

CAPÍTULO XIX

DIVERSIDADE METABÓLICA DA COMUNIDADE BACTERIANA DA RIZOSFERA DE PLANTAS DE MILHO INOCULADAS COM *AZOSPIRILLUM* SP

**Denise Pacheco dos Reis
Lívia Maria Ferraz da Fonseca
Talita Coeli D'Angelis de Aparecida Ramos
Christiane Abreu de Oliveira Paiva
Lauro José Moreira Guimarães
Ivanildo Evódio Marriel**

IDADE METABÓLICA DA COMUNIDADE BACTERIANA DA RIZOSFERA DE PLANTAS DE MILHO INOCULADAS COM *AZOSPIRILLUM SP*

Denise Pacheco dos Reis

Universidade Federal de São João del Rei, Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo/Embrapa Sete Lagoas.

Sete Lagoas – MG

Lívia Maria Ferraz da Fonseca

Universidade Federal de São João del Rei, Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo/Embrapa Sete Lagoas.

Sete Lagoas – MG

Talita Coeli D'Angelis de Aparecida Ramos

Universidade Federal de São João del Rei, Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo/Embrapa Sete Lagoas.

Sete Lagoas – MG

Christiane Abreu de Oliveira Paiva

Embrapa Milho e Sorgo, Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo/Embrapa Sete Lagoas

Sete Lagoas – MG

Lauro José Moreira Guimarães

Embrapa Milho e Sorgo, Núcleo de Recursos Genético e Geração de Cultivares/Embrapa Sete Lagoas

Sete Lagoas – MG

Ivanildo Evódio Marriel

Embrapa Milho e Sorgo, Universidade Federal de São João del Rei Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo/Embrapa Sete Lagoas

Sete Lagoas – MG

RESUMO: O inoculante a base de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* tem sido utilizado na cultura do milho como alternativa para economia de nitrogênio e redução de custos da produção agrícola. Por este motivo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes métodos de aplicação de inoculante com *Azospirillum brasilense* sobre o perfil metabólico da comunidade microbiana da rizosfera de plantas de milho. 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 Nitrogênio (N) em cobertura (0, 40 e 80 kg.ha⁻¹ N). Amostras de solo rizosférico foram coletadas no estágio de florescimento, e a diversidade metabólica foi medida através de microplacas com 31 substratos de carbono (Biolog Ecoplate). Os resultados obtidos mostram efeitos significativos para métodos de aplicação de inoculante e dose de N aplicada. Também foram verificadas diferenças na utilização de grupos de carbono e preferências por fontes, indicando que padrão de utilização de fontes de carbono é afetado pela dose de N usada e pelo método de

aplicação de inoculantes contendo *Azospirillum*. Dois grupos de substratos apresentaram-se mais utilizados preferencialmente na rizosfera de plantas de milho, independente da inoculação, a saber: carboidratos e ácidos carboxílicos, e tiveram como fontes de carbono d-celobiose, d-lactose, arginina, asparagina, teorina, ácido pirúvico e glicerolfosfato.

PALAVRAS-CHAVE: Sustentabilidade, biofertilizantes, produção agrícola.

1-INTRODUÇÃO

A aplicação de inoculantes em diferentes culturas tem se tornado cada vez mais atraente, uma vez que irá reduzir substancialmente o emprego de fertilizantes e pesticidas industriais (BERG, 2009, HUNGRIA et al., 2010). Entre os diferentes gêneros usados para a inoculação encontra-se o *Azospirillum*, que possui destaque, estando entre os mais estudados e divulgados (BASHAN & HOLGUIN, 1997). O milho está entre as plantas agrícolas sobre as quais tem se empregado o uso de biofertilizantes, a fim de suprir e minimizar a alta quantidade de nitrogênio exigida para se obter elevadas produções.

As diferentes práticas de manejo e uso da terra podem influenciar de forma significativa a comunidade microbiana do solo (RÖESCH et al. 2007). Todavia, pouco se sabe sobre os impactos da inoculação com bactérias do gênero *Azospirillum* sobre a estrutura e a função da comunidade microbiana autóctone do solo.

A utilização de microrganismos e processos microbianos para avaliar alterações no ambiente edáficos se justifica pela capacidade que a microbiota possui em responder prontamente às mudanças no solo (STENBERG, 1999). Bactérias apresentam versatilidade no metabolismo de N e de Carbono (C). Como fontes de C, elas têm preferência pelos ácidos orgânicos como malato, piruvato e succinato, sendo também utilizadas frutose e glucose (QUADROS, 2009). A diversidade metabólica dessas bactérias medida por diferentes fontes de carbono tem se tornado uma ferramenta útil para o monitoramento das mudanças ambientais.

