



# XX Congreso Latinoamericano y XVI Congreso Peruano de la Ciencia del Suelo

“EDUCAR para PRESERVAR el suelo y conservar la vida en La Tierra”

Cusco – Perú, del 9 al 15 de Noviembre del 2014  
Centro de Convenciones de la Municipalidad del Cusco

## ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA RIZOSFERA DE MILHO SOB DIFERENTES MÉTODOS DE INOCULAÇÃO COM *AZOSPIRILLUM*

Reis, D.P.<sup>1\*</sup>; Fonseca, L.M.F.<sup>1</sup>; Duarte, E.S.<sup>2</sup>; Oliveira, M. C.R.<sup>2</sup> Oliveira, C.A.<sup>3</sup>; Guimarães, L.J.M.<sup>3</sup>; Marriel. I.E.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de São João del Rei, <sup>2</sup> Universidad de Ciencias Empresariales y Sociales, <sup>3</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

\*Autor de contato: Email: denisepachecopl@hotmail.com Ibraim Sinval Fillagônio, Santa Rita, Pedro Leopoldo 115, Brasil; 31-9115591

### RESUMO

A demanda populacional por alimentos necessita de técnicas que atendam às necessidades sem afetar os diferentes agroecossistemas. Portanto, a utilização de inoculantes a base de *Azospirillum*, apresentam como uma alternativa. Dessa forma foram testados os seguintes tratamentos: sete métodos de aplicação de inoculante (no sulco; semente; via foliar aos 10 dias após a germinação (DAG); sulco + via foliar 20 DAG; semente + via foliar aos 20 DAG; via foliar aos 10DAG e 20DAG; e sem inoculante) e três doses de N em cobertura (0, 40 e 80 kg ha<sup>-1</sup> N), em blocos casualizados, com parcela subdivida, sendo dose de N nas parcelas e métodos de aplicação nas subparcelas. Amostras de solo rizosférico foram coletadas no estágio de florescimento, a atividade das enzimas foi determinada por meio da quantificação de da arginina, no no caso da arginase, e no caso da fosfatase ácida e alcalina utilizando-se colorimetria. Houve efeito significativo entre métodos de aplicação de inoculantes somente para a arginase, sendo a maior atividade observada no tratamento sem adição de nitrogênio e aplicação do inoculante via foliar aos 10 e 20 DAG. A alteração na ciclagem de nitrogênio na rizosfera de plantas de milho pode ser influenciada pela inoculação com *Azospirillum*, dependendo da forma de aplicação.

### PALAVRAS CHAVE

FBN; Enzimas; Microrganismos

## INTRODUÇÃO

O crescimento populacional demanda maior oferta de alimentos em termos globais. De modo geral, a maior produção de alimentos observada nos últimos anos tem implicado em uso intensivo da terra pelo emprego de máquinas, fertilizantes químicos e novas variedades. Essas tecnologias são altamente dependentes de energia oriundas de fontes não renováveis, portanto, despertam preocupações da pesquisa científica e da sociedade em geral quanto à sustentabilidade de tais práticas agrícolas.

A agricultura brasileira tem contribuído de modo significativo para a economia nacional principalmente em função da elevada produtividade de grãos, indispensável na cadeia produtiva de proteína animal. Dentre esses cereais, o milho e a soja representam 80% dos grãos produzidos no país e consumindo altas taxas de fertilizantes químicos importados, que oneram grandes custos dos produtores além de comprometerem a sustentabilidade dessa atividade. No caso do milho, cultura altamente consumidora de fertilizantes químicos principalmente nitrogenados (Coelho, et. al 2010), torna-se relevante a busca de alternativas que contribuam para mitigar a dependência de insumos importados.

Entre as alternativas de incorporar N aos sistemas agrícolas suprimindo parte das demandas de N, uma alternativa que vem sendo bastante utilizada é a inoculação através de bactérias fixadoras de N (Hungria, 2011). Conseqüentemente, esta tecnologia pode contribuir para reduzir a dependência da agricultura brasileira em fertilizantes importados, além de seu papel ambiental e social. No entanto, os impactos da inoculação com bactérias do gênero *Azospirillum* sobre a estrutura e função da comunidade microbiana autóctone do solo ainda são pouco conhecidos.

