

# PERFIS DE PCR-DGGE DE COMUNIDADES BACTERIANAS ASSOCIADAS AO RIZOPLANO DE MILHO SOB DIFERENTES DOSES DE ADUBAÇÃO COM COMPOSTOS ORGÂNICOS

## PCR-DGGE FINGERPRINTING OF BACTERIAL COMMUNITY ASSOCIATED TO MAIZE RHIZOPLANE UNDER DIFFERENT DOSES OF ORGANIC COMPOST FERTILIZATION

Anderson Petrônio de Brito FERREIRA<sup>1</sup>; Maria Urbana Correa NUNES<sup>2</sup>;  
Gustavo Ribeiro XAVIER<sup>3</sup>; Norma Gouvêa RUMJANEK<sup>3</sup>

1. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, Goiás, Brasil. [anderson@cnpaf.embrapa.br](mailto:anderson@cnpaf.embrapa.br); 2. Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, Sergipe, Brasil. [murbana@cpact.embrapa.br](mailto:murbana@cpact.embrapa.br); 3. Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, Brasil. [gustavo@npafa.embrapa.br](mailto:gustavo@npafa.embrapa.br)

**RESUMO:** A matéria orgânica é considerada um dos principais componentes da qualidade do solo porque contribui diretamente ou indiretamente com muitas propriedades físicas, químicas e biológicas. Desta forma, a adição de compostos orgânicos no solo é uma prática agrícola comumente adotada para melhorar a qualidade do solo, assim como, para o aproveitamento de resíduos orgânicos. Foi montado um experimento em condições de campo no município de Estância – SE, com o objetivo de avaliar os efeitos de fontes e doses de aplicação de compostos orgânicos sobre a comunidade bacteriana associada ao rizoplane da cultura. O uso de compostos orgânicos proporcionaram alterações na comunidade bacteriana associada ao rizoplane de milho, causando aumento no número de grupos bacterianos, o que foi constatado através do aumento do número de bandas raras, sendo que os resultados mais marcantes foram observados na dose de 10 ton ha<sup>-1</sup> do composto orgânico à base de lodo e na dose de 40 ton ha<sup>-1</sup> do composto à base de esterco de galinha. A técnica de PCR-DGGE mostrou-se eficiente na avaliação do impacto do uso de diferentes formas e doses de adubos na comunidade bacteriana do solo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Marcador molecular. 16S rDNA, *Zea mays*. Composto orgânico.

### INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) é um dos mais importantes grãos de cereais presentes na dieta humana e de animais, principalmente como fonte de calorias, além de vitaminas e proteínas (PEREIRA, 1987). É uma espécie de ciclo relativamente curto e com boa adaptação a grandes amplitudes térmicas (PARENTONI et al., 1991; RUBATZKY; YAMAGUCHI, 1997). Nos plantios convencionais de milho, as adubações minerais e orgânicas são usadas em larga escala havendo, portanto, a necessidade de se definir os melhores produtos e doses a serem aplicados no intuito de maximizar os lucros, a produtividade e a qualidade.

A matéria orgânica, pelo seu efeito na melhoria das condições químicas, físicas e biológicas do solo, contribui para o aumento da produtividade e para a melhor qualidade do produto final (SALES JÚNIOR et al., 2005). Desta forma, o conhecimento de fontes, doses e formas de aplicação de adubos orgânicos é de grande importância para o cultivo orgânico, tanto em relação ao aproveitamento dos resíduos agroindustriais poluidores do meio ambiente, quanto em relação à possibilidade do agricultor em produzir adubo em sua propriedade.

Os efeitos das práticas agrícolas sobre a comunidade microbiana do solo vêm sendo amplamente discutidos na literatura. O uso de compostos orgânicos e adubos verdes aumentam a disponibilidade de fontes de C para os microrganismos, levando a mudanças, tanto na taxa de atividade, quanto na composição da comunidade microbiana (LUNDQUIST et al., 1999). O uso de agroquímico, nos quais estão inseridos os fertilizantes, também causa, além de contaminação ambiental, alterações na comunidade microbiana do solo e na comunidade de microrganismos endofíticos (SEGHERS et al., 2004).

A massiva adoção de práticas agrícolas baseadas em “pacotes tecnológicos” leva a uma queda na qualidade do solo e, conseqüentemente, a um aumento de doenças causadas por patógenos que sobrevivem no solo (BAILEY; LAZAROVITS, 2003). Este quadro caracteriza uma diminuição da sustentabilidade do sistema produtivo, uma vez que as práticas agrícolas sustentáveis estão baseadas, em parte, em um manejo eficiente dos microrganismos do solo para melhorar a qualidade do mesmo (KREMER; LI, 2003). Contudo, o uso intensivo do solo não necessariamente afeta negativamente algumas propriedades do solo, como biomassa e atividade microbiana, mas as conseqüências desse

uso intensivo dependem principalmente das práticas agrícolas adotadas que alteram a qualidade e a quantidade dos resíduos vegetais adicionados ao sistema (WARDLE et al., 1999). Observa-se ainda que as práticas de manejo e a planta exercem mais influência na biota do solo do que o tipo de solo. Quantidades mais elevadas de material orgânico depositadas na superfície do solo cultivado com gramíneas, por exemplo, resultam em maiores concentrações de biomassa microbiana e maiores quantidades de colêmbolos (FROMM et al., 1993).

