



## Seleção de Bactérias Promotoras de Crescimento de Milho Isoladas de Lodo de Esgoto de Abatedouro de Aves<sup>(1)</sup>.

**Lilian Estrela Borges Baldotto<sup>(2)</sup>; Jorge Avelino Rodriguez Lozada<sup>(3)</sup>; Klever Cristiano Silveira<sup>(4)</sup>; Marihus Altoé Baldotto<sup>(5)</sup>.**

<sup>(1)</sup> Trabalho executado com recursos da FUNARBE (FUNARPEQ-2014).

<sup>(2)</sup> Professora; Universidade Federal de Viçosa; Florestal, MG; lilian.estrela@ufv.br; <sup>(3)</sup> Estudante; Universidade Federal de Viçosa; <sup>(4)</sup> Estudante, Universidade Federal de Viçosa; <sup>(5)</sup> Professor, Universidade Federal de Viçosa.

**RESUMO:** Os altos custos econômicos e ambientais gerados pela fertilização nitrogenada têm incrementado o interesse na procura de sistemas que diminuam a aplicação de fertilizantes sem pôr em risco os rendimentos das culturas. O trabalho objetivou: (i) isolar e quantificar bactérias diazotróficas do lodo de esgoto de abatedouro de aves, (ii) caracterizar as bactérias de acordo com a morfologia celular da colônia e (iii) avaliar o crescimento e conteúdo de N de plantas de milho em resposta a inoculação bacteriana. Foram isoladas 16 estirpes bacterianas, sendo quatro do meio JMV, duas do JMVL, quatro do NFb, três do JNFb, uma do LGI e duas do LGI-P. Todas as estirpes bacterianas apresentaram coloração gram positiva e diferiram na morfologia celular. Para avaliar a fixação biológica de nitrogênio em viveiro, realizou-se a inoculação bacteriana em sementes de milho. O experimento consistiu de 17 tratamentos (16 estirpes bacterianas e um controle sem inoculação), conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições e tendo como unidade experimental um vaso contendo duas plantas de milho. Aos 45 dias, foram mensuradas as características de crescimento e conteúdo de N. Os maiores índices nas variáveis avaliadas foram obtidos com o isolado UFV L-162, que resultou uma matéria seca total de 0,68 g e um conteúdo de N de 22,14 mg/planta, representando incrementos de 74% e 133%, respectivamente, em relação ao controle. Conclui-se que bactérias diazotróficas habitam naturalmente o lodo de esgoto do abatedouro de aves e promovem o crescimento de plantas de milho.

**Termos de indexação:** *Zea mays* L., bactérias diazotróficas, resíduos sólidos.

### INTRODUÇÃO

As interações entre BPCP-milho-ambiente têm sido demonstradas em vários trabalhos e por diversos autores (Kappes et al., 2013), apresentando resultados promissores na procura de sistemas de fertilização econômicos e sustentáveis.

Bactérias diazotróficas já foram isoladas de diferentes fontes, como por exemplo órgãos das

plantas (Döbereiner et al., 1995) e solos (Nóbrega et al., 2004). Os lodos de esgoto de abatedouro de aves, por apresentarem uma riqueza microbiana (Bettiol & Fernandes, 2004), talvez também abriguem bactérias diazotróficas. Estes lodos são definidos como uma mistura de substâncias que geralmente se caracterizam por apresentarem minerais, colóides e partículas provenientes de matéria orgânica decomposta em suspensão no meio aquoso (CONAMA, 2006).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos: (i) isolar e quantificar bactérias diazotróficas de lodo de esgoto de abatedouro de aves em diferentes meios de cultura, (ii) caracterizar as bactérias de acordo com a morfologia celular e morfologia da colônia e (iii) selecionar os isolados bacterianos promotores de crescimento de plantas de milho em casa-de-vegetação.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Coleta e caracterização das amostras de lodo

Amostras de lodo de esgoto de abatedouro de aves (resíduo gerado no sistema de tratamento de efluentes do tipo Lodos Ativados/Aeração Prolongada) foram cedidas pelas Organizações FRANCAP S.A., Pará de Minas - MG. As amostras foram transportadas para o Setor de Floricultura da Universidade Federal de Viçosa, Campus Florestal, onde foram realizados os trabalhos microbiológicos nos anos de 2013 e 2014.

