompatibility.

Introdução

O interesse na utilização de microrganismos benéficos na cultura da cana-de-açúcar vem aumentando significativamente junto ao setor sucroenergético, tendo como principal objetivo compor sistemas de produção mais sustentáveis. Dentro os microrganismos benéficos com este potencial, algumas bactérias são consideradas como ativos biológicos que podem promover avanços no setor, trazendo ganhos econômicos e ambientais. Neste contexto, bactérias fixadoras de nitrogênio em gramíneas são consideradas como passíveis de oferecerem ganhos a esta cultura, quando combinadas em um pool contendo várias espécies bacterianas. Chaves et al. (2015) utilizaram as bactérias diazotróficas *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Herbaspirillum seropediae* (BR 11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504), *Burkholderia tropica* (BR 11366) e *Azospirillum amazonense* (BR 11145) para verificar a capacidade de incrementar a brotação de duas variedades de cana-de-açúcar, RB867515 e IACSP95-5000. Os autores verificaram que o genótipo influenciou na resposta da cana-de-açúcar à inoculação com os ativos biológicos, que a inoculação individual de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504), *Azospirillum amazonense* (BR 11145) e *Burkholderia tropica* (BR 11366) aumentou o índice de velocidade de brotação nas duas variedades testadas, e que a inoculação mista ou individual de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504) e *Herbaspirillum seropediae* (BR 11335) promoveram o aumento da massa seca da parte aérea na variedade IACSP95-5000.

Outro ativo biológico de interesse é aquele com capacidade de conferir maior tolerância das plantas à seca. Com este enfoque, uma estirpe de *Bacillus aryabhattai* (CMAA 1363) promissora em promover tolerância de plantas de milho à deficiência hídrica (KAVAMURA et al., 2013) e aumento da biomassa de raízes de alguns genótipos de cana-de-açúcar (SANTOS et al., 2017) é postulante a ser incorporada ao pool de bactérias diazotróficas como ativo biológico associado a plantas de cana-de-açúcar.

Entretanto, dois aspectos devem ser considerados na utilização prática destes ativos. No sistema de produção de cana-de-açúcar, os inseticidas, fungicidas (MAPA, 2018) e promotores de crescimento vegetal (SIQUEIRA, 2016) são utilizados pelos produtores em mudas pré-brotadas. Portanto, a

compatibilidade destes ativos biológicos com os principais produtos em uso configura-se de importância para a inserção dos ativos biológicos ao sistema produtivo.

O segundo aspecto é a compatibilidade entre a estirpe osmotolerante *B. aryabhattai* (CMAA 1363) e as demais bactérias diazotróficas. Para que possa ser incorporada no *pool* de bactérias diazotróficas, a estirpe de *B. aryabhattai* (CMAA 1363) não deve produzir compostos que inibam o desenvolvimento destas bactérias e vice-versa, pois o antagonismo entre elas culminaria em não estabelecer um ou mais ativos biológicos na planta, interferindo na obtenção do resultado esperado. Portanto, este trabalho teve como objetivos determinar: 1) a compatibilidade entre ativos biológicos bacterianos e produtos utilizados em mudas pré-brotadas no sistema de produção de cana-de-açúcar; 2) a compatibilidade mútua entre as bactérias diazotróficas e a estirpe osmotolerante.

Material e Métodos

Interação entre defensivos agrícolas e ativos biológicos utilizados na produção de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar

Nesta etapa, foram realizados ensaios para determinar a compatibilidade das estirpes bacterianas com quatro principais produtos utilizados por produtores de cana-de-açúcar: o promotor de crescimento vegetal Biozyme TF (Arysta LifeScience), o inseticida Regent 800 WG (fipronil 800) (BASF) e os fungicidas Priori Xtra (azoxistrobina + ciproconazol) (Syngenta Proteção de Cultivos Ltda.) e Comet (piraclostrobina) (BASF), na dose máxima recomendada pelo fabricante. Na tabela 1 são apresentadas as especificações de cada produto e as concentrações utilizadas nos ensaios.

Tabela 1. Especificações e concentrações máximas dos produtos testados recomendadas para aplicação pelos fabricantes.

| Nome dos produtos comerciais e seu(s) ingrediente(s) ativo(s) | Quantidade recomendada do produto comercial por ha | Volume de calda recomendado pelo fabricante (L/ha) | Concentração do produto comercial utilizado nos ensaios |
|---|--|--|---|
| Biozyme TF* | 0,5 L/ha | 100 | 5 mL produto/L de água |
| Regent 800 WG (fipronil 800 g/kg)** | 200-500 g/ha | 300 | 1,7 g produto/L de água |
| Priori Xtra (azoxistrobina 200 g/L + Ciproconazol 80 g/L)** | 0,25-0,3 L/ha | 100 | 3 mL produto/L de água |
| Comet (piraclostrobin 250 g/L)** | 0,4-0,5 L/ha | 100 | 5 mL produto/L de água |

Foi utilizada, também, a mistura de todos os produtos. Controle: solução salina 0,85%. * Indicações de referência obtidas de ARYSTA LIFESCIENCE (2018) e SIQUEIRA (2016). **Especificações e indicações de referência foram consultadas em MAPA (2018).

Inicialmente foram preparados 300 mL de solução de cada produto (Tabela 1) em água destilada estéril, em concentrações que, em 30 mL do produto, contivesse o dobro da concentração máxima recomendada. Foi produzida, também, uma única solução com a adição de todos os produtos químicos utilizados no trabalho. Os produtos foram mantidos em erlenmeyers sob agitação para sua total solubilização e homogeneização e as soluções foram filtradas em filtro bacteriológico esterilizado, com membrana estéril de 0,22 μm (Millipore).

Foram testadas as estirpes das espécies *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Azospirillum amazonense* (BR 11145), *Paraburkholderia tropica* (BR 11366), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335) e *H. rubrisubalbicans* (BR 11504), pertencentes à Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas e outros Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Agrobiologia (REIS et al., 2009).