Em relação à composição florística e aos padrões de utilização de fontes de C pelas comunidades rizobacterianas, estes são menos diversos em tratamentos que receberam fertilização mineral do que naqueles que não receberam, além disso, uma inversão na distribuição de C e N entre a parte aérea e as raízes durante o ciclo vegetativo das plantas provavelmente induz a uma variação na rizodeposição, o que poderia explicar as diferenças nos perfis rizobacterianos entre os tratamentos fertilizados e não fertilizados (BENIZRI; AMIAUD, 2005).

A técnica de PCR-DGGE tem sido aplicada ao estudo de diversidade de espécies de *Paenibacillus* presentes na rizosfera de cultivares de milho (SILVA et al., 2003), em comunidades microbianas do solo (JONES e THIES, 2007), em comunidades procarióticas redutoras de sulfato presentes em solos e sedimentos (MILETTO et al., 2007), na diversidade microbiana de membranas de nano e microfiltração de biorreatores (CHOI et al., 2007), nas mudanças da estrutura da comunidade microbiana em função do tamanho das partículas do solo (ZHANG et al., 2007) e na comparação com outros métodos utilizados para o monitoramento de

comunidades microbianas complexas (HONG et al., 2007).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de fontes e doses de compostos orgânicos sobre a comunidade bacteriana associada ao rizoplane do milho.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Instalação e Condução do Experimento

O experimento foi montado em condições de campo durante o período de junho a agosto de 2005, no município de Estância – SE, em um delineamento de blocos ao acaso com 10 tratamentos, 2 épocas de coleta e 3 repetições, no qual foi avaliado o efeito da aplicação de diferentes doses de compostos orgânicos e de adubação química sobre a comunidade bacteriana associada ao rizoplane da cultura do milho. Foi usada a cultivar de milho Sertanejo no espaçamento de 1,50 x 0,20 m com duas linhas de feijão caupi entre duas linhas de milho. O composto orgânico de lodo de cervejaria (CL) foi preparado com 70% de lodo de cervejaria + 20% de pó de serra + 10% de terra infusoria e o composto de esterco de galinha (CEG) foi preparado com 30% de esterco de galinha + 70% de pó de casca de côco seco, aplicados em três doses (Tabela 1). Também foi avaliada a adubação química convencional (AQC) com NPK na dosagem recomendada para a cultura do milho, adubação química convencional + composto de lodo de cervejaria (AQC+CL), adubação química convencional + composto de esterco de galinha (AQC+CRG) e adubação química convencional + esterco de galinha (AQC+EG), conforme Tabela 1.

**Tabela 1:** Tipos de adubos e doses utilizadas no experimento de milho durante o período de junho a agosto de 2005, no município de Estância – SE.

Descrição	Adubo	Dosagem	
		Composto (ton.ha <sup>-1</sup> )	Adubo Químico (kg.ha <sup>-1</sup> )
CLD1	Composto de lodo de cervejaria	10	-
CLD2	Composto de lodo de cervejaria	20	-
CLD3	Composto de lodo de cervejaria	40	-
CEGD1	Composto de esterco de galinha	10	-
CEGD2	Composto de esterco de galinha	20	-
CEGD3	Composto de esterco de galinha	40	-
AQC	Adubação química convencional	-	100 kg N.ha <sup>-1</sup> 200 kg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> .ha <sup>-1</sup> 80 kg K <sub>2</sub> O.ha <sup>-1</sup> 100 kg N.ha <sup>-1</sup>
AQC+CL	Adubação química convencional + Composto de lodo de cervejaria	14	200 kg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> .ha <sup>-1</sup> 80 kg K <sub>2</sub> O.ha <sup>-1</sup>
AQC+CEG	Adubação química convencional	15	100 kg N.ha <sup>-1</sup>

	+ Composto de esterco de galinha		200 kg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> .ha <sup>-1</sup> 80 kg K <sub>2</sub> O.ha <sup>-1</sup> 100 kg N.ha <sup>-1</sup>
AQC+EG	Adubação química convencional + esterco de galinha	15	200 kg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> .ha <sup>-1</sup> 80 kg K <sub>2</sub> O.ha <sup>-1</sup>

### Coleta das Raízes e Extração de Células do Rizopiano

As coletas foram realizadas aos 15 e 45 DAP e, em cada coleta, a parte aérea das plantas foi cortada a aproximadamente 10 cm do solo e descartada. As raízes foram retiradas do solo juntamente com grandes blocos de terra contendo solo rizosférico. O solo foi cuidadosamente separado das raízes, sendo estas colocadas em sacos plásticos e acondicionadas em caixa térmica com gelo até o momento do processamento. As raízes foram então suavemente agitadas para eliminar o excesso de solo rizosférico, lavadas em solução salina (NaCl 0,85%) e secas em papel toalha estéril. Foi pesado 1 g de raízes e transferido para tubo falcon de 50 mL contendo 20 mL de solução salina. Os tubos foram agitados em agitador de ação pulsada (150 rpm; 30 min). Foi transferida uma alíquota de 8 mL para tubo um falcon de 15 mL, seguida de centrifugação (9.000 g; 30 min; 4 °C). O sobrenadante foi descartado e adicionado 1 mL de água esterilizada. O tubo foi agitado em vórtex para a ressuspensão do precipitado e a solução foi transferida para um microtubo de 1,5 mL. Em seguida o material foi centrifugado (9.000 g; 15 min), o sobrenadante foi eliminado e o tubo contendo o precipitado foi estocado em freezer (-20 °C).