O sistema biológico, que utiliza microplacas GN2, introduzido inicialmente para identificação de bactérias gram-negativas, tem sido utilizado para caracterização de bactérias através de *fingerprints* metabólicos gerados pelo padrão de utilização de diferentes substratos de carbono (GARLAND & MILLS, 1991; ZAK et al., 1994; GARLAND 1997).

O princípio deste método consiste na habilidade de um microrganismo utilizar e oxidar uma quantidade pré-selecionada de diferentes fontes de carbono. A utilização de cada substrato é detectada pela redução do tetrazolium, que produz uma cor púrpura característica (BRADLEY et al., 2006; GARLAND & MILLS, 1991; KONOPKA et al., 1998).

Diante desse cenário, o objetivo do trabalho foi avaliar a influência de diferentes métodos de aplicação de inoculante com *Azospirillum brasilense* sobre o perfil metabólico da comunidade microbiana da rizosfera de plantas de milho.

2-MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de solo

Amostras de solo rizosférico foram coletadas de híbridos de milho BRS 1055 cultivadas em latossolo vermelho distrófico, durante o estágio de florescimento em área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas – MG. As plantas de milho foram inoculadas com *Azospirillum brasilense* pertencente à coleção de microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo, preparado de acordo com a metodologia descrita por Oliveira et al. (2012), e aplicado através de 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⁻¹ N), em blocos casualizados, com parcela subdividida e quatro repetições.

Diversidade funcional de bactérias

A determinação da diversidade funcional bacteriana foi realizada através da metodologia descrita por Zak et al. (1994). Amostras de 5 g de solo foram suspendidas em 90 mL de solução salina (0,85% NaCl) e agitadas por 30 min. Cerca de 5 mL dessa suspensão foi centrifugada a 1.900 g, durante 15 min. Alíquotas de 120µL do sobrenadante foram transferidas para cada cavidade das placas EcoPlate (Biolog, Inc., Hayward, CA, EUA) que é composta por seis grupos de 31 substratos diferentes (ácidos carboxílicos, carboidratos, polímeros, aminoácidos, amidos), além do controle (cavidade sem substrato). As placas foram incubadas no escuro durante 5 dias, com realização de leituras no intervalo de 24, 48, 72 e 96 horas em um espectrofotômetro leitor de placas, em 590 nm, no qual foi medido o desenvolvimento da cor pela oxidação de substratos durante a respiração dos microrganismos. Utilizou-se a leitura de 72 horas para cálculos componentes da diversidade funcional.

Os componentes da diversidade funcional, atividade total, diversidade metabólica e índice de Shannon (H) foram estimados de acordo com Zak et al. (1994). Os valores da atividade total foram transformados utilizando-se a média das leituras dos 31 substratos de cada amostra e repetição por AWCD (Average Well Colour Development), por meio da divisão da atividade de utilização dos substratos - leitura em absorbância (nm) da cor desenvolvida - em cada cavidade pelo valor médio da leitura da placa inteira (GARLAND; MILLS, 1991). Os valores acima de zero foram considerados como reação positiva, evidenciando a utilização de substratos, enquanto que os valores negativos, a ausência de uso do substrato.

Análise estatística

A análise de variância foi realizada a ($p < 0,05$) e o teste de regressão e comparação de médias foram realizadas pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade para as características avaliadas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o aplicativo computacional Sisvar (2010), de acordo com o modelo estatístico $Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$.

3-RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise da diversidade funcional da população bacteriana do solo, com base no desenvolvimento médio de cor (AWCD), índice de Shannon (H), riqueza de substrato (S), *Azospirillum*, buscou-se uma melhor compreensão de possíveis alterações na comunidade microbiana na rizosfera de plantas inoculadas com *Azospirillum* sob diferentes métodos de aplicação.

Observou-se que existem diferenças significativas ($p < 0,05$) para a dose de N aplicada, mostrando que a atividade de utilização de fontes de C pode ser influenciada pela dose de N aplicada.