Outro ativo biológico testado que confere maior tolerância das plantas à seca foi a estirpe de *Bacillus aryabhattachai* (CMAA 1363), da Coleção de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental da Embrapa Meio Ambiente (KAVAMURA et al., 2013; KAVAMURA et al., 2017; SANTOS et al., 2017). As bactérias *B. aryabhattachai*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *P. tropica* foram cultivadas em meio sólido de 523 de Kado e Heskett (1970) a 27°C, onde apresentaram crescimento rápido. O isolado de *A. amazonense* cresceu em meio sólido LGI a 28°C, *G. diazotrophicus* cresceu em meio sólido LGI-P a 29°C (BALDANI et al., 2014), pois não apresentaram crescimento em meio 523 de Kado e Heskett (1970). Após 48h de crescimento foram preparadas suspensões de cada bactéria em solução estéril de NaCl a 0,85%, ajustando-se as concentrações em espectrofotômetro a $A_{540\text{nm}}=0,3$ para cada uma. Para cada isolado, 30 mL da suspensão obtida foi transferida para frasco erlenmeyer esterilizado com capacidade de 150 mL e adicionados a 30 mL do produto preparado anteriormente. Deste modo, a alíquota de mesmo volume da suspensão bacteriana ao ser adicionada à calda, a bactéria esteve exposta à concentração máxima do produto, recomendada pelo fabricante.

No tratamento controle foi realizada a adição solução estéril de NaCl a 0,85%. Para a mistura de produtos, cada um foi solubilizado e homogeneizado separadamente em água destilada estéril em proporções que permitissem que, após combinados em volumes iguais, estivessem com o dobro das

concentrações máximas recomendadas. Após a homogeneização foram transferidos 30 mL da mistura para outro erlenmeyer contendo 30 mL da suspensão bacteriana. Os frascos de erlenmeyer foram mantidos em agitador rotativo (shaker) com controle de temperatura a 180 rpm nas respectivas temperaturas descritas anteriormente para cada isolado. Após 1, 6 e 24h de exposição de cada bactéria ao produto, alíquotas foram retiradas e submetidas à diluição seriada em fator 1:10. Alíquotas de 100 μ L de 3 amostras das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram semeadas em meio de cultura em que cresceram anteriormente. Após a incubação por até 5 dias foi feita a contagem diária de colônias e determinou-se o número de unidades formadoras de colônias por mL (ufc.mL^{-1}) nas suspensões contidas nos frascos. Na análise foram calculadas as médias e intervalos de confiança dos dados obtidos de 6 repetições com o software Excel (Microsoft), estabelecendo-se os limiares máximo e mínimo de ufc.mL^{-1} para cada leitura, com nível de 95% de probabilidade. As curvas de crescimento foram construídas utilizando-se valores transformados em logaritmo $\ln(\text{ufc.mL}^{-1})$.

Antagonismo entre bactérias promotoras de crescimento e osmotolerante

Nesta atividade foi avaliado se a bactéria osmotolerante *B. aryabhattai* produz compostos metabólicos capazes de inibir o crescimento de *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *P. tropica*, *A. amazonense*, e *G. diazotrophicus*. Avaliou, também, se as bactérias diazotróficas produzem compostos metabólicos capazes de inibir o crescimento de *B. aryabhattai*.

No preparo do pré-inóculo as estirpes foram mantidas em câmara climatizada do tipo BOD, em fotoperíodo de 12h, nos respectivos meios de cultura, nas mesmas temperaturas citadas na atividade anterior, por 48h. Após este período, foram semeadas em um único ponto, no centro da superfície do meio de cultivo contido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, seguindo-se a incubação por 48h, nas respectivas condições recomendadas para o seu crescimento. Decorrido este período, a colônia formada foi exposta a vapor de clorofórmio com a finalidade de matar a bactéria. Após a volatilização em câmara de fluxo laminar, cada placa recebeu uma sobre-camada de 15 mL dos respectivos meios semi-sólidos fundentes, contendo 200 μ L da suspensão de células da bactéria a ser testada a 10^8 ufc.mL^{-1} , previamente cultivada em

meio líquido por 48h. Após incubação em BOD durante 3 dias foi verificada a presença ou ausência de halos de inibição na sobre-camada (HALFELD-VIEIRA et al., 2015). Foram realizadas 3 repetições por tratamento, sendo cada placa considerada uma repetição.

Resultados

Os produtos Biozyme TF, Comet e mistura de todos os produtos químicos não permitiram crescimento da *B. aryabhattai*. A bactéria permaneceu viável quando exposta ao produto Priori Xtra pelo período de 1h, porém, houve redução da viabilidade celular em relação ao controle (Figura 1). O produto Regent 800 WG não comprometeu a viabilidade da bactéria por até 6h após a exposição das células bacterianas ao produto, porém promoveu redução da viabilidade de células em relação ao controle 24h após a exposição das células bacterianas ao produto (Tabela 2).

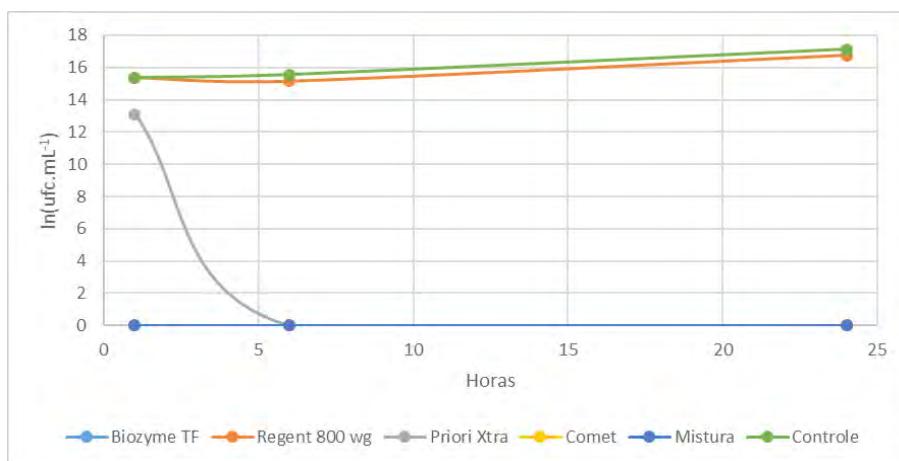


Figura 1. Número de células viáveis de *Bacillus aryabhattai* (CMAA 1363) após 1, 6 e 24h de exposição a diferentes produtos utilizados em cana-de-açúcar. Dados transformados para $\ln(\text{ufc.mL}^{-1})$.