### Extração de DNA

Seguiu-se o protocolo descrito por Schwieger e Tebbe (1998) e modificado por Xavier et al. (2004). O precipitado microbiano estocado (-20 °C) foi ressuspensão em 0,6mL de tampão de lise TES (0,05M NaCl; 0,01M EDTA; 0,05M Tris HCl pH 8,0; 1% SDS) e agitado em vórtex. Em seguida, as amostras foram submetidas a cinco etapas de congelamento/descongelamento: imersão em nitrogênio líquido (5 min), aquecimento (65 °C; 180 rpm; 5 min) e agitação (180 rpm; 10 s). Aplicou-se, então, 8,4 µL de proteinase K (20 mg.mL<sup>-1</sup>) nas amostras que foram incubadas sob agitação (180 RPM; 65 °C; 1 hora). Em seguida, adicionou-se 0,6 mL (1 volume) de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugou-se as amostras (7.500 g; 6 min). O sobrenadante foi transferido cuidadosamente para novos tubos, onde foram adicionados 0,6 mL (1 volume) de clorofórmio-álcool isoamílico, repetindo-se a centrifugação

anterior. Uma alíquota de aproximadamente 0,5 mL do sobrenadante foi transferida para um novo tubo e 0,5 volumes de isopropanol gelado foram adicionados. As amostras foram, então, incubadas (60 min; -20 °C) e centrifugadas (16.100 g; 20 min). Removido o sobrenadante, o precipitado foi centrifugado a vácuo para a secagem e ressuspensão em 50 µL de tampão TE (10 mM Tris; 1 mM Na-EDTA; pH 8,0).

### Condições da PCR-DGGE

As reações de amplificação foram realizadas em triplicata, nas diluições 1:20, 1:40 e 1:80. As reações foram feitas em um volume final de 35 µL e consistiram de 1 µL da diluição do DNA, tampão (10 mM), MgCl<sub>2</sub> (3,5 mM), dNTP (0,2 µM cada), Formamida (2%), *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) (0,7 U) e os iniciadores 1401-R e 968CG-F (0,2 µM cada). Estes iniciadores e as condições da reação de PCR: aquecimento inicial (95 °C; 3 min), 35 ciclos compostos de desnaturação (94 °C; 30 s, anelamento (55 °C; 30 s) e extensão (72 °C; 30 s) e uma etapa final de extensão (72 °C; 5 min) estão descritas em Gelsomino et al. (1999). Após a amplificação, os produtos das três reações de PCR, provenientes das diluições, foram combinados em um único micro-tubo.

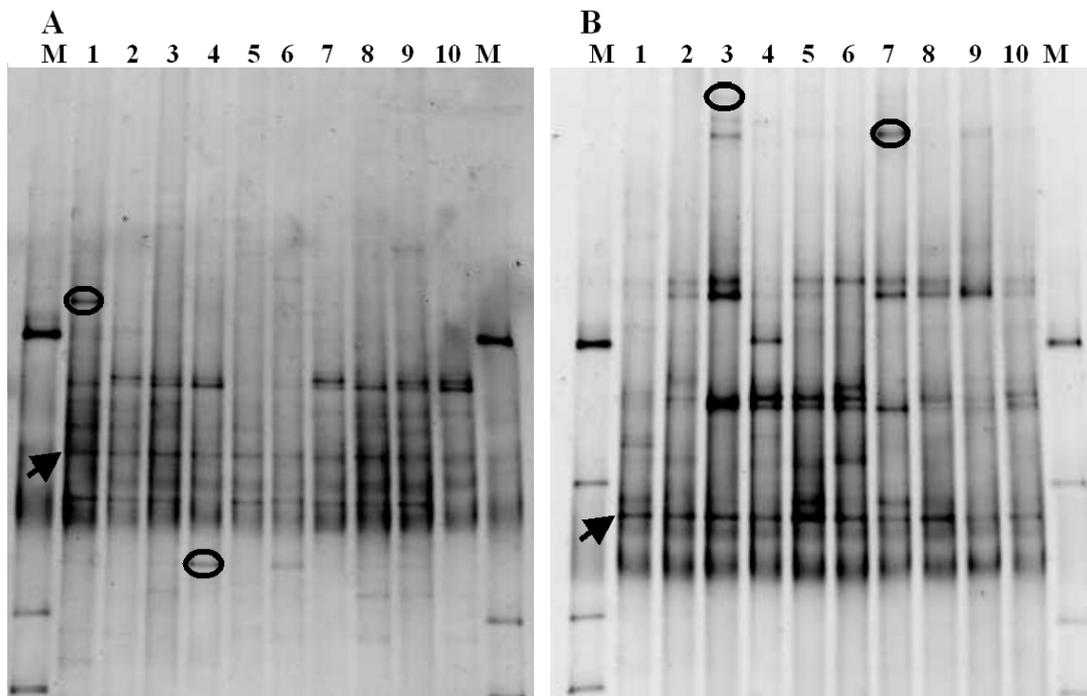
Um volume de 12 a 20 µL de cada amostra de DNA amplificado foi aplicado em gel desnaturante de poli(acrilamida 6 % (N-acrilamida, N'-metilbisacrilamida, 37:1) dissolvida em tampão TAE 0,5X (Tris-base, 20 mM pH 7,8; acetato de sódio 10 mM e Na-EDTA, 0,5 mM). O gradiente de desnaturante utilizado foi de 50-65%, obtido usando-se duas soluções, uma contendo apenas solução de poli(acrilamida e a outra uréia (7 M) e formamida (40% v/v) e poli(acrilamida. A eletroforese foi realizada no sistema *Dcode*<sup>TM</sup> (Bio-Rad) sob voltagem constante (120 V; 60 °C; 16 h) e ao final o gel foi corado com uma solução de SYBR Gold (Molecular Probe) (20X) e visualizado sob luz ultravioleta no sistema de foto-documentação IMAGO (B&L).