Alterações na qualidade biológica do solo podem ser avaliadas através de diferentes parâmetros microbiológicos. A atividade das enzimas tem sido apontada como potenciais indicadoras na qualidade do solo, uma vez que estão diretamente envolvidas nos ciclos biogeoquímicos. (Dick et. al.,1996). Diante desse cenário, o objetivo do trabalho foi avaliar a influência de diferentes métodos de aplicação de inoculante com *Azospirillum brasilense* sobre a ecologia microbiana na rizosfera de plantas de milho, determinada através da atividade das enzimas urease, arginase, fosfatase ácida e alcalina.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no ano agrícola 2012/2013, em solo classificado como Latossolo Vermelho Distrófico, em área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas– MG, localizada entre as latitudes 19°28'4" Sul, 44°15'08" Norte. Os inoculantes foram preparados a partir de estirpes de *Azospirillum brasilense* pertencentes à coleção de microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo, de acordo com a metodologia descrita por Oliveira et. al (2012). Foram testados os seguintes tratamentos: sete métodos de aplicação de inoculante (no sulco; semente; via foliar aos 10 dias após a germinação (DAG); sulco + via foliar 20 DAG; semente + via foliar aos 20 DAG; via foliar aos 10DAG e 20DAG; e sem inoculante) e três doses de N em cobertura (0, 40 e 80 kg ha<sup>-1</sup> N), em blocos casualizados, com parcela subdividida, sendo dose de N nas parcelas e métodos de aplicação nas subparcelas, e quatro repetições. As parcelas experimentais foram constituídas de quatro linhas de cinco metros, com espaçamento de 0,70 m entre linhas e 0,20 m entre plantas. Efetuou-se a adubação de base com 300 kg ha<sup>-1</sup> de NPK, sendo 20 kg ha<sup>-1</sup> de N como ureia. O genótipo de milho utilizado foi o BRS 1055, pertencente ao programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo. A coleta de amostras de solo rizosférico para a avaliação da atividade das enzimas realizou-se durante o estágio de florescimento. As plantas foram retiradas do solo com o sistema radicular inteiro. As raízes foram sacudidas e somente o solo bem aderido às raízes foi considerado como solo rizosférico. Este foi colocado em sacos plásticos estéreis, peneirado e armazenado em recipiente de vidro e conduzido ao laboratório para análise.

## ARGINASE E UREASE

A atividade da arginase nas amostras do solo foi determinada por meio da quantificação de amônio liberado pela hidrólise da arginina utilizando-se o método colorimétrico de Alef and Kleiner (1986). Amostras de 1,0 g de solo foram tratadas com 0,25 mL de solução de L-arginine (0,2 g/L) e incubadas por uma hora, a 37 °C. Após a incubação, adicionou-se 4mL de solução de KCl, 1M em cada amostra que ficaram sob agitação por 30 minutos. Uma alíquota de 100 µl do sobrenadante de cada amostra foi retirada e misturada a 1,0 mL da solução de reagentes para colorimétrica. Após sessenta minutos, realizou-se a leitura no espectrofotômetro a 660 nm.

A atividade da urease nas amostras do substrato foi determinada por meio da quantificação de amônio liberado pela hidrólise da ureia utilizando-se o método colorimétrico preconizado por Kandeler and Gerber (1988). Amostras de 0,5 g de solo foram tratadas com 0,25 mL de solução de ureia (4,8 g/L) e incubadas por uma hora a 37 °C. Após a incubação, adicionou-se 5 mL de solução de KCl, 1 M em cada amostra que ficaram sob agitação por 30 minutos. Uma alíquota de 100 µl do sobrenadante de cada amostra foi retirada e misturada a 1,0 mL da solução de reagentes para colorimetria. Após sessenta minutos, realizou-se a leitura no espectrofotômetro a 660 nm.

## FOSFATASE ÁCIDA

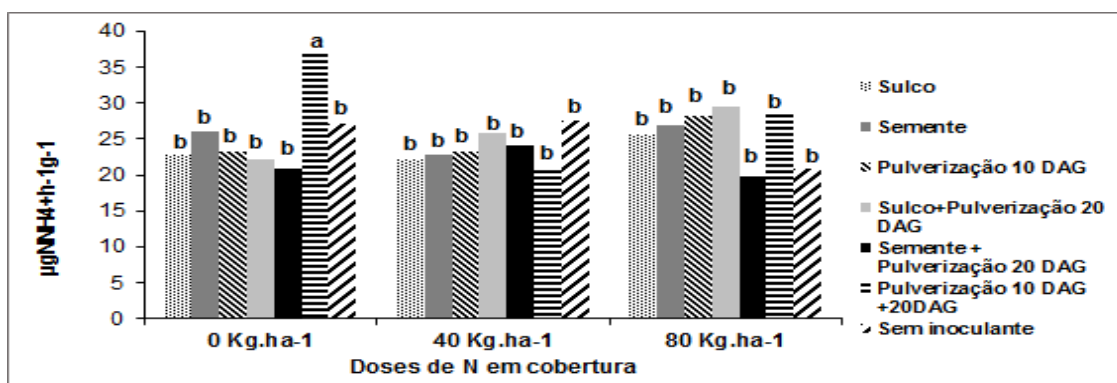
A atividade da fosfatases ácida foi determinada através da análise de concentração de p-nitrofenol resultante da hidrólise enzimática de p-nitrofenil fosfato utilizado de acordo com o método descrito por Tabatabai et. al (1994).