Tabela 2. Médias de unidades formadoras de colônias (ufc) por mL e valores limites máximos e mínimos, calculados com base nos intervalos de confiança para *Bacillus aryabhattai* (CMAA 1363), após 1, 6 e 24h de exposição a diferentes produtos utilizados em cana-de-açúcar.

| | | Tempo de exposição da bactéria a diferentes produtos | | |
|--------|--------|--|--------------------|--------------------|
| | | 1h | 6h | 24h |
| | | Biozyme TF | Biozyme TF | Biozyme TF |
| Máximo | | * | * | * |
| | Mínimo | * | * | * |
| | Média | * | * | * |
| Máximo | | Regent 800 WG | Regent 800 WG | Regent 800 WG |
| | Mínimo | $5,29 \times 10^6$ | $4,50 \times 10^6$ | $2,06 \times 10^7$ |
| | Média | $4,31 \times 10^6$ | $3,30 \times 10^6$ | $1,73 \times 10^7$ |
| Máximo | | Priori Xtra | Priori Xtra | Priori Xtra |
| | Mínimo | $9,08 \times 10^5$ | * | * |
| | Média | $9,20 \times 10^4$ | * | * |
| Máximo | | $5,00 \times 10^5$ | * | * |
| | Mínimo | | | |
| | Média | | | |
| Máximo | | Comet | Comet | Comet |
| | Mínimo | * | * | * |
| | Média | * | * | * |
| Máximo | | Mistura | Mistura | Mistura |
| | Mínimo | * | * | * |
| | Média | * | * | * |
| Máximo | | Controle | Controle | Controle |
| | Mínimo | $6,40 \times 10^6$ | $6,97 \times 10^6$ | $3,03 \times 10^7$ |
| | Média | $2,94 \times 10^6$ | $4,36 \times 10^6$ | $2,51 \times 10^7$ |
| Máximo | | $4,67 \times 10^6$ | $5,67 \times 10^6$ | $2,77 \times 10^7$ |
| | Mínimo | | | |
| | Média | | | |

Médias destacadas em vermelho representam redução significativa do número de ufc.mL^{-1} em relação ao controle por meio do intervalo de confiança ($p < 0,05$). *Não houve crescimento bacteriano.

Todos os produtos permitiram crescimento da *H. seropedicae* (Figura 2). Os produtos Comet, Biozyme TF e a mistura de todos reduziram a viabilidade celular em relação ao controle, a partir de 1h de exposição das células bacterianas a estes produtos (Tabela 3).

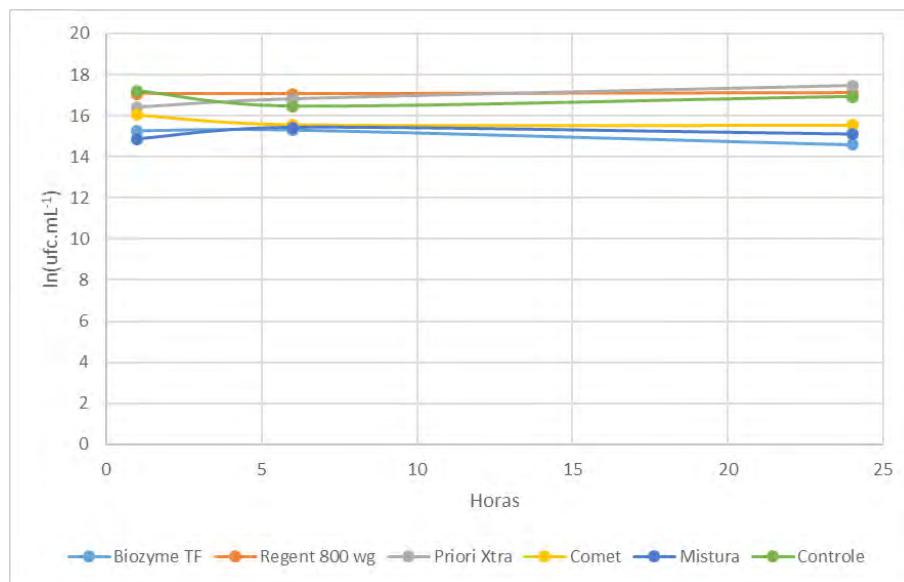


Figura 2. Número de células viáveis de *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335) após 1, 6 e 24h de exposição a diferentes produtos utilizados em cana-de-açúcar. Dados transformados para $\ln(\text{ufc.mL}^{-1})$.

Tabela 3. Médias de unidades formadoras de colônias (ufc) por mL e valores limites máximos e mínimos, calculados com base nos intervalos de confiança para *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335), após 1, 6 e 24h de exposição a diferentes produtos utilizados em cana-de-açúcar.

