



Ecologia Microbiana da Rizosfera de Plantas de Milho Inoculadas com *Azospirillum* sp: III. Diversidade Metabólica da Comunidade Bacteriana⁽¹⁾.

Denise Pacheco dos Reis⁽²⁾; Livia Maria Ferraz da Fonseca⁽³⁾; Talita Coeli D'Angelis de Aparecida Ramos⁽⁴⁾; Christiane Abreu de Oliveira Paiva⁽⁵⁾; Lauro José Moreira Guimarães⁽⁵⁾; Ivanildo Evódio Marriel^(5,6).

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos da FAPEMIG; EMBRAPA E CNPq.

⁽²⁾ Doutoranda em Bioengenharia de Sistemas Ecológicos; Universidade Federal de São João del Rei; São João del Rei, MG, Bolsista CAPES; denisepachecopl@hotmail.com; ⁽³⁾ Mestre em Ciências Agrárias, UFSJ, MG; ⁽⁴⁾ Mestranda Ciências Agrárias UFSJ, MG; ⁽⁵⁾ Pesquisador; Embrapa Milho e Sorgo; ^(5,6) Professor; Universidade Federal de São João del Rei.

RESUMO: O uso de inoculante a base de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* têm sido utilizado na cultura do milho, como alternativa para economia de nitrogênio e redução de custos da produção agrícola. O objetivo desse 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 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 efeito significativos para métodos de aplicação de inoculante, dose de N aplicada. Também foi verificada diferenças na utilização de grupos de carbono e preferências por fontes. Indicando que padrão de utilização de fontes de carbono pode ser afetado pela dose de N usada. Sendo também afetados pelo método de aplicação de inoculantes quando são agrupados. Os dois grupos mais usados são carboidratos e ácidos carboxílicos e das trinta e uma fontes são d-celobiose, d-lactose, arginina, asparagina, teorina, ácido pirúvico e glicerolfosfato.

Termos de indexação: sustentabilidade, biofertilizantes, produção agrícola.

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). Entre os diferentes gêneros usados para a inoculação encontra-se o *Azospirillum*, que possui

relevante destaque, sendo os mais estudados e divulgados (Bashan & Holguin, 1997). O milho está entres as plantas agrícolas onde 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 Roesch et al. (2007). Todavia, pouco se sabe sobre os impactos da inoculação com bactérias do gênero *Azospirillum* sobre a estrutura e função da comunidade microbiana autóctone do solo.

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

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.

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* pertencentes à coleção de

microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo, preparados de acordo com a metodologia descrita por Oliveira et al. (2012), e aplicados 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 foram centrifugados a 1.900 g, durante 15 min. Aliquotas 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 realizações de leitura no intervalo de 24, 48, 72 e 96 horas em um espectrofotômetro leitor de placas, em 590 nm, onde 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, e evidenciam a utilização de substratos e os valores negativos, a ausência de uso do substrato.

Análise estatística

Foi realizada a análise de variância, teste de regressão e comparações de médias 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 $Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$.

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 analisou o padrão de utilização dos substratos (AWCD) das 31 fontes de carbonos, através de seis grupos de carbono (ácidos carboxílicos, carboidratos, polímeros, aminoácidos, amidos). Verificou-se diferenças significativas ($p < 0,01$), com uma maior utilização de carboidratos, seguido de ácido carboxílico e os demais com utilização semelhante, independente da métodos de inoculação e disponibilidade de nitrogênio (Figura 1).

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 a 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 micelênia foi verificada diferenças (Scott Knott-5%) em relação ao inoculante aplicado (**Tabela 1**).

A avaliação de 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 gultamínico. E a micelênia: ácido pirúvico > glicerolfosfato > glufosfato (**Figura 2**).

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 aminoácido e polímeros apresentam diferenças em relação ao método de aplicação de inoculante e a dose de 40Kg.ha⁻¹. As amina e micelânia somente na dose 40Kg.ha⁻¹ e os aminoácidos sem diferenças.

As mudanças no perfil funcional nesse trabalho em relação AWCD, pode ser explicada pela diversidade genética, pelos efeitos ambientais na expressão gênica e das interações ecológicas entre as diferentes populações (Zak et al. 1994).

A diversidade que é 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 verifica a diversidade de espécies, nesse trabalho apresentou variações 2,85 a 3,23, indicando que existe a presença de grande diversidade nos 31 substratos de fontes de carbono, porém não foi significativa entre os tratamentos.