Amostras de solo de 0,15 g de solo foram tratados com tampão pH 6,5 e 11,0 para análise da fosfatase ácida. Posteriormente adicionou-se 0,12 mL de p-nitrofenil fosfato 0,05 M e homogeneizadas. Logo após foram incubadas por um período de 60 minutos, em temperatura constante de 37°C. Depois foi adicionado 0,5 mL da solução de reagentes para colorimétrica. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por 5 minutos e então a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 400 nm. A concentração de p-nitrofenol presente em cada amostra foi determinada com base na curva padrão (0; 2; 5; 7; 5; 10 µg p-nitrofenol h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> solo). Os resultados obtidos da atividade das enzimas foram expressos em µg p-nitrofenol h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> solo.

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente, através da análise de variância. As médias dos tratamentos quando significativas foram comparadas pelo teste Scott e Knott, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram efetuadas com o auxílio do aplicativo computacional Sisvar (Ferreira, 2010).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

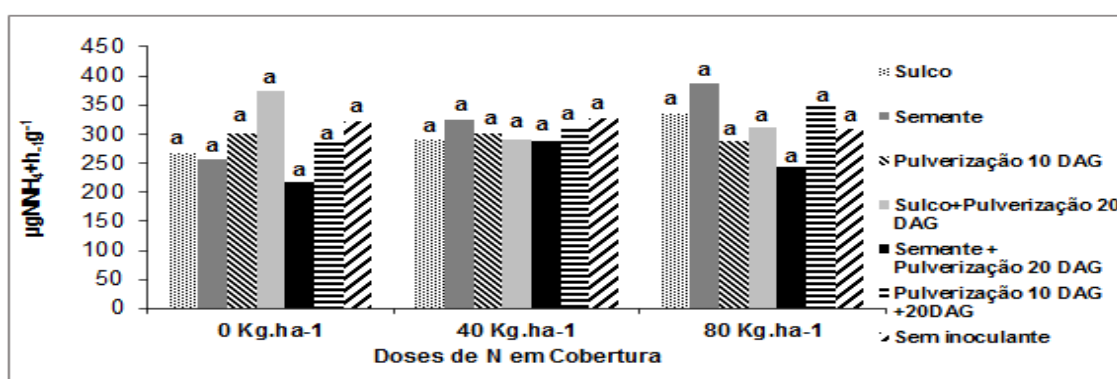
Os resultados obtidos para a enzima arginase estão representados na Figura 1.



**Figura 1.** Atividade da arginase das amostras ( $\mu\text{gN-NH}_4^+\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$ . Solo) nos tratamentos de diferentes métodos de inoculação e níveis de nitrogênio. Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si 5% pelo teste de Scott-Knott

As médias de valores nos tratamentos variaram entre 19,81  $\mu\text{gNNH}_4+\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$  para o tratamento com inoculação na semente + inoculação via foliar 20DAG dose de 80  $\text{kg}.\text{ha}^{-1}$  de N e 36,78  $\mu\text{gNNH}_4+\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$  para o tratamento onde houve inoculação via foliar+10DAG+20DAG sem adubação de cobertura. Os resultados submetidos a estatística demonstraram que existe diferença significativa ( $p<0,01$ ) entre os tratamentos para a interação método de inoculação com nível de adubação de N em cobertura. Houve diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre as médias dos tratamentos onde não ocorreu a adubação de cobertura. O método de inoculação via foliar 10+20DAG, sem adubação de cobertura, foi o que diferiu das demais, apresentando o valor da atividade da arginina mais elevado de 36,78  $\mu\text{gNNH}_4+\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$ .