| Tempo de exposição da bactéria a diferentes produtos | | | |
|--|---|---|---|
| | 1h | 6h | 24h |
| Máximo | Biozyme TF $5,87 \times 10^6$ | Biozyme TF $5,41 \times 10^6$ | Biozyme TF $2,52 \times 10^6$ |
| Mínimo | $2,57 \times 10^6$ | $3,29 \times 10^6$ | $3,29 \times 10^6$ |
| Média | $4,22 \times 10^6$ | $4,35 \times 10^6$ | $2,20 \times 10^6$ |
| | Regent 800 WG | Regent 800 WG | Regent 800 WG |
| Máximo | $3,23 \times 10^7$ | $4,01 \times 10^7$ | $3,61 \times 10^7$ |
| Mínimo | $1,97 \times 10^7$ | $1,12 \times 10^7$ | $1,83 \times 10^7$ |
| Média | $2,60 \times 10^7$ | $2,57 \times 10^7$ | $2,72 \times 10^7$ |
| | Priori Xtra | Priori Xtra | Priori Xtra |
| Máximo | $2,00 \times 10^7$ | $2,62 \times 10^7$ | $4,55 \times 10^7$ |
| Mínimo | $6,82 \times 10^6$ | $1,38 \times 10^7$ | $3,05 \times 10^7$ |
| Média | $1,34 \times 10^7$ | $2,00 \times 10^7$ | $3,80 \times 10^7$ |
| | Comet | Comet | Comet |
| Máximo | $1,52 \times 10^7$ | $7,80 \times 10^6$ | $7,34 \times 10^6$ |
| Mínimo | $3,34 \times 10^6$ | $3,73 \times 10^6$ | $3,86 \times 10^6$ |
| Média | $9,27 \times 10^6$ | $5,77 \times 10^6$ | $5,60 \times 10^6$ |
| | Mistura | Mistura | Mistura |
| Máximo | $3,04 \times 10^6$ | $8,30 \times 10^6$ | $4,01 \times 10^6$ |
| Mínimo | $2,66 \times 10^6$ | $1,75 \times 10^6$ | $3,19 \times 10^6$ |
| Média | $2,85 \times 10^6$ | $5,03 \times 10^6$ | $3,60 \times 10^6$ |
| | Controle | Controle | Controle |
| Máximo | $4,04 \times 10^7$ | $1,75 \times 10^7$ | $3,04 \times 10^7$ |
| Mínimo | $1,92 \times 10^7$ | $1,05 \times 10^7$ | $1,44 \times 10^7$ |
| Média | $2,98 \times 10^7$ | $1,40 \times 10^7$ | $2,24 \times 10^7$ |

Médias destacadas em vermelho representam redução significativa do número de ufc.mL^{-1} em relação ao controle por meio do intervalo de confiança ($p < 0,05$).

Todos os produtos permitiram crescimento da *H. rubrisubalbicans* (Figura 3). Os produtos Biozyme TF, Comet e a mistura de todos reduziram a viabilidade de células em relação ao controle com 1h de exposição das células bacterianas ao produto, enquanto o produto Regent 800 WG promoveu redução de viabilidade após 6h de exposição (Tabela 4).

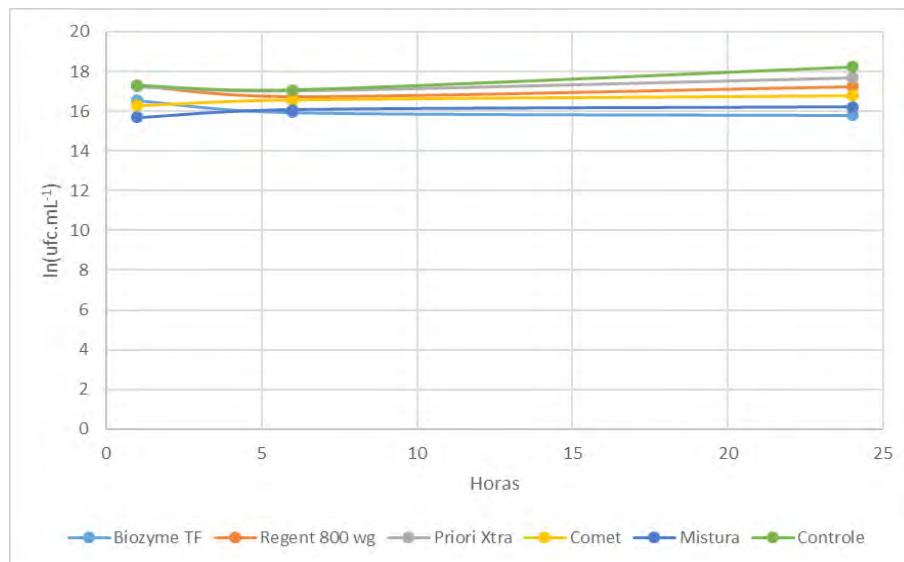


Figura 3. Número de células viáveis de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR11504) após 1, 6 e 24h de exposição a diferentes produtos utilizados em cana-de-açúcar. Dados transformados para $\ln(\text{ufc.mL}^{-1})$.

Tabela 4. Médias de unidades formadoras de colônias (ufc) por mL e valores limites máximos e mínimos, calculados com base nos intervalos de confiança para *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR11504), após 1, 6 e 24h de exposição a diferentes produtos utilizados em cana-de-açúcar.

| Tempo de exposição da bactéria a diferentes produtos | | | |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|
| | 1h | 6h | 24h |
| | Biozyme TF | Biozyme TF | Biozyme TF |
| Máximo | $1,98 \times 10^7$ | $1,01 \times 10^7$ | $8,74 \times 10^6$ |
| Mínimo | $1,06 \times 10^7$ | $6,72 \times 10^6$ | $5,81 \times 10^6$ |
| Média | $1,52 \times 10^7$ | $8,42 \times 10^6$ | $7,28 \times 10^6$ |
| | Regent 800 WG | Regent 800 WG | Regent 800 WG |
| Máximo | $4,05 \times 10^7$ | $1,97 \times 10^7$ | $3,73 \times 10^7$ |
| Mínimo | $2,35 \times 10^7$ | $1,68 \times 10^7$ | $2,37 \times 10^7$ |
| Média | $3,20 \times 10^7$ | $1,83 \times 10^7$ | $3,05 \times 10^7$ |
| | Priori Xtra | Priori Xtra | Priori Xtra |
| Máximo | $3,22 \times 10^7$ | $3,64 \times 10^7$ | $6,16 \times 10^7$ |
| Mínimo | $2,93 \times 10^7$ | $1,44 \times 10^7$ | $3,49 \times 10^7$ |
| Média | $3,08 \times 10^7$ | $2,54 \times 10^7$ | $4,83 \times 10^7$ |
| | Comet | Comet | Comet |
| Máximo | $1,31 \times 10^7$ | $1,98 \times 10^7$ | $2,46 \times 10^7$ |
| Mínimo | $1,07 \times 10^7$ | $1,18 \times 10^7$ | $1,41 \times 10^7$ |
| Média | $1,19 \times 10^7$ | $1,58 \times 10^7$ | $1,94 \times 10^7$ |
| | Mistura | Mistura | Mistura |
| Máximo | $7,82 \times 10^6$ | $1,30 \times 10^7$ | $1,28 \times 10^7$ |
| Mínimo | $5,38 \times 10^6$ | $6,28 \times 10^6$ | $9,26 \times 10^6$ |
| Média | $6,60 \times 10^6$ | $9,62 \times 10^6$ | $1,10 \times 10^7$ |
| | Controle | Controle | Controle |
| Máximo | $3,87 \times 10^7$ | $2,89 \times 10^7$ | $1,27 \times 10^8$ |
| Mínimo | $2,61 \times 10^7$ | $2,09 \times 10^7$ | $5,15 \times 10^7$ |
| Média | $3,24 \times 10^7$ | $2,56 \times 10^7$ | $8,43 \times 10^7$ |