### Análise Estatística

A partir dos perfis de bandas dos géis de DGGE, foram elaboradas matrizes binárias de presença e ausência de bandas para cada uma das

repetições, em cada coleta, em função da posição que as bandas ocupavam no gel. Para bandas presentes em determinado tratamento era anotado o valor numérico "1", se ausente, era anotado o valor numérico "0" (KOZDRÓJ; ELSAS, 2001). Como o estudo foi composto de 3 repetições, foi construída uma única matriz, a partir das 3 repetições, em que cada repetição foi adicionada na planilha ao final da anterior (ABOIM, 2004). A partir desta matriz binária foi feita a análise de agrupamento por dendrograma para a qual foi utilizado, para o cálculo da similaridade, o coeficiente de Jaccard e o método UPGMA para agrupamento, através do programa NTSYS-PC v. 2.10 (Applied Biostatistics). Também foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA) usando o programa CANOCO v. 4.5.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO



**Figura 1:** Gel de DGGE de comunidades bacterianas associadas ao rizoplano de milho, submetida aos tratamentos com adubação orgânica e química. A) 1ª coleta; B) 2ª coleta; 1- CLD1; 2- CLD2; 3- CLD3; 4- CEGD1; 5- CEGD2; 6- CEGD3; 7 AQC; 8- AQC+CL; 9- AQC+CEG; 10- AQC+EG. CL – Composto de lodo de cervejaria, CEG – Composto de esterco de galinha e AQC – Adubação química convencional; (1, 2, 3 – doses de 10 ton. ha<sup>-1</sup>, 20 ton. ha<sup>-1</sup> e 40 ton. ha<sup>-1</sup>, respectivamente).

Kennedy et al. (2005) relataram que tanto a fertilização do solo quanto o uso de calagem provocam alterações na comunidade bacteriana do solo, quando comparado com o solo não tratado. Segundo Peacock et al. (2001), a utilização de adubos orgânicos pode provocar um aumento na população de bactérias Gram negativas de até 27%. Esse aumento que resulta da alteração na

### Perfis de PCR-DGGE de comunidades bacterianas associadas ao rizoplano de milho

A Figura 1 mostra o perfil da comunidade bacteriana associada ao rizoplano de milho, obtido por PCR-DGGE, durante a 1ª e 2ª coletas. Pode-se observar que algumas bandas estão presentes em todos os tratamentos, tanto na 1ª quanto na 2ª coleta (setas), indicando que alguns grupos de bactérias se associam às plantas de maneira muito específica, não sofrendo influência do tipo de fertilização adotada. Outros grupos (círculos) aparecem somente em determinado estágio de desenvolvimento da planta ou em função do tipo de adubação realizada. De modo geral, pode-se observar que, tanto na 1ª quanto na 2ª coleta, são observadas diferenças nos perfis da comunidade bacteriana associada ao rizoplano de milho de acordo com o tratamento.

concentração de C orgânico e da relação C/N do solo em função do uso de adubos orgânicos é capaz de alterar a relação entre bactérias Gram positivas e Gram negativas e a relação entre fungos e bactérias (MARSCHNER et al., 2003).

Portanto, a presença de bandas discriminantes, observadas nas linhas 1 a 6 e 8 a 10, principalmente na 2ª coleta, pode estar relacionada

ao surgimento de grupos de bactérias Gram negativas, influenciados pelo aporte de material orgânico no solo. A literatura relata que resultados como estes corroboram a hipótese de que a fertilização em geral e o tipo de adubo usado afetam importantes propriedades funcionais e estruturais da microbiota do solo (BÖHME et al., 2005).

### **Análise do agrupamento por dendrogramas de similaridade de comunidades bacterianas associadas ao riziplano de milho**

A partir da Figura 1 foi elaborada uma matriz binária de presença e ausência de bandas para

computar os dados da Tabela 2, onde são visualizados os números de bandas que aparecem em cada tratamento, nas diferentes coletas. Na 1ª coleta pode ser observado que os tratamentos com composto de lodo de cervejaria na dosagem 1 (CLD1) e a adubação química associada ao composto de lodo de cervejaria (AQC+CL) foram os tratamentos que apresentaram o maior número de bandas, assim como o maior número de bandas raras, que são aquelas que só aparecem em um tratamento.

**Tabela 2.** Número de bandas observadas em gel de DGGE nos diferentes tratamento e coletas: CL – Composto de lodo de cervejaria, CEG – Composto de esterco de galinha e AQC – Adubação química convencional; (1, 2, 3 – doses de 10 ton. ha<sup>-1</sup>, 20 ton. ha<sup>-1</sup> e 40 ton. ha<sup>-1</sup>, respectivamente), em experimento de campo conduzido durante o período de junho a agosto de 2005, no município de Estância – SE.