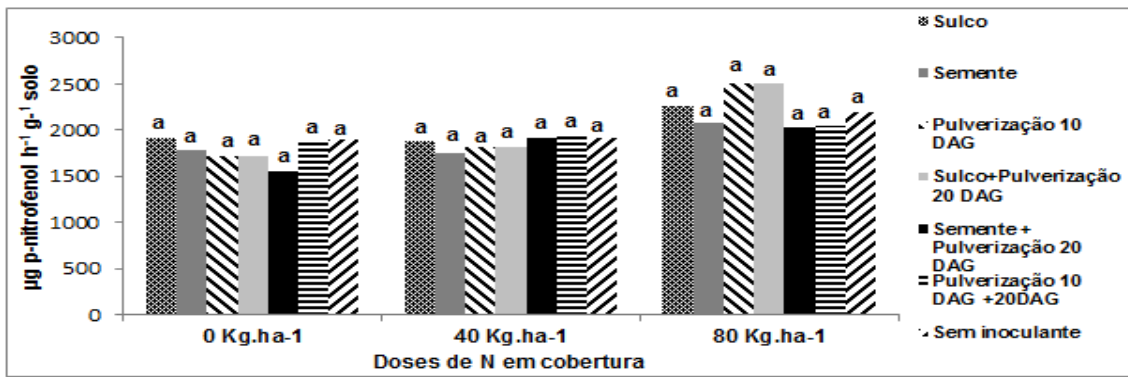
Em relação à atividade da urease (Figura 2), não houve diferença significativa entre os tratamentos. As médias dos valores observados para a atividade desta enzima variaram entre 217,69  $\mu\text{gN-NH}_4+\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$  para a aplicação de inoculante na semente + inoculação via foliar 20DAG, sem adubação de cobertura a 387,62  $\mu\text{g N-NH}_4+\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$  para inoculação na semente e adubação de cobertura de 80  $\text{kg ha}^{-1}$  N.



**Figura 2.** Atividade da urease das amostras ( $\mu\text{gN-NH}_4+\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$ ). Solo nos tratamentos de diferentes métodos de inoculação e níveis de nitrogênio. Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si 5% pelo teste de Scott-Knott.

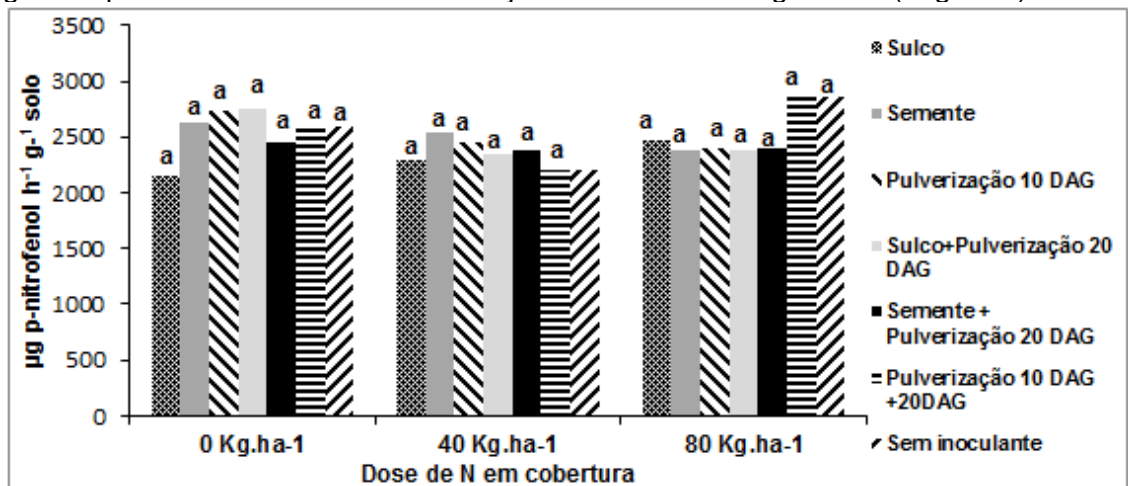
Os resultados obtidos mostraram uma maior sensibilidade da arginase com uma maior capacidade de detectar diferenças entre os tratamentos. Esses dados corroboram com os encontrados Fonseca et al. (2013) ao analisar diferentes inoculantes de *Azospirillum* e elevação da arginase. Já a urease de acordo com Lubbers (1993) pode apresentar pouca sensibilidade e porta-se como uma enzima constitutiva de forma que sua síntese ocorre de maneira independente do microambiente. A atividade dessas enzimas está diretamente ligada a conversão de compostos nitrogenados em amônio (Skoulobris et. al, 2001).

A atividade enzimática da fosfatase ácida e alcalina não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos analisados. As médias dos valores observados para a atividade fosfatase ácida (Figura 3) variaram entre 1551,688  $\mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1}\text{g}^{-1}$  solo I para a Semente + Pulverização 20 DAG dose onde não houve adubação em cobertura a 2508,82  $\mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1}\text{g}^{-1}$  para a inoculação Sulco+Pulverização 20 DAG dose de 80  $\text{Kg}.\text{ha}^{-1}$  N.