Médias destacadas em vermelho representam redução significativa do número de ufc. mL^{-1} em relação ao controle por meio do intervalo de confiança ($p < 0,05$).

Todos os produtos permitiram crescimento da *P. tropica* (BR 11366), porém reduziram a viabilidade após 1h de exposição das células bacterianas aos produtos (Figura 4). O produto Biozyme TF foi o que mais afetou a viabilidade das células, com tendência de declínio do número de células viáveis após 6h de contato com o produto (Tabela 5).

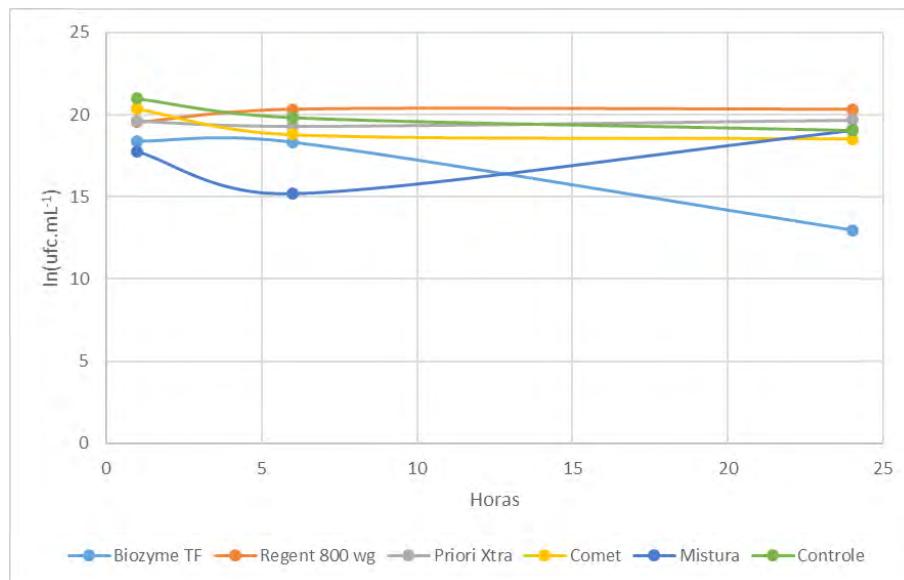


Figura 4. Número de células viáveis de *Paraburkholderia tropica* (BR 11366) após 1, 6 e 24h de exposição a diferentes produtos utilizados em cana-de-açúcar. Dados transformados para $\ln(\text{ufc.mL}^{-1})$.

Tabela 5. Médias de unidades formadoras de colônias (ufc) por mL e valores limites máximos e mínimos, calculados com base nos intervalos de confiança para *Paraburkholderia tropica* (BR 11366), após 1, 6 e 24h de exposição a diferentes produtos utilizados em cana-de-açúcar.

| Tempo de exposição da bactéria a diferentes produtos | | | |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|
| | 1h | 6h | 24h |
| | Biozyme TF | Biozyme TF | Biozyme TF |
| Máximo | $1,13 \times 10^8$ | $1,11 \times 10^8$ | $4,99 \times 10^5$ |
| Mínimo | $8,52 \times 10^7$ | $7,60 \times 10^7$ | $3,68 \times 10^5$ |
| Média | $9,93 \times 10^7$ | $9,34 \times 10^7$ | $4,33 \times 10^5$ |
| | Regent 800 WG | Regent 800 WG | Regent 800 WG |
| Máximo | $4,05 \times 10^8$ | $7,48 \times 10^8$ | $8,14 \times 10^8$ |
| Mínimo | $2,22 \times 10^8$ | $6,12 \times 10^8$ | $5,53 \times 10^8$ |
| Média | $3,13 \times 10^8$ | $6,80 \times 10^8$ | $6,83 \times 10^8$ |
| | Priori Xtra | Priori Xtra | Priori Xtra |
| Máximo | $4,51 \times 10^8$ | $2,76 \times 10^8$ | $3,85 \times 10^8$ |
| Mínimo | $2,22 \times 10^8$ | $2,11 \times 10^8$ | $3,28 \times 10^8$ |
| Média | $3,37 \times 10^8$ | $2,43 \times 10^8$ | $3,57 \times 10^8$ |
| | Comet | Comet | Comet |
| Máximo | $9,06 \times 10^8$ | $6,27 \times 10^7$ | $1,27 \times 10^8$ |
| Mínimo | $4,94 \times 10^8$ | $1,97 \times 10^7$ | $9,78 \times 10^7$ |
| Média | $7,00 \times 10^8$ | $1,46 \times 10^8$ | $1,13 \times 10^8$ |
| | Mistura | Mistura | Mistura |
| Máximo | $5,55 \times 10^7$ | $6,11 \times 10^6$ | $2,98 \times 10^8$ |
| Mínimo | $4,80 \times 10^7$ | $1,99 \times 10^6$ | $7,50 \times 10^7$ |
| Média | $5,18 \times 10^7$ | $4,05 \times 10^6$ | $1,87 \times 10^8$ |
| | Controle | Controle | Controle |
| Máximo | $1,45 \times 10^9$ | $4,21 \times 10^8$ | $2,72 \times 10^8$ |
| Mínimo | $1,15 \times 10^9$ | $3,99 \times 10^8$ | $1,01 \times 10^8$ |
| Média | $1,30 \times 10^9$ | $4,10 \times 10^8$ | $1,87 \times 10^8$ |

Médias destacadas em vermelho representam redução significativa do número de ufc. mL⁻¹ em relação ao controle por meio do intervalo de confiança ($p < 0,05$).