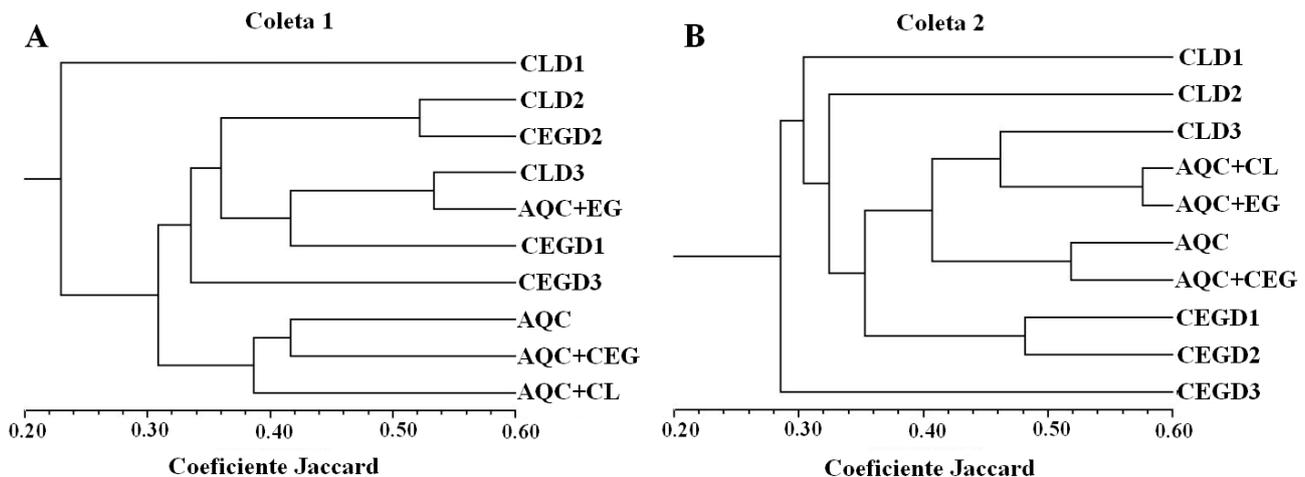
Tratamentos	1ª Coleta			Tratamentos	2ª Coleta		
	TB	BC	BR		TB	BC	BR
CLD1	33	3	9	CLD1	25	4	3
CLD2	18	3	1	CLD2	26	4	3
CLD3	22	3	0	CLD3	31	4	5
CEGD1	20	3	0	CEGD1	19	4	1
CEGD2	17	3	1	CEGD2	21	4	1
CEGD3	18	3	2	CEGD3	33	4	7
AQC	15	3	0	AQC	18	4	0
AQC+CL	26	3	4	AQC+CL	25	4	1
AQC+CEG	19	3	1	AQC+CEG	23	4	2
AQC+EG	24	3	0	AQC+EG	27	4	1
	-	3	18		-	4	24
<b>TGB</b>		<b>74*</b>				<b>74*</b>	

TB = Total de bandas observadas por tratamento; BC = Bandas comuns observadas em todos os tratamentos; BR = Bandas raras observadas por tratamento; TGB = Total geral de bandas observadas em todos os tratamentos. \* A soma do TB dos tratamentos não coincide com o TGB pois algumas bandas estão presentes em todos os tratamentos (ver Figura 1).

A dosagem de composto de lodo de cervejaria usada no tratamento AQC+CL (14 ton ha<sup>-1</sup>) é muito próxima daquela utilizada no tratamento CLD1 (10 ton ha<sup>-1</sup>) quando comparada com os demais tratamentos orgânicos. Já na 2ª coleta, o maior número de bandas por tratamento, e o maior número de bandas raras, foram encontrados, respectivamente, nos tratamentos com composto de esterco de galinha e com composto de lodo de cervejaria, ambos na dosagem 3. Com isto, pode-se inferir que, na 1ª coleta, o tipo de adubo usado foi o fator que exerceu maior influência sobre a comunidade bacteriana, em função do número de bandas. Já na 2ª coleta, a maior dose, independente do tipo de composto, exerceu maior influência no surgimento de bandas e, conseqüentemente, na comunidade bacteriana (Tabela 2).

Além disso, apesar de ter sido observado o mesmo número de bandas nas duas coletas, o número de bandas raras foi maior na 2ª coleta onde se apresentaram mais distribuídas entre os tratamentos (Tabela 2). A ausência de bandas raras no tratamento AQC, onde só foi utilizado fertilizante químico, em ambas as coletas demonstra-se que, tanto o número de bandas observado na 1ª coleta, quanto o seu aumento na 2ª coleta, foram conseqüências do aporte de material orgânico no solo, corroborando os resultados descritos anteriormente na literatura (PEACOCK et al., 2001; MARSCHNER et al., 2003; BÖHME et al., 2005).

A partir da matriz binária também foram preparados os dendrogramas de similaridade representativos da comunidade bacteriana de rizoplano de milho (Figura 2).



**Figura 2:** Dendrogramas de similaridade representativos das comunidades bacterianas associadas ao rizoplano de milho construídos a partir da matriz de similaridade gerada pelo coeficiente de Jaccard, utilizando-se o método de UPGMA para agrupamento. A) 1ª coleta; B) 2ª coleta. CL – Composto de lodo de cervejaria, CEG – Composto de esterco de galinha e AQC – Adubação química convencional; (1, 2, 3 – doses de 10 ton. ha<sup>-1</sup>, 20 ton. ha<sup>-1</sup> e 40 ton. ha<sup>-1</sup>, respectivamente).