#### Isolamento e quantificação de bactérias

O isolamento de bactérias diazotróficas foi realizado conforme descrito por Döbereiner et al. (1995) nos meios de cultura JNFb, NFb, LGI, LGI-P, JMV e JMVL. A formação de uma película aerotóxica típica na superfície do meio após 7 dias de incubação em câmara de crescimento a 30°C, foi considerado como crescimento positivo. A contagem das bactérias presentes no meio de cultura foi realizada por meio da técnica do Número Mais Provável, utilizando à Tabela de McCrady para três repetições por diluição. Os resultados obtidos foram submetidos à transformação logarítmica, em



seguida, foram calculadas as médias e o erro padrão da média para cada tratamento.

### Caracterização celular e das colônias

Após o isolamento, as bactérias foram crescidas em meio líquido DYGS por 24 h, a 30°C e 120 rpm e colocadas em placas de Petri contendo esse mesmo meio porém sólido. As placas permaneceram em estufa bacteriológica a 30°C por 7 dias, e as colônias que ali cresceram, foram caracterizadas de acordo com as características das células (forma e coloração gram) e as características das colônias (forma, cor, tamanho, elevação, borda, superfície e mucosidade).

### Seleção de bactérias diazotróficas

O ensaio de seleção bacteriana consistiu de 17 tratamentos, sendo 16 isolados bacterianos e um controle (sem inoculação), conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com 6 repetições e a unidade experimental foi um vaso contendo 2 plantas de milho.

Para obtenção do pré-inóculo, as bactérias foram crescidas em 5 mL de meio líquido DYGS por 24 h, a 30 °C e 120 rpm. Em seguida, o pré-inóculo foi vertido em frascos de erlenmeyer contendo 200mL de meio DYGS e permaneceram por 24h, sob agitação de 120 rpm, a 30°C, para obtenção do inóculo. A inoculação foi realizada no erlenmeyer pela imersão das sementes de milho. Cada tratamento ficou imerso no meio bacteriano por 2 horas, com posterior aplicação do mesmo meio bacteriano no substrato. O controle foi imerso em meio líquido DYGS autoclavado. Posteriormente, as sementes foram transferidas para vasos de plástico de 0.7dm<sup>3</sup> O substrato usado apresentava: pH 4.1; P 6.8, K 78 mg/dm<sup>3</sup>; Ca 0.6, Mg 0.3, Al 1.4, H+Al 7.59, SB 1.10, CTC(t) 2.50, CTC(T) 8,69 cmolc /dm<sup>3</sup>; V 13, m 56 %. O experimento foi conduzido em casa de vegetação.

Aos 45 dias após plantio, as plantas foram coletadas para a mensuração das seguintes variáveis: altura da planta (ALT); diâmetro do caule (DIAM); número de folhas (NF); matéria fresca da raiz (MFR); matéria fresca da parte aérea (MFPA); matéria fresca total (MFT); matéria seca da raiz (MSR); matéria seca da parte aérea (MSPA); matéria seca total (MST), obtidas pela secagem em estufa sob ventilação forçada de ar a 65 °C por 72 horas e posterior pesagem em balança de precisão.

A análise de nitrogênio (N) foi realizada no Laboratório de Análise de Solos Viçosa Ltda., com três repetições por tratamento e foi utilizada metodologia de N- Kjeldahl. Os conteúdos de N

foram estimados por meio da multiplicação da matéria seca total (MST) pelo teor de nitrogênio.

Os dados foram submetidos à análise de variância por meio do programa R e as médias foram comparadas pelo teste de TUKEY a 5 % de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas 16 estirpes de bactérias diazotróficas do lodo de esgoto de abatedouro de aves em diferentes meios de cultivo (**Tabela 1**, **Figura 1**).