Não houve crescimento bacteriano por todos os produtos testados e a sua combinação inibiu completamente o crescimento da *A. amazonense* (Figura 5), sendo que o tratamento controle apresentou em média $1,33 \times 10^6$, $2,73 \times 10^8$ e $2,33 \times 10^6$ ufc.ml^{-1} , após 1h, 6h e 24h de exposição ao produto, respectivamente.

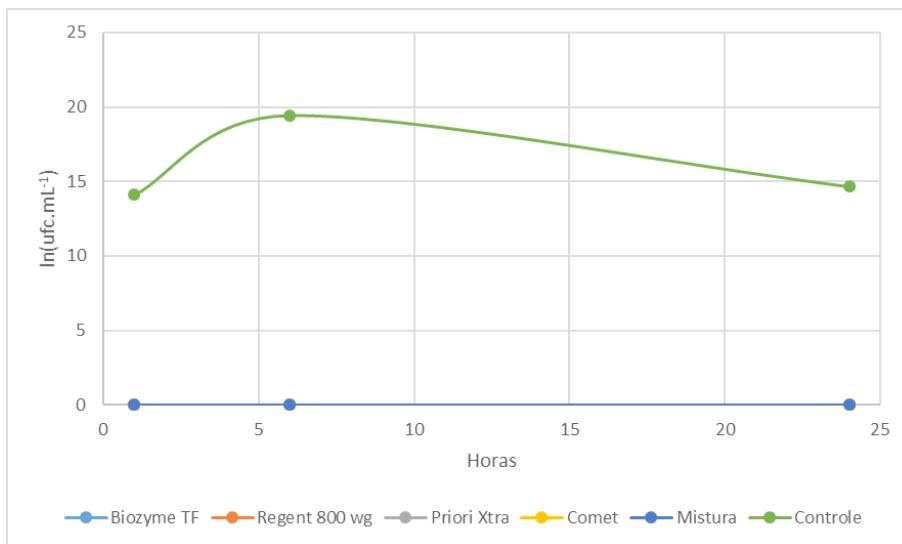


Figura 5. Número de células viáveis de *Azospirillum amazonense* (BR 11145) após 1, 6 e 24h de exposição a diferentes produtos utilizados em cana-de-açúcar. Dados transformados para $\ln(\text{ufc.ml}^{-1})$.

Todos os produtos permitiram o crescimento da *G. diazotrophicus*, porém com menor viabilidade do que o tratamento controle após 1h de exposição ao produto (Figura 6). O produto Comet foi o que mais afetou a viabilidade das células, com tendência de declínio do número de células viáveis após 1h de contato com o produto (Tabela 6). No tratamento controle, após 1h do preparo da suspensão, foi observada queda de viabilidade das células, igualando o número de células viáveis aos demais produtos, com exceção do Comet. A redução de viabilidade e inviabilidade das células bacterianas, quando expostas aos produtos, podem ocorrer tanto devido à toxicidade

dos ingredientes ativos quanto à presença de emulsificantes e demais aditivos utilizados nas formulações (BATISTA FILHO et al., 2001).

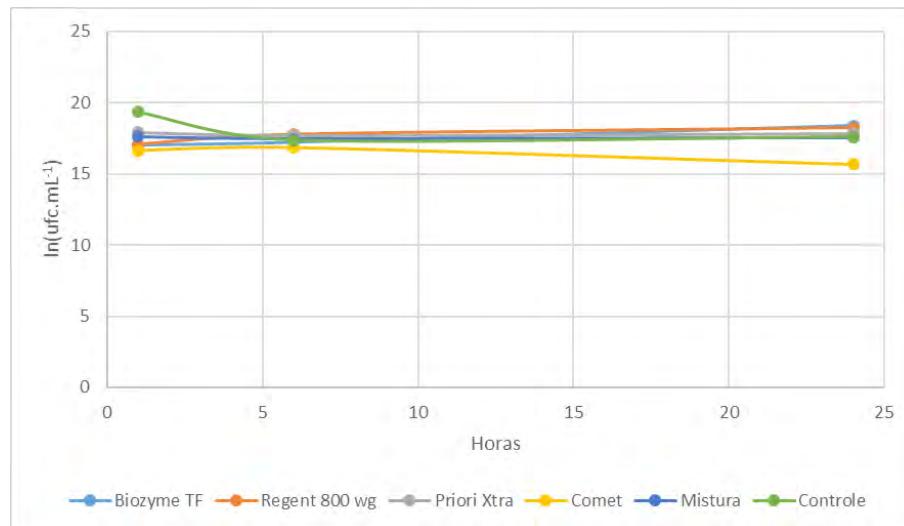


Figura 6. Número de células viáveis de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281) após 1, 6 e 24h de exposição a diferentes produtos utilizados em cana-de-açúcar. Dados transformados para $\ln(\text{ufc.mL}^{-1})$.