Na Figura 2 podemos observar que os tratamentos com fertilizantes químicos (AQC), e fertilizante químico combinado com composto de lodo de cervejaria e com composto de esterco de galinha (AQC+CL e AQC+CEG), formam um grupo com aproximadamente 38% de similaridade. Para os tratamentos onde foram usados os adubos orgânicos (CL e CEG), não houve uma discriminação das comunidades bacterianas relacionadas a cada tipo de composto, no entanto, a maior parte dos tratamentos apareceu num grupo com 32% de similaridade. Na 2ª coleta, os tratamentos com composto de lodo de cervejaria (CL) e com composto de esterco de galinha (CEG) estão dispersos em todo o dendrograma, havendo apenas a formação de um agrupamento para os tratamentos CEGD1 e CEGD2, com aproximadamente 48 % de similaridade. Já os tratamentos com fertilizante químico (AQC) e sua combinação com os compostos (AQC+CL, AQC+CEG e AQC+EG) formaram um grupo com aproximadamente 40% de similaridade.

Possivelmente, o fato de o experimento ter sido replantado, pois foi danificado pela entrada de animais na área experimental, pode ter contribuído para esta alta variabilidade, uma vez que foi feita uma nova adubação por ocasião do replantio, o que aumentou bastante o teor de matéria orgânica adicionada.

#### **Análise de agrupamento por PCA de comunidades bacterianas associadas ao rizoplano de milho**

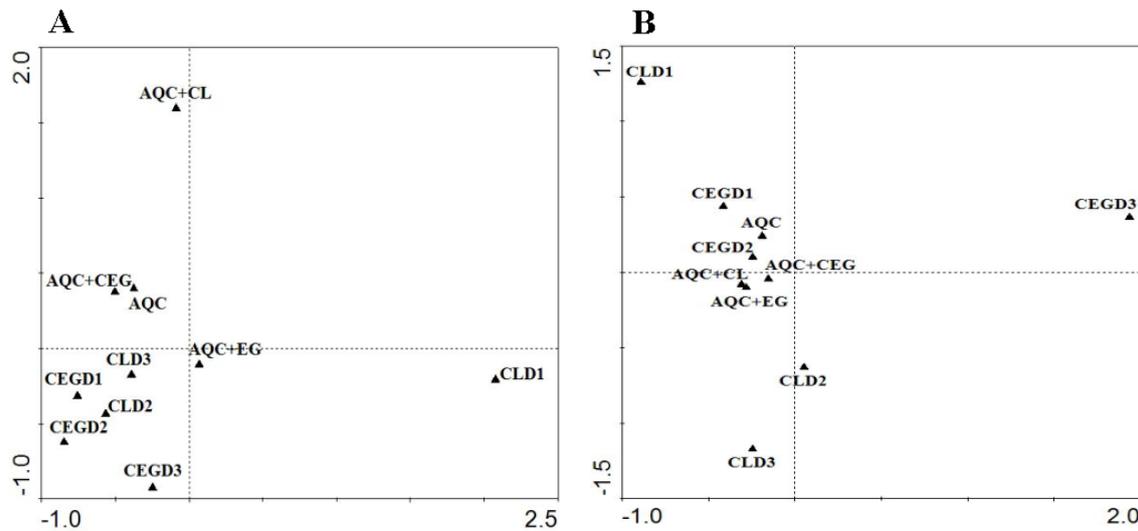
A análise de agrupamento por dendrogramas de similaridade dispõe as variáveis de forma unidimensional, o que prejudica uma visualização mais clara das relações existentes entre os grupos. Por outro lado, a análise multivariada (Figura 3) é capaz de fornecer maiores detalhes destas interações em função de decompor a variação dos dados em vários componentes e de dispor a informação de forma multidimensional. A utilização de análise multivariada, como PCA por exemplo, para verificar a diferenciação dos tratamentos onde foram usados diferentes compostos orgânicos do tratamento controle é frequentemente referenciada na literatura (BÖHME et al., 2005; BUCHER; LANYON, 2005; GOMEZ et al. 2006).

Na Figura 3, a soma dos dois primeiros componentes explica os 78,7% e os 67,8% da variação dos dados para a 1ª e 2ª coletas, respectivamente, sendo que a contribuição de cada eixo foi de: X = 46,4% e Y = 32,3% para a 1ª coleta e X = 38,6% e Y = 29,2% para a 2ª coleta, mostrando que o eixo X é o mais importante para a interpretação dos resultados por explicar a maior parte da variação dos dados.

Na 1ª coleta (Figura 3A) ocorreu um deslocamento do tratamento CLD1 ao longo do eixo X, indicando que este tratamento apresenta as maiores diferenças em relação aos demais. O eixo Y mostra a separação dos tratamentos com fertilizante químico (AQC) e fertilizante químico combinado com adubos orgânicos (AQC+CL, AQC+CEG e AQC+EG), com destaque para o tratamento AQC+CL, dos tratamentos com composto orgânico

(CL e CEG). De uma forma geral, pode-se observar que nesta coleta o uso de compostos orgânicos, foi o

fator mais importante na discriminação do efeito dos tratamentos.