**Tabela 1** - Número de estirpes diazotróficas isoladas por meio de cultivo e a respectiva diluição.

Meio de cultivo	Número de isolados	Diluição
JMV	4	10 <sup>6</sup>
JMVL	2	10 <sup>6</sup>
NFB	4	10 <sup>6</sup>
JNFB	3	10 <sup>5</sup>
LGI	1	10 <sup>6</sup>
LGI-P	2	10 <sup>6</sup>
Total	16	

Todos os isolados bacterianos apresentaram coloração gram-positiva, formato de cocos ou bastonete e diferiram nas características morfológicas das colônias (**Tabela 2**).

Foi possível observar efeito positivo com aplicação de bactérias diazotróficas em todas as variáveis analisadas nas plantas de *Zea mays* e estatisticamente significativo para as variáveis MFR, MFT e conteúdo de N (**Tabela 3**).

Os isolados bacterianos que permitiram o maior acúmulo de MFT foram o UFVL-163 e o UFV-L164, com incrementos de 96 e 81% em relação ao controle, respectivamente. Dados que corroboram, os resultados de Perin et al. (2003), ao encontrar incrementos, na MFT em plantas de milho entre 2 a 28% após utilizar bactérias das espécies *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum brasilense*. A cultura do milho é a mais utilizada para a produção de silagem, pois tem qualidades superiores a outras espécies (Cruz et al., 2001). O uso de BPCP em milho, destinado à silagem pode se tornar uma alternativa viável e rentável para produzir alimentos a espécies animais em sistemas estabulados, semi-estabulados ou em épocas de baixa produção de forragens (Matte, 2014).

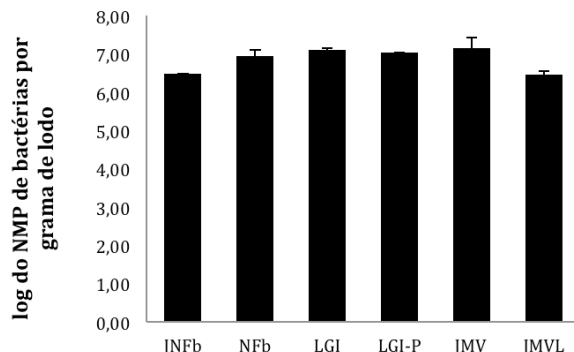
Ao realizar análises sob o acúmulo de matéria fresca por parte da planta, pode-se observar que existe um incremento de 91% nas raízes com o uso



do isolado UFVL-164 comparado ao controle. Os resultados estão na mesma linha de Perin et al. (2003), que acharam em estudos com *Zea mays*, após de ser inoculadas com bactérias diazotróficas (*H. seropedicae* e *A. brasilense*), um acúmulo de biomassa radicular de 3 e 17 %. Ao existir uma maior biomassa MFR, existe a possibilidade que as plantas sejam mais eficientes na absorção dos nutrientes e da água do solo. Por conseguinte, isto será refletido, em uma maior biomassa área, uma melhor sanidade vegetal e uma boa produção na maioria dos casos.

Nesta mesma tabela 4, também se pode observar, na última coluna, os conteúdos de N por planta. Os maiores incrementos foram encontrados com o uso da bactéria UFVL-162, de 134% em relação ao controle. Obando et al. (2013) observaram incrementos no conteúdo de N de 41 % com a inoculação de *Azotobacter* em milho

No presente trabalho foi possível observar a capacidade de colonização das bactérias diazotróficas em ambientes de resíduos, tais como os lodos de esgoto de abatedouros de aves.



**Figura 1.** Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas em lodos de esgoto de abatedouros de aves nos diferentes meios de cultura (log do número mais provável de bactérias diazotróficas por grama de lodo).

## CONCLUSÕES

1. As bactérias diazotróficas habitam naturalmente o lodo de esgoto do abatedouro de aves em quantidade superior a  $4,6 \times 10^7$  células por grama de lodo.
2. Predominam no lodo de esgoto de abatedouro de aves bactérias diazotróficas gram-positivas, no formato de coccus ou bastonete, formando colônias com diferentes características morfológicas.
3. Os isolados bacterianos UFVL-162, UFVL-163 e UFVL-164 promovem o crescimento e

desenvolvimento de plantas de milho e possuem potencial para uso no enriquecimento de inoculantes e biofertilizantes.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às Organizações FRANCAP S.A., à FUNARBE e à CAPES.