Quando se analisaram os valores médios do padrão de utilização dos substratos (AWCD) das 31 fontes de carbono, através de seis grupos de carbono (ácidos carboxílicos, carboidratos, polímeros, aminoácidos, amidos), foram verificadas diferenças significativas ($p < 0,01$), com uma maior utilização de carboidratos, seguidos de ácido carboxílico e os demais com utilização semelhante, independente dos métodos de inoculação e da disponibilidade de nitrogênio (Figura 1).

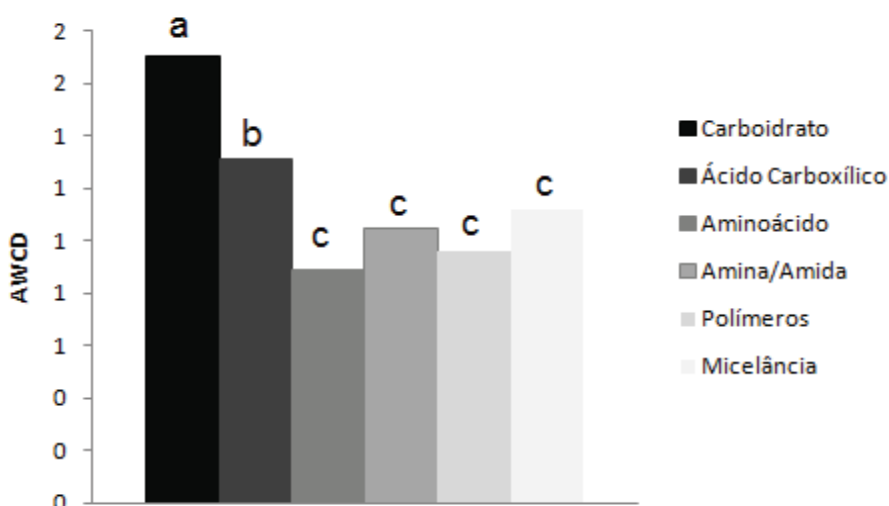


Figura 1- Agrupamento de fontes de carbono das placas de biologia Ecoplate. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.

Vale salientar que, de modo geral, as interações métodos de inoculação e níveis de N foram também significativas, indicando que o carbono utilizado varia em função do inoculante e da dose de N aplicada.

Quando os grupos foram analisados em relação ao método de aplicação do inoculante, os valores de AWCD variaram entre 0,47 para aminoácido sem inoculação e 2,20 para carboidrato sem inoculante, apresentando diferenças significativas entre os grupos de carbono e inoculantes ($p < 0,01$). Dentro dos grupos carboidratos, aminoácidos e micelânias foram verificadas diferenças (Scott Knott-5%) em relação ao inoculante aplicado (Tabela 1).

	Ácido		Amina/			
	Carboidrato	Carboxílico	Aminoácido	Amida	Polímeros	Micelância
Sulco	1.84a	1.19a	0.50b	0.81a	0.89a	0.92b
Semente	1.46b	1.09a	0.94a	1.48a	1.27a	1.10b
Pulverização 10DAG	1.20b	1.41a	1.17a	0.92a	1.19a	0.98b
Sulco +Puv 20DAG	1.75a	1.42a	0.82a	0.86a	1.09a	1.05b
Semente +Puv 20DAG	1.44b	1.10a	1.30a	0.93a	0.84a	0.81b
Pulverização						
10DAG+20 DAG	1.82a	1.47a	1.05a	1.14a	1.32a	1.27a
Sem inoculante	2.2a	1.48a	0.47b	1.18a	1.22a	1.44a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade

Tabela 1- Padrão de utilização de substratos de carbono (AWCD) de diferentes grupos de carbono em relação ao métodos de aplicação de inoculantes

A avaliação da utilização de fontes dentro de cada grupo também apresentou diferenças significativas para carboidratos, com a seguinte ordem de preferência: d-celobiose > d-lactose > methylglucose > acetilglucosamida > d-xylose > erythritol > manitol. Dentre os aminoácidos, observou-se maior utilização de -arginina > asparagina > teorina > fenilalanina > serina > ácido glutâmico. Por fim, para a micelânias, observou-se a ordem: ácido pirúvico > glicerolfosfato > glifosfato (Figura 2).