**Figura 3:** Agrupamento por PCA das comunidades bacterianas associadas ao rizoplano de milho. A) 1ª coleta; B) 2ª Coleta. CL – Composto de lodo de cervejaria, CEG – Composto de esterco de galinha e AQC – Adubação química convencional; (1, 2, 3 – doses de 10 ton. ha<sup>-1</sup>, 20 ton. ha<sup>-1</sup> e 40 ton. ha<sup>-1</sup>, respectivamente).

A Figura 3B, correspondente à 2ª coleta, mostra o deslocamento do tratamento CEGD3 ao longo do eixo X, contudo, não mostra de forma clara o efeito dos demais tratamentos. Os tratamentos com composto de lodo de cervejaria (CLD1, CLD2 e CLD3) aparecem afastados dos demais tratamentos, deslocando-se ao longo do eixo Y, porém, com as duas maiores doses (CLD2 e CLD3) deslocando-se em sentido oposto à menor dose (CLD1). Neste eixo, ocorreu uma tendência de agrupamento entre os tratamentos que receberam fertilizante químico (AQC), com os que receberam apenas o composto de galinha (CEG), indicando que o composto de lodo de cervejaria foi capaz de selecionar uma comunidade bacteriana discriminante em relação aos outros tratamentos.

Os tratamentos que mais se afastaram dos demais na 1ª coleta (CLD1 e AQC+CL) e na 2ª coleta (CEGD3, CLD3, CLD2 e CLD1) (Figura 3), foram aqueles que apresentaram o maior número de bandas por tratamento e o maior número de bandas raras, podendo-se inferir como sendo os tratamentos mais diversos em grupos bacterianos.

Em um experimento com adição de matéria orgânica e solarização do solo, apesar da solarização ter sido o fator mais importante nas mudanças da estrutura da população bacteriana do solo, Gelsomino e Cacco (2006) observaram que a adição de material orgânico provocou alteração na população dos grupos de alfa e beta-proteobactéria e actinomicetos, além de observarem um aumento de riqueza bacteriana aos 16 e 32 dias após a adição de

matéria orgânica, seguida de uma redução da riqueza bacteriana aos 72 dias após a aplicação do adubo orgânico. Toyota e Kununaga (2006) observaram que a adição de matéria orgânica provoca um aumento na população bacteriana do solo com maior %G+C, tendo sido observado que, em solo sob fertilização química, há um predomínio de bactérias pertencentes aos grupos alfa, gama e beta-proteobactéria e, em solos sob fertilização orgânica, ocorrem o predomínio dos grupos gamaproteobactéria, alfa-proteobactéria, Actinobactéria e Acidobacterium.

## CONCLUSÕES

Os compostos orgânicos proporcionaram alterações na comunidade bacteriana associada ao rizoplano de milho, proporcionando aumento no número de grupos bacterianos, observado pelo aumento do número de bandas raras, sendo que os resultados mais marcantes foram observados nos tratamentos CLD1, CLD2, CLD3 e CEGD3.

A técnica de PCR-DGGE mostrou-se eficiente na avaliação do impacto do uso de diferentes formas de adubos e diferentes doses na comunidade bacteriana do solo.

## AGRADECIMENTOS

À Embrapa Agrobiologia, à Embrapa Tabuleiros Costeiros e à Capes pelo apoio técnico e financeiro para a realização deste trabalho.

**ABSTRACT:** Organic matter is considered the main component of soil quality because it contributes direct or indirectly to many chemical, physical and biological soil properties. In this context, adding organic compost to soil is becoming an ever increasing popular agricultural practice adopted to improve soil quality, as well as, to make good use of organic residues. An experiment was installed at Estância County (SE, Brazil) to evaluate the effects of organic compost and chemical fertilizer application on the bacterial community associated to maize rhizoplane. The use of organic compost led to changes in bacterial community associated to maize rhizoplane, being observed an increase on the richness of some bacterial groups, which was a reflex on the increase of rare bands number under this treatment. Among organic compost, only Silt (10 ton.ha<sup>-1</sup>) and chicken (40 ton.ha<sup>-1</sup>) composts affected the bacterial communities associated to maize rhizoplane. The effects on bacterial communities are related to the input of organic matter into soil. The PCR-DGGE based method showed to be reliable to evaluate the impacts of different agricultural managements on the soil bacterial populations.