## REFERÊNCIAS

BETTIOL, W. & FERNANDES, P. Efeito do lodo de esgoto na comunidade microbiana e atributos químicos do solo. Embrapa Meio Ambiente. Comunicado Técnico, p.6, 2004.

CONAMA. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res37506.pdf>>. Acesso em 25 mai. 2015.

CRUZ, J.; PEREIRA, A.; RODRIGUES, S.; FERREIRA, J. Produção e utilização de silagem de milho e sorgo. Embrapa Milho e Sorgo, p. 544, 2001.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.; BALDANI, J. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa Agrobiologia, Seropédica. 66p., 1995.

KAPPES, C.; ARF, O.; ARF, V.; FERREIRA J.; BEM, E.; PORTUGAL, R.; VILELA, R. Inoculação de sementes com bactérias diazotróficas e aplicação de nitrogênio em cobertura e foliar em milho. Ciências Agrárias, 34:527-538, 2013.

MATTE, L. Adição de inoculante com *Azospirillum* brasilense combinado com níveis de nitrogênio na cultura de milho para silagem. Descalvado: Universidade Camilo Castelo Branco, 2014. 47p. Dissertação de Mestrado.

NÓBREGA, A.; MOREIRA, S.; SIQUEIRA, O.; LIMA, S. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. Revista Brasileira Ciência do Solo, 28:269-279, 2004.

OBANDO, M.; RIVERA, D.; BONILLA, R. Respuesta fisiológica a la fertilización por *Azotobacter chroococcum* AC1 y fertilización nitrogenada de síntesis sobre el maíz (*Zea mays* L.) en invernadero. BioTecnología, v.17, p.11-22, 2013.

PERIN, L.; SILVA, M.; FERREIRA, S.; CANUTO, L.; MEDEIROS, A.; OLIVARES, L.; REIS, M. Avaliação da capacidade de estabelecimento endofítico de estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em milho e arroz. Agronomia, v.37, p.47-53, 2003.

**Tabela 2.** Caracterização das colônias dos isolados bacterianos de lodo de esgoto de abatedouro de aves nos meios específicos. Identificação dos isolados bacterianos: nome UFV seguido dos caracteres que indicam: Lodo de esgoto de abatedouro de aves (L), meio de cultura usado no isolamento (1 – JMV, 2 – JMV L, 3 – NFb, 4 – JNFb, 5 – LGI, 6 – LGI-P), diluição, ordem.

Caracterização das colônias							
Estirpe	Coloração	Tamanho	Elevação	Forma	Borda	Superfície	Muco
UFV L-161	Centro branco leitoso	<1 mm	Lente	Circular	Inteira	Lisa	+
UFV L-162	Centro branco claro, borda branca e translúcida	<1 mm	Plana	Circular	Ondulada	Lisa	+
UFV L-163	Centro branco leitoso, borda branca e translúcida.	1 mm	Lente	Circular	Inteira	Lisa	+
UFV L-164	Centro branco, borda branca e translúcida	1 mm	Plana	Circular	Inteira	Lisa	+
UFV L-261	Centro branco leitoso	1 mm	Lente	Circular	Ondulada	Lisa	+
UFV L-262	Centro amarelo leitoso	>1 mm	Convexa	Circular	Ondulada	Lisa	+
UFV L-361	Centro branco leitoso	<1 mm	Lente	Circular	Inteira	Lisa	+
UFV L-362	Centro branco leitoso	>1 mm	Convexa	Circular	Inteira	Lisa	+
UFV L-363	Centro branco	1 mm	Plana	Circular	Inteira	Lisa	+
UFV L-364	Centro branco claro, borda translúcida	>1 mm	Lente	Circular	Inteira	Lisa	+
UFV L-451	Centro branco leitoso, borda translúcida	<1 mm	Plana	Circular	Ondulada	Lisa	+
UFV L-452	Centro branco borda translúcida	<1 mm	Lente	Circular	Inteira	Lisa	+
UFV L-453	Centro branco leitoso, borda branca e translúcida	>1 mm	Convexa	Circular	Inteira	Lisa	+
UFV L-562	Centro branco claro, borda translúcida	<1 mm	Plana	Circular	Inteira	Lisa	-
UFV L-661	Centro branco claro, borda e clara	<1 mm	Plana	Circular	Inteira	Lisa	-
UFV L-662	Centro branco claro, borda e clara	<1 mm	Convexa	Circular	Inteira	Lisa	-