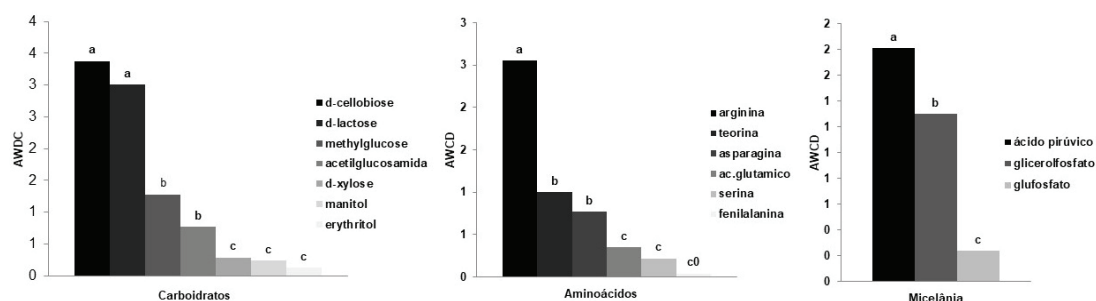


Figura 2- Padrão de utilização de substratos de carbono (AWCD) de cada grupo de fontes de carbono independente do inoculante e da dose de N aplicada. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.

A análise de AWCD para a interação de grupo x nitrogênio x dose apresentou menor valor (0,03) no grupo dos aminoácidos na dose 0 e o maior (3,25) no grupo de carboidratos na dose de 40 Kg.ha⁻¹. Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram observadas e, de acordo com o teste de Scott Knott a 5%, os carboidratos, os aminoácidos e os polímeros apresentaram diferenças em relação ao método de aplicação de inoculante e à dose de 40Kg.ha⁻¹. A amina e a micelânia apresentaram diferenças somente na dose 40Kg.ha⁻¹ e os aminoácidos não apresentaram diferenças.

As mudanças no perfil funcional da comunidade microbiana na rizosfera de plantas de milho nesse trabalho em relação à AWCD podem ser explicadas pela diversidade genética, pelos efeitos ambientais na expressão gênica e pelas interações ecológicas entre as diferentes populações (ZAK et al. 1994).

A diversidade verificada através do índice de Shannon (H) apresenta valores que podem variar de 0 a 4 (ZAK et al. 1994). O índice de Shannon (H), que representa a diversidade de espécies, nesse trabalho, apresentou variações de 2,85 a 3,23, indicando que existe a presença de grande diversidade na utilização dos 31 substratos de fontes de carbono, porém não foi afetado significativamente pelos tratamentos avaliados.

A presença dessa diversidade sem efeitos significativos pode estar relacionada à presença do inoculante e não à dose de N aplicada, que, conforme relatado por Lupwayi et al. (2010), ao avaliarem o efeito da adubação nitrogenada com ureia, esta pode ter efeitos significativos sob a diversidade de Shannon em Sistemas de Plantio Direto e convencional nas comunidades bacterianas. Estes autores relataram diferenças em relação às áreas adubadas com ureia e ao controle sem essa adubação nitrogenada.

Quanto à utilização dos substratos (S), os valores foram de 18 a 28, com utilização que pode ser considerada alta. Esses parâmetros não foram influenciados pelo método de inoculação e doses de N.

Os microrganismos do solo apresentam alta diversidade metabólica característica que as tornam versáteis para ocupar diversos nichos ecológicos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2007).

4-CONCLUSÕES

O padrão de utilização de fontes de carbono é afetado pela dose de N e pelo método de aplicação de inoculantes a base de *Azospirillum*. Os dois grupos de substratos utilizados preferencialmente na rizosfera de plantas de milho, independente da inoculação, são carboidratos e ácidos carboxílicos e as fontes de carbono são d-celobiose, d-lactose, arginina, asparagina, teorina, ácido pirúvico e glicerolfosfato.

5-AGRADECIMENTOS

À Capes pela concessão da bolsa, à FAPEMIG, CNPq, Embrapa Milho e Sorgo e UFSJ, pela infraestrutura e recursos financeiros para a execução do trabalho.

REFERÊNCIAS

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Azospirillum- plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 103-121, 1997.

BERG G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 11-18, 2009.

BRADLEY, R.L; SHIPLEY, B.; BEAULIEU, C. Refining numerical approaches for analyzing soil microbial community catabolic profiles based on carbon source utilization patterns. **Soil Biol. Biochem.**, v. 38, p. 629-632, 2006.

GARLAND, J. L. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. **Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Ecology**, v. 24, p. 289-300, 1997.

GARLAND, J.L.; MILLS, A. L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2351-2359, 1991.

HUNGRIA, M; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil** (Print), v. 331, p. 413-425, 2010.