A presença dessa diversidade sem efeitos significativos pode estar relacionada com a presença do inoculante e não a dose de N aplicada. Que conforme relatado por Lupwayi et al. (2010), ao avaliar o efeito da adubação nitrogenada com uréia, verificou que esta pode ter efeitos significativos sob a diversidade de Shannon em Sistemas de Plantio Direto e convencional nas comunidade bacteriana relataram diferenças em relação a áreas adubadas com uréia e controle sem.

Quanto a utilização dos substratos (S), os valores foram de 18 a 28, com uma 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).

CONCLUSÕES

O padrão de utilização de fontes de carbono é pode ser afetado pela dose de N usada. Sendo também afetados pelo método de aplicação de inoculantes quando são agrupados. Os dois grupos mais usados são carboidratos e ácidos carboxílicos e das 31 fontes são d-celobiose, d-lactose, arginina, asparagina, teorina, ácido pirúvico e glicerolfosfato.

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*, 43: 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*. 84:11–18. 2009.

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*, 57: 2351-2359, 1991.

LUPWAYI, N.Z. et al. Soil microbial community response to controlled-release urea fertilizer under zero tillage and conventional tillage. *Applied Soil Ecology*, 45:254-261, 2010.

OLIVEIRA, C. A. et al. Utilização de bioinoculantes para cultivo de milheto (*Pennisetum glaucum*) com fontes naturais de fosfato. In: *FertBio*, Maceio, 2012.

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

RÖESCH, L. F. W et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J*. 1: 283-290, 2007.

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

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

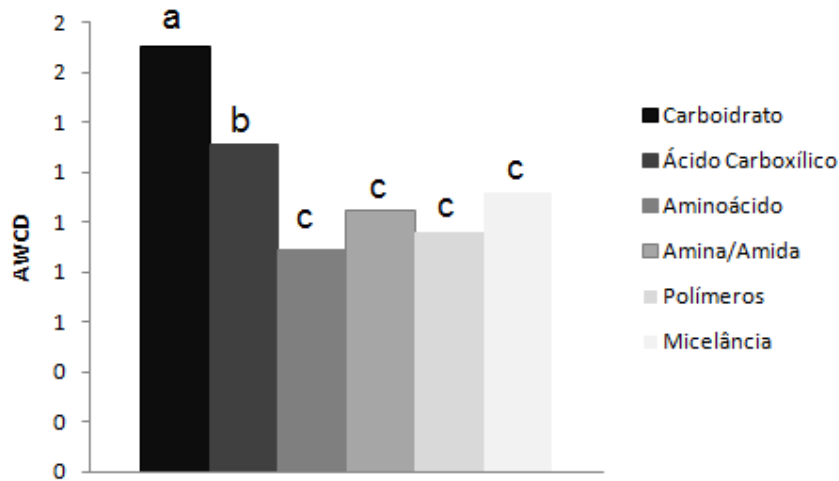


Figura 1- Agrupamento de fontes de carbono das placas de biologia Ecoplate. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.

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

Método de inoculação	Carboidrato	Ácido Carboxílico	Aminoácido	Amina/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

Média seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

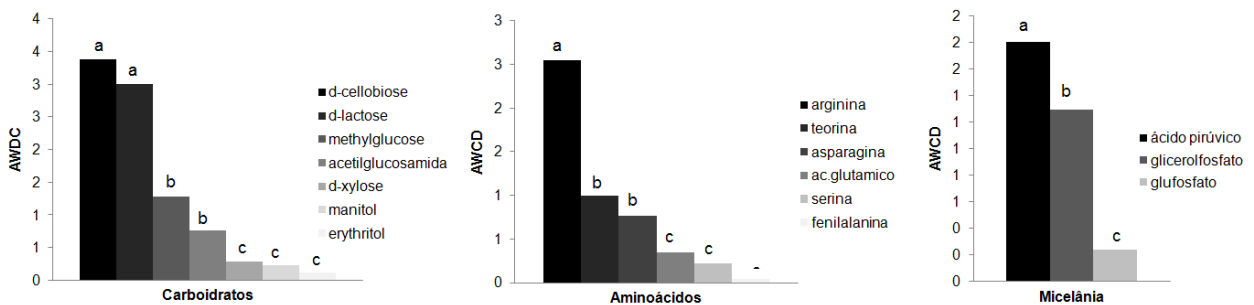


Figura 2- Utilização de substratos dentro de cada grupo de carbono independente do inoculante e dose de N aplicada. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.