**KEYWORDS:** Molecular marker. 16S rDNA. *Zea mays*. Organic compost.

---

## REFERÊNCIAS

- ABOIM, M.; C.; R. Impacto à diversidade bacteriana e sua relação com indicadores de qualidade do solo em ecossistemas agrícolas e naturais de mata atlântica, na região serrana do Rio de Janeiro. 2004. 97p. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro.
- BAILEY, K. L.; LAZAROVITS, G. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. **Soil and Tillage Research**, v. 72, p. 169-180, 2003.
- BENIZRI, E.; AMIAUD, B. Relationship between plants and soil microbial communities in fertilized grasslands. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p. 2055-2064, 2005.
- BÖHME, L.; LANGER, U. BÖHME, F. Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field experiments. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 109, p. 141-152, 2005.
- BUCHER, A. E.; LANYON, L. E. Evaluating soil management with microbial community-level physiological profiles. **Applied Soil Ecology**, v. 29, p. 59-71, 2005.
- CHOI, J. H.; LEE, S. H.; FUKUSHI, K.; YAMAMOTO, K. Comparison of sludge characteristics and PCR–DGGE based microbial diversity of nanofiltration and microfiltration membrane bioreactors. **Chemosphere**, v. 67, p. 1543-1550, 2007.
- FROMM, H.; WINTER, K.; FILSER, J.; HANTSCH, R.; BEESE, F. The influence of soil type and cultivation system on the spatial distributions of the soil fauna and microorganisms and their interactions. **Geoderma**, v. 60, p. 109-118, 1993.
- GELSOMINO, A.; KEIJZER-WOLTERS, A.C.; CACCO, G.; ELSAS, J. D. van Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 38, p. 1-15, 1999.
- GELSOMINO, A.; CACCO, G. Compositional shifts of bacterial groups in a solarized and amended soil as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 91-102, 2006.
- GOMEZ, E.; FERRERAS, L.; TORESANI, S. Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1484-1489, 2006.
- HONG, H.; PRUDEN, A.; REARDON, K. F. Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, p. 52-64, 2007.

- JONES, C. M.; THIES, J. E. Soil microbial community analysis using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of the bacterial ribosomal internal transcribed spacer regions. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, p. 256-267, 2007.
- KENNEDY, N. M.; GLEESON, D. E.; CONNOLLY, J.; CLIPSON, N. J. W. Seasonal and management influences on bacterial community structure in an upland grassland soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, p. 329-337, 2005.
- KOZDRÓJ, J.; ELSAS, J. D. van Structural diversity of microbial communities in arable soils of a heavily industrialised area determined by PCR-DGGE. fingerprinting and FAME profiling. **Applied Soil Ecology**, v. 17, p. 31-42, 2001.
- KREMER, R. J.; LI, J. Developing weed-suppressive soils through improved soil quality management. **Soil and Tillage Research**, v. 72, p. 193-202, 2003.
- LUNDQUIST, E. J.; SCOW, K. M.; JACKSON, L. E.; UESUGI, S. L.; JOHNSON, C. R. Rapid response of soil microbial communities from conventional, low input, and organic farming systems to a wet/dry cycle. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, p. 1661-1675, 1999.
- MARSCHNER, P.; KANDELER, E.; MARSCHNER, B. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, p. 453-461, 2003. (Até 3 autores, todos devem ser mencionados no texto)
- MILETTO, M.; BODELIER, P. L. E.; LAANBROEK, H. J. Improved PCR-DGGE for high resolution diversity screening of complex sulfate-reducing prokaryotic communities in soils and sediments. **Journal of Microbiological Methods**, v. 70, p. 103-111, 2007.
- PARENTONI, S. N.; GAMA, E. E. G.; REIFSCHNEIDER, F.J.B.; GUIMARÃES, P.E.O. Avaliação da capacidade combinatória de dez linhagens de milho doce. **Horticultura Brasileira**, v. 9, p. 71-73, 1991.
- PEACOCK, A. D.; MULLEN, M. D.; RINGELBERG, D. B.; TYLER, D. D.; HEDRICK, D. B.; GALE, P. M.; White, D. C. Soil microbial community responses to dairy manure or ammonium nitrate applications. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p. 1011-1019, 2001.
- PEREIRA, A. S. Composição, avaliação organoléptica e padrão de qualidade de cultivares de milho-doce. **Horticultura Brasileira**, v. 5, p. 22-24, 1987.
- RUBATZKY, V. E.; YAMAGUCHI, M. **World vegetables. Principles, production, and nutritives values**. 2 ed. New York: Champman & Hall, 1997. 843p.
- SALES JÚNIOR, R.; ITO, S. C. S.; ROCHA, J. M. M.; SALVIANO, A. M.; AMARO FILHO, J.; NUNES, G. H. S. Aspectos quantitativos e qualitativos de melão cultivado sob doses de fertilizantes orgânicos. **Horticultura Brasileira**, v. 23, p.718-721, 2005.
- SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C. A new approach to utilize PCR-single strand conformation polymorphism for 16S rDNA gene-based microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4870-4876, 1998.
- SEGHERS, D.; WITTEBOLLE, L.; TOP, E. M.; VERSTRAETE, W.; SICILIANO, S. D. Impact of Agricultural Practices on the *Zea mays* L. Endophytic Community. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1475-1482, 2004.
- SILVA, K. R. A.; SALLES, J. F.; SELDIN, L.; Van ELSAS, J. D. Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. **Journal of Microbiological Methods**, v. 54, p. 213-231, 2003.

TOYOTA, K.; KUNINAGA, S. Comparison of soil microbial community between soils amended with or without farmyard manure. **Applied Soil Ecology**, v. 33, p. 39-48, 2006.

WARDLE, D. A.; YEATES, G. W.; NICHOLSON, K. S.; BONNER, K. I.; WATSON, R. N. Response of soil microbial biomass dynamics, activity and plant litter decomposition to agricultural intensification over a seven-year period. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, p. 1707-1720, 1999.

XAVIER, G. R.; SILVA, F. V.; ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G. Adaptação de método para extração de DNA microbiano. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, 2004, 24 p. (Embrapa Agrobiologia, Documentos, 171).

ZHANG, P.; ZHENG, J.; PAN, G.; ZHANG, X.; LI, L.; ROLF, T. Changes in microbial community structure and function within particle size fractions of a paddy soil under different long-term fertilization treatments from the Tai Lake region, China. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 58, p. 264-270, 2007.