**Figura 3.** Atividade da fosfatase ácida ( $\mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ solo}$ ) nos tratamentos de diferentes métodos de inoculação e níveis de nitrogênio. Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si 5% pelo teste de Scott-Knott.

E a alcalina teve variações entre 2148,651  $\mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ solo}$  para a inoculação no sulco na dose onde não houve inoculação a 2867,77  $\mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ solo}$  para o tratamento sem inoculação na dose de 80  $\text{Kg.ha}^{-1} \text{ N}$  ( Figura 4).



**Figura 4.** Atividade da fosfatase alcalina ( $\mu\text{g p-nitrofenol h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{ solo}$ ) nos tratamentos de diferentes métodos de inoculação e níveis de nitrogênio. Médias de tratamentos seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si 5% pelo teste de Scott-Knott

Esses resultados diferem dos encontrados por Morais (2012), onde ocorreu aumento na atividade enzimática da fosfatase ácida inoculantes de *Azospirillum* e adubação nitrogenada em milho. Soares (et al 2012) ao analisar a atividade dessa enzima com microrganismos solubilizadores, verificaram aumento na atividade das enzimas na presença do inoculante.

Assim a microbiologia do solo está diretamente ligada a atividade enzimática, que pode sofrer influências de diferentes variações e perturbações ambientais, como temperatura umidade e manejo (Lisboa, 2009).

## CONCLUSÃO

A ciclagem de nitrogênio na rizosfera de plantas de milho determinada pela enzima arginase podem ser influenciadas pela inoculação com *Azospirillum*, dependendo da forma de aplicação.

A atividade microbiana do solo determinado pelas fosfatase ácida e alcalina não sofre influência pelo método de inoculação.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos: Capes, CNPq, FAPEMIG, Embrapa Milho e Sorgo e UFSJ,

## BIBLIOGRAFIA

Alef, K. and Kleiner, D. 1986. Arginine ammonification, a simple method to estimate microbial activity potential in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford 18:233-235.

Arunachalan, A and Melkania, N.P. 2009. Influence of soil properties on microbial populations, activity and biomass in humid subtropical mountains ecosystems of India. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin 30: 217-223.

Coelho, A.M. and Gonçalo E.F. 2010. Nutrição e adubação do milho. In: CRUZ, J. C. (Ed.). *Cultivo do milho*. 6. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de produção, 1).

Dick, R. P. 1994 Soil enzyme activities as indicators of soil quality. In: Doran, J. V.; Coleman, D. C.; Bezdick, D. F.; Stewart, B. A. (Ed.). *Defining soil quality of a sustainable environment*. Madison: Soil Science Society of America. 35:107-1247.

Ferreira, D. F. Sisvar 1988- Sistema de análise de variância. Versão 5.3. Lavras: UFLA, 2010.

Fonseca, L. M. F.; Reis, D. P.; Guieiro, C. S. M.; Ribas, R. N. R.; Mattos, B. B.; Oliveira, C.A.; Marriel, I. E. 2013. Assessment of arginase and urease enzymes of maize plant (*Zea Mays L.*) inoculated with *Azospirillum diazotrophicum*. In: *Simpósio Internacional de Microbiologia e Biotecnologia*. Viçosa, MG. Resumos. Viçosa, MG:UFV.

Hungria, M. 2011. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 36 p. (Embrapa Soja. Documentos, 325).

Kandeler, E.; Gerber, H. Short term assay of soil urease activity using colorimetric determination ammonium. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, 6:68-72.

Lubbers, M. W. 1993. Genetic and biochemical studies on the urease enzyme system of *Schizosaccharomyces Pombe*. 196 f. Thesis (Doctorate Philosophy in Genetic) - Massey University, New Zealand.

Morais, T.P. 2012. Adubação nitrogenada e inoculação com *Azospirillum* em híbridos de milho. 71f Dissertação (Obtenção de título de mestre). Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia Minas Gerais.

Skoubris, S.; Labigne, A.; De Reuse, H. The amie aliphatic amidase and AmiF formamidase of *Helicobacter pylori*: natural evolution of two enzyme paralogues. *Mol. Microbiol*, v. 40, p. 596–609, 2001.

Tabatabai, M. A. Soil enzymes. 1994 In: Weaver, R. W.; Angle, S.; Bottomley, P. J. et. al., (Ed.) *Methods of Soil Analysis. Part 2: Microbiological and Biochemical Properties*, Soil Science Society of America, Madison 775 - 833.