**Tabela 3.** Características de crescimento de *Zea mays* em resposta à inoculação de bactérias diazotróficas: ALT, altura da planta; DIAM, diâmetro do caule; NF, número de folhas; MFR, matéria fresca da raiz; MFPA, matéria fresca da parte aérea; MFT, matéria fresca total; MSR, matéria seca da raiz; MSPA, matéria seca da parte aérea; MST, matéria seca total; Cot./N, conteúdo de nitrogênio; QMR, quadrado médio do resíduo e CV, coeficiente de variação.

Tratamento	ALT	DIAM	NF	MFR	MFPA	MFT	MSPA	MSR	MST	Cont./ N
	cm	mm	und	g						
Controle	14,10 ab	2,45 ab	4 abcde	1,62 b	4,00 ab	4,0 c	0,10 a	0,28 abc	0,39 ab	9,48 b
UFV L-161	17,53 ab	2,75 ab	6 ab	2,29 ab	4,13 ab	6,30 abc	0,14 a	0,45 ab	0,60 ab	14,68 ab
UFV L-162	17,24 ab	3,08 ab	6 ab	2,18 ab	4,74 a	6,30 abc	0,16 a	0,51 a	0,68 a	22,14 a
UFV L-163	20,35 a	3,33 ab	6 a	3,04 ab	4,13 ab	7,82 a	0,20 a	0,28 abc	0,49 ab	15,17 ab
UFV L-164	19,51 a	3,37 ab	6 ab	3,10 a	3,95 ab	7,23 ab	0,23 a	0,31 abc	0,55 ab	13,50 ab
UFV L-261	18,76 ab	3,50 a	5 abcd	2,20 ab	3,31 ab	6,15 abc	0,16 a	0,24 bc	0,41 ab	11,28 ab
UFV L-262	20,15 a	2,65 ab	5 abcd	2,08 b	3,00 ab	5,39 abc	0,17 a	0,20 bc	0,38 ab	10,17 b
UFV L-361	17,84 ab	2,58 ab	4 bcde	1,71 b	3,62 ab	4,71 bc	0,11 a	0,14 c	0,25 b	8,07 b
UFV L-362	13,45 ab	2,43 b	4 de	1,7 b	3,10 ab	5,32 abc	0,10 a	0,25 abc	0,36 ab	7,96 b
UFV L-363	17,54 ab	2,93 ab	4 de	1,95 b	4,62 a	5,05 abc	0,13 a	0,23 bc	0,36 ab	9,12 b
UFV L-364	13,95 ab	2,68 ab	4 cde	1,93 b	3,40 ab	6,55 abc	0,15 a	0,32 abc	0,48 ab	12,96 ab
UFV L-451	12,08 ab	2,50 ab	3 e	1,93 b	4,19 ab	5,34 abc	0,17 a	0,18 c	0,35 ab	9,57 b
UFV L-452	18,95 ab	3,04 ab	5 abcd	2,41 ab	4,11 ab	6,60 abc	0,17 a	0,29 abc	0,47 ab	10,73 b
UFV L-453	17,58 ab	3,18 ab	5 abcd	2,44 ab	3,75 ab	6,55 abc	0,16 a	0,26 abc	0,42 ab	11,21 ab
UFV L-562	17,62 ab	2,84 ab	5 abcd	1,97 b	3,10 ab	5,70 abc	0,15 a	0,30 abc	0,41 ab	8,280 b
UFV L-661	15,45 ab	2,77 ab	4 abcde	2,04 b	4,18 ab	5,19 abc	0,15 a	0,18 c	0,34 ab	4,63 b
UFV L-662	15,16 ab	3,92 ab	6 abc	2,19 ab	2,55 b	6,38 abc	0,16 a	0,34 abc	0,50 ab	11,98 ab
QMR	14,83	0,266	0,52	0,228	0,935	1,681	0,015	0,0168	0,028	13,696
CV (%)	22,8	17,6	15,1	22,0	25,6	21,8	76,9	45,3	37,4	32,9