Tabela 6. Médias de unidades formadoras de colônias (ufc) por mL e valores limites máximos e mínimos, calculados com base nos intervalos de confiança para *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), após 1, 6 e 24h de exposição a diferentes produtos utilizados em cana-de-açúcar.

| Tempo de exposição da bactéria a diferentes produtos | | | |
|--|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | 1h | 6h | 24h |
| | Biozyme TF | Biozyme TF | Biozyme TF |
| Máximo | $2,92 \times 10^7$ | $3,87 \times 10^7$ | $1,40 \times 10^8$ |
| Mínimo | $1,43 \times 10^7$ | $2,16 \times 10^7$ | $5,13 \times 10^7$ |
| Média | $2,48 \times 10^7$ | $3,02 \times 10^7$ | $9,58 \times 10^7$ |
| | Regent 800 WG | Regent 800 WG | Regent 800 WG |
| Máximo | $3,24 \times 10^7$ | $5,71 \times 10^7$ | $9,51 \times 10^7$ |
| Mínimo | $2,02 \times 10^7$ | $4,73 \times 10^7$ | $7,13 \times 10^7$ |
| Média | $2,63 \times 10^7$ | $5,22 \times 10^7$ | $8,32 \times 10^7$ |
| | Priori Xtra | Priori Xtra | Priori Xtra |
| Máximo | $7,00 \times 10^7$ | $5,65 \times 10^7$ | $6,90 \times 10^7$ |
| Mínimo | $5,10 \times 10^7$ | $4,15 \times 10^7$ | $4,30 \times 10^7$ |
| Média | $6,05 \times 10^7$ | $4,90 \times 10^7$ | $5,60 \times 10^7$ |
| | Comet | Comet | Comet |
| Máximo | $2,07 \times 10^7$ | $2,98 \times 10^7$ | $8,12 \times 10^6$ |
| Mínimo | $1,40 \times 10^7$ | $1,22 \times 10^7$ | $4,96 \times 10^6$ |
| Média | $1,73 \times 10^7$ | $2,10 \times 10^7$ | $6,54 \times 10^6$ |
| | Mistura | Mistura | Mistura |
| Máximo | $5,34 \times 10^7$ | $4,46 \times 10^7$ | $5,11 \times 10^7$ |
| Mínimo | $3,86 \times 10^7$ | $3,22 \times 10^7$ | $3,46 \times 10^7$ |
| Média | $4,60 \times 10^7$ | $3,84 \times 10^7$ | $4,28 \times 10^7$ |
| | Controle | Controle | Controle |
| Máximo | $3,54 \times 10^8$ | $4,06 \times 10^7$ | $5,20 \times 10^7$ |
| Mínimo | $2,36 \times 10^8$ | $2,98 \times 10^7$ | $3,64 \times 10^7$ |
| Média | $2,51 \times 10^8$ | $3,52 \times 10^7$ | $4,42 \times 10^7$ |

Médias destacadas em vermelho representam redução significativa do número de ufc. mL^{-1} em relação ao controle por meio do intervalo de confiança ($p < 0,05$).

Nos ensaios de antagonismo entre as estirpes promotoras de crescimento e a estirpe osmotolerante não se notou a presença de halos de inibição, e tampouco nos ensaios de antagonismo das bactérias diazotróficas em relação à osmotolerante e vice-versa, indicando que não há metabólitos inibitórios que restrinjam o crescimento mútuo entre elas.

Discussão

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho fica evidente que a utilização de ativos biológicos em misturas, quer seja com outros ativos biológicos, quer seja com produtos químicos, deve ser avaliada caso a caso e de maneira criteriosa. Isso porque, ao detectar incompatibilidade entre alguns destes ativos ou produtos, pode haver uma limitação do benefício promovido pelos produtos, podendo resultar em descrédito por parte dos produtores quanto à vantagem do uso de tais ativos biológicos (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016; O'CALLAGHAN, 2016). Como exemplo, podemos citar a incompatibilidade de *A. amazonense* a todos os produtos. A sua exposição direta a esses produtos poderia comprometer a capacidade da bactéria de se estabelecer em associação às plantas de cana-de-açúcar e não proporcionar o efeito desejado. A incompatibilidade, porém, poderia ser contornada utilizando-se outros meios de inoculação que não exponham diretamente a bactéria aos produtos (FUKAMI et al., 2016).

Por outro lado, outras bactérias foram capazes de se manterem viáveis quando expostas a todos os produtos, como *H. seropediae*, *H. rubrisubalbicans*, *P. tropica* e *G. diazotrophicus*. Embora tenha havido situações em que a viabilidade das células foi menor quando em contato direto, verificou-se que é possível compensar esta redução com um aumento da concentração bacteriana quando as células forem associadas a um ou mais produtos testados. Já a bactéria osmotolerante *B. aryabhattai* admitiria exposição restrita ao inseticida Regent 800 WG, já que a exposição aos demais produtos leva ao comprometimento em curto período da viabilidade das suas células. Embora tenha havido crescimento desta bactéria quando em contato direto com o fungicida Priori Xtra após 1h de exposição, neste período já se observou redução significativa da sua viabilidade, resultando

em morte de todas as células 6h após o contato com o produto. Portanto, não é prudente considerar esta bactéria compatível com o referido produto.

Um fato interessante a ser comentado foi a observação de casos de menor capacidade de inibição de um produto a determinada estirpe bacteriana, quando em mistura com os demais produtos. Cita-se, como exemplo, no ensaio em que a calda do produto Comet reduziu progressivamente a viabilidade de *G. diazotrophicus* após 24h de exposição, o que não ocorreu quando esta bactéria estava em solução com todos os produtos químicos adicionados. Considerou-se dois fatores que podem estar relacionados a este resultado em misturas: i) a combinação de produtos pode levar a alterações em características da calda que influenciem na capacidade de sobrevivência das células bacterianas no decorrer do tempo, como exemplo, o pH; ii) alterações químicas devido às interações entre os produtos (RAKES et al., 2017). Deve-se destacar que a elucidação dos efeitos deletérios de cada componente adicionado às formulações é um fator importante que pode influenciar na compatibilidade entre produtos químicos e microrganismos, uma vez que existe a possibilidade dos componentes utilizados na formulação dos produtos químicos afetarem a viabilidade dos ativos biológicos.

Evidentemente os ensaios aqui executados simulam uma condição de preparação da calda com o ativo biológico incorporado, situação que implica na máxima exposição da bactéria ao produto e, por este motivo, não se alcança o efeito desejado em condições de exposição direta.