KONOPKA, A.; OLIVER, L.; URCO Jr., R.F. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. **Micro. Ecol**, v. 35, p. 103-115, 1998.

LUPWAYI, N.Z.; GRANT, A. C.; SOON, Y, K.; CLAYTON; G. W.; BITTMAN, S.; MALHI, S. S.; ZEBARTH, B, J.; Soil microbial community response to controlled-release urea fertilizer under zero tillage and conventional tillage. **Applied Soil Ecology**, v. 45, p. 254-261, 2010.

OLIVEIRA, C. A.; GOMES, E. A.; MATTOS, B. B.; TEIXEIRA, J. A. de M.; CRISTELLI, E. A.; DIAS, F. E. S.; BARACHO, A. de O.; MARRIEL, I. E. Utilização de bioinoculantes para

cultivo de milho (*Pennisetum glaucum*) com fontes naturais de fosfato. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 30.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 14.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 12.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 9.; SIMPÓSIO SOBRE SELÊNIO NO BRASIL, 1., 2012, Maceió. A responsabilidade socioambiental da pesquisa agrícola: **Anais...** Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2012.

QUADROS, P. D. **Inoculação de *Azospirillum* spp. em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul.** 2009. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2009.

RÖESCH.; FULTHORPE, R. R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A. K.; KENT, A. D.; DAROUB, S. H.; CAMARGO, F. A.; FARMERIE, W. G.; TRIPLETT, E. W.; Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **ISME J.** v 1(4), p. 283-290, 2007.

STENBERG, B. Monitoring soil quality of arable land: microbial indicators. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B- Plant Soil Science**, London, v. 49, p.1-27, 1999.

ZAK, J. C.; WILLIG, D. L.; WILDMAN, H. G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biol. Biochem**, v. 26, p.1101-1108, 1994.

ABSTRACT: The inoculant based on diazotrophic bacteria of the genus *Azospirillum* has been used in the maize crop as an alternative for nitrogen saving and reduction of costs of agricultural production. Thus, this study aimed to evaluate the influence of different methods of application of inoculant with *Azospirillum brasilense* on the metabolic profile of the microbial community of the rhizosphere of maize plants. The following treatments were tested: seven methods of application of inoculant (in the furrow, seed, foliar via at 10 days after germination (DAG), furrow + foliar via 20 DAG, seed + foliar via at 20 DAG, foliar via at 10DAG and 20DAG, and without inoculant) and three Nitrogen (N) doses in coverage (0, 40 and 80 kg.ha⁻¹ N). Rhizospheric soil samples were collected in the flowering stage, and the metabolic diversity was measured through microplates with 31 carbon substrates (Biolog Ecoplate). The results showed significant effects for methods of inoculant and N dose application. We observed differences in the use of carbon groups and preferences by sources, which indicates that the pattern of carbon source utilization is affected by the N dose used and by the application method of inoculants containing *Azospirillum*. Two groups of substrates were used preferentially in the rhizosphere of maize plants, regardless of inoculation, namely: carbohydrates and carboxylic acids. They had as carbon sources d-cellobiose, d-lactose, arginine, asparagine, pyruvic acid and glycerol phosphate.

KEYWORDS: Sustainability, biofertilizers, agricultural production.

Atena Editora

**ELEMENTOS DA NATUREZA E PROPRIEDADES DO
SOLO - Vol. 2**

Atena Editora
2018

2018 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Edição de Arte e Capa: Geraldo Alves

Revisão: Os autores

Conselho Editorial

Profª Drª Adriana Regina Redivo – Universidade do Estado de Mato Grosso
Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Pesquisador da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Carlos Javier Mosquera Suárez – Universidad Distrital de Bogotá-Colombia
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª. Drª. Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Profª Drª. Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª. Drª. Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
A864e	Atena Editora. Elementos da natureza e propriedades do solo – Vol. 2 [recurso eletrônico] / Atena Editora. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2018. 6.009 kbytes – (Ciências Agrárias; v.2) Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web ISBN 978-85-93243-66-0 DOI 10.22533/at.ed.660182302 1. Agricultura. 2. Ciências agrárias. 3. Solos. 4. Sustentabilidade. I. Título. II. Série. CDD 631.44
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

O conteúdo do livro e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos respectivos autores.

2018

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

www.atenaeditora.com.br

E-mail: contato@atenaeditora.com.br

Elementos da Natureza e Propriedades do Solo Vol. 2

Atena Editora



 *Atena*
Editora
www.atenaeditora.com.br

Ano
2018