Em relação à compatibilidade entre bactérias diazotróficas e a osmotolerante *B. aryabhattai*, a falta de produção mútua de compostos inibitórios traz a possibilidade de inserir esta última no pool de bactérias, com ampliação dos benefícios proporcionados pelo inoculante. A co-inoculação com múltiplos ativos biológicos, às vezes, demonstra que há maior incremento à produtividade em comparação ao uso de estirpes individuais (O'CALLAGHAN, 2016). Quando em combinação, além do efeito que cada agente proporciona, considera-se, também, que há um aumento da probabilidade de estabelecimento de um ou mais agentes em condições de ambiente que sejam desfavoráveis a outro agente que componha o inoculante, ou até mesmo da interação entre eles (PRASAD; BABU, 2017; SANTIAGO et al., 2017).

Portanto, este trabalho demonstra que o *pool* de bactérias diazotróficas pode ser complementado com a estirpe osmotolerante de *B. aryabhattai*, considerando que não há produção de compostos inibitórios entre elas. A exposição destes ativos biológicos aos produtos químicos deve ser considerada para cada combinação em particular, de modo a não comprometer o estabelecimento das bactérias em associação às plantas de cana-de-açúcar e, por conseguinte, o benefício desejado. Porém, a conciliação entre produtos químicos e biológicos dependerá do momento de exposição dos ativos a cada produto, se em mistura à calda ou em aplicação posterior em sulcos, após cumprir o período de carência.

Conclusões

A. amazonense (BR 11145) é incompatível com todos os produtos químicos testados.

H. seropedicae (BR 11335), *H. rubrisubalbicans* (BR 11504), *Paraburkholderia tropica* (BR 11366) e *G. diazotrophicus* (BR 11281) são compatíveis com os produtos testados, porém pode haver redução da viabilidade celular quando em contato direto, por determinados períodos.

A bactéria osmotolerante *B. aryabhattai* (CMAA 1363) é compatível com o inseticida Regent 800 WG.

As bactérias diazotróficas *H. seropedicae* (BR 11335), *H. rubrisubalbicans* (BR 11504), *P. tropica* (BR 11366), *A. amazonense* (BR 11145) e *G. diazotrophicus* (BR 11281) e a osmotolerante *B. aryabhattai* (CMAA 1363) não produzem compostos inibitórios entre si.

Referências

- BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; VIDEIRA S. S.; BODDEY, L. H.; BALDANI, V. L. D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant Soil*, v. 384, p. 413-43, 2014.
- BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; LAMAS, C. Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. *Neotropical Entomology*, v. 30, n. 3, p. 437-447, 2001.
- CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: from the laboratory to the field. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 103, p. 117-130, 2016.
- CHAVES, V. A.; SANTOS, S. G.; SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; REIS, V. M. Desenvolvimento inicial de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.39, p. 1595-1602, 2015.
- FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasiliense*. *AMB Express*, v. 6, p. 1-13, 2016.
- HALFELD-VIEIRA, B. A.; SILVA, W. L. M.; SCHURT, D. A.; ISHIDA, A. K. N.; SOUZA, G. R.; NECHET, K. L. Understanding the mechanism of biological control of passionfruit bacterial blight promoted by autochthonous phylloplane bacteria. *Biological Control*, v. 80, p. 40-49, 2015.
- KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, v. 60, p. 969-979, 1970.
- KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. L.; PARMA, M. M.; AVILA, L. A.; VISCONTI, A.; ZUCCHI, T. D.; TAKETANI, R. G.; ANDREOTE, F. D.; MELO, I. S. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiological Research*, v. 168, p. 183-191, 2013.
- KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; TAKETANI, R. G.; VASCONCELLOS, R. L. F.; MELO, I. S. Draft genome sequence of plant growth-promoting drought-tolerant *Bacillus* sp. strain CMAA-1363 isolated from the Brazilian caatinga biome. *Genome Announcements*, v. 5, n. 5, e01534-16, 2017.
- MAPA. **AGROFIT**: sistema de agrotóxicos fitossanitários. Brasília, D.F.: MAPA, 2018. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 25 jun 2018.
- O'CALLAGHAN, M. Microbial inoculation of seed for improved crop performance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, p. 5729-5746, 2016.
- PRASAD, A. A.; BABU, S. Compatibility of *Azospirillum brasiliense* and *Pseudomonas fluorescens* in growth promotion of groundnut (*Arachis hypogea* L.). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 89, p. 1027-1040, 2017.
- RAKES, M.; GRÜTZMACHER, A.D.; PAZINI, J.B.; PASINI, R.A.; SCHAEEDLER, C.E. Physicochemical compatibility of agrochemical mixtures in spray tanks for paddy field rice crops. *Planta Daninha*, v. 35, p. 1-6, 2017.
- REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; URQUIAGA, S. **Recomendação de uma mistura de estírpes de cinco bactérias fixadoras de nitrogênio para inoculação de cana-de-açúcar: Gluconacetobacter diazotrophicus (BR 11281), Herbaspirillum seropediae (BR 11335), Herbaspirillum rubrisubalbicans (BR 11335), Azospirillum amazonense (BR 11145) e Burkholderia tropica (BR 11366).** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009. 4 p. (Embrapa Agrobiologia. Circular técnica, 30).

SANTIAGO, C. D.; YAGI, S.; IJIMA, M.; NASHIMOTO, T.; SAWADA, M.; IKEDA, S.; ASANO, K.; ORIKASA, Y.; OHWADA, T. Bacterial Compatibility in Combined Inoculations Enhances the Growth of Potato Seedlings. **Microbes and Environments**, v. 32, p. 14-23, 2017.

SANTOS, M. de S. dos.; STANCATTE, R. S.; FERREIRA, T. C.; DORIGHELLO, D. V.; PAZIANOTTO, R. A. A.; MELO, I. S. de.; MAY, A.; RAMOS, N. P. Resistance to water deficit during the formation of sugarcane seedlings mediated by interaction with *Bacillus* sp. **Científica**, v. 45, n. 4, p. 414-421, 2017.

SIQUEIRA, A.C.O. **Uso de *Metarhizium* spp. na produção de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar e seus efeitos na planta, em pragas e doenças**. 2016. 94 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – ESALq/USP, Piracicaba. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11146/tde-25042016-183101/pt-br.php>>.



Meio Ambiente

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

