

Quantificação de Bactérias Diazotróficas Associadas às Raízes de Milho (*Zea mays* L.)

Mairla Angelina dos Reis⁽¹⁾; Fernando Moreno Rozo⁽²⁾; Jaíza Ellen Borges Cordeiro⁽³⁾; Lílian Estrela Borges Baldotto⁽⁴⁾; Maribus Altoé Baldotto⁽⁵⁾.

⁽¹⁾ Estudante, *Campus* de Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Rodovia LMG 818, Km 06, CEP 35690-000, Florestal, MG, mairlaangelina@yahoo.com.br; ⁽²⁾ Estudante, *Campus* de Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Rodovia LMG 818, Km 06, CEP 35690-000, Florestal, MG, agronomo.moreno@gmail.com; ⁽³⁾ Estudante, *Campus* de Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Rodovia LMG 818, Km 06, CEP 35690-000, Florestal, MG, jaizaellen@gmail.com; ⁽⁴⁾ Professora, *Campus* de Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Rodovia LMG 818, Km 06, CEP 35690-000, Florestal, MG, lilian.estrela@ufv.br; ⁽⁵⁾ Professor, *Campus* de Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Rodovia LMG 818, Km 06, CEP 35690-000, Florestal, MG, maribus@ufv.br.

RESUMO: O milho é cultivado mundialmente, possuindo um destaque na agricultura brasileira. A sua produção vem proporcionando rentabilidades, pois está sendo empregado na alimentação humana e animal. Um dos aspectos determinantes para a alta produtividade do milho é adubação nitrogenada, porém são necessárias quantidades de adubação de forma constante durante todo o ciclo da cultura. Entretanto, o uso inadequado de fertilizantes nitrogenados vem acarretando diversos impactos ambientais. Atualmente, tem-se buscado alternativas para minimizar o uso de fertilizantes para diminuir os custos da cultura. Essa nova tecnologia procura utilizar bactérias capazes de realizar interações associativas com as plantas proporcionando aquisição de nutrientes. Esse processo é conhecido como fixação biológica do nitrogênio realizado por bactérias diazotróficas. O objetivo desse trabalho foi quantificar bactérias diazotróficas presentes nas raízes do milho, previamente inoculados e cultivados a campo. Foram coletadas raízes de milho em dez tratamentos (controle e nove inóculos) com três repetições na área experimental do Campus UFV-CAF. O isolamento das bactérias diazotróficas associadas a raízes de milho foi realizado por meio da técnica do Número Mais Provável (NMP) usando os diferentes meios de cultura JMV, LGI e JNFb e consultando a tabela McCrady para três repetições por diluição. Os resultados obtidos sofreram transformação logarítmica e posteriormente as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Ao final do cultivo do milho, não foi observada diferença

significativa no NMP de bactérias diazotróficas entre os tratamentos com e sem inoculação.

Termos de indexação: produtividade, adubação nitrogenada, fixação biológica do nitrogênio.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma espécie da família Poaceae cultivada mundialmente. Na agricultura brasileira, é o principal cereal produzido, cuja safra 2015/2016 atingiu 79 milhões de toneladas em aproximadamente 15 milhões de hectares. A produção de milho torna-se essencial no cenário econômico e social, pois é empregado na alimentação humana e animal (Conab, 2016).

A cultura do milho é extremamente exigente em nitrogênio, principalmente no estágio inicial, porém quantidades necessárias da adubação nitrogenada ocorrem de forma constante durante todo o ciclo da cultura (Costa et al., 2012).

Devido aos custos dos fertilizantes, tem-se buscado alternativas para minimizar seu uso de forma que não comprometa a produtividade da cultura. O aprimoramento desse processo procura utilizar os microrganismos presentes no solo e no interior de tecidos vegetais, beneficiando as plantas no crescimento e desenvolvimento (Arruda, 2012).

Com o interesse de aumentar a produtividade da cultura do milho, tem se destacado bactérias que vivem em associação com as plantas. São bactérias que contem o complexo enzimático da nitrogenase,

sendo capazes de quebrar a tripla ligação que une dois átomos de nitrogênio e fazem a redução do N_2 à amônia (NH_3) (Novakowski et al., 2011). Esse método de fixação biológica do nitrogênio (FBN) é realizado por um grupo de bactérias diazotróficas, além da fixação essas bactérias em associação com gramíneas são conhecidas por atuarem diretamente na produção de hormônios como auxinas, giberelinas e citocinas, na solubilização de fosfatos e óxidos de zinco (Baldotto et al., 2010).

O trabalho objetivou quantificar bactérias diazotróficas associadas às raízes de milho, previamente inoculados e cultivados a campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo do milho

O experimento foi conduzido no campo experimental da Universidade Federal de Viçosa – *Campus Florestal* (UFV-CAF), situado nas coordenadas geográficas $19^{\circ}87'43.08''S$ e $44^{\circ}41'76.32''W$. Os dados climáticos durante o ciclo da cultura foram calculados a partir de uma série de 30 anos de dados observados em Florestal, a precipitação média anual equivale a 1426,8 mm, a temperatura mínima média a $13,1^{\circ}C$ e a temperatura máxima média a $28^{\circ}C$ (INMET, 2016). O solo foi classificado Latossolo vermelho amarelo.

O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados com dez tratamentos (controle e nove estirpes bacterianas pertencentes à coleção de bactérias diazotróficas da UFV-CAF) e três repetições. Os tratamentos foram: T1 (controle, sem inoculação), T2 (inóculo UFV1214/ isolado no meio de cultivo JMV), T3 (UFV1154/meio LGI), T4 (UFV1141/meio JNFb), T5 (UFV2212/meio JMV), T6 (UFV3143/meio JNFb), T7 (UFVL-162/meio JMV), T8 (UFVL-163/meio JMV), T9 (UFVL-164/meio JMV), T10 (UFVLSOF7/meio JMV). A inoculação foi realizada por meio da imersão das sementes de milho híbrido 2B655HX no meio bacteriano por 2 horas (10^8 células/mL) e em seguida foi realizado o plantio em 11/12/2015.

Cada unidade experimental foi constituída por 12 linhas de 5 metros, espaçadas entre si por 0,50 m. Para eliminar o efeito bordadura, foram consideradas como área útil as fileiras centrais, desprezando-se duas fileiras de cada lado e 0,50 cm das extremidades.

Contagem de bactérias diazotróficas

O isolamento de bactérias diazotróficas foi realizado conforme descrito por (Döbereiner et al., 1995). As coletas foram realizadas no final do ciclo da cultura do milho, nos dias 26 de abril a 06 de maio de 2016. Foram coletadas raízes junto com solo rizosférico na área central de cada unidade experimental e transportados em sacos plásticos esterilizados para o Setor de Floricultura, onde foram realizados os trabalhos microbiológicos. As amostras de cada tratamento foram pesadas em 10 gramas e depois trituradas no liquidificador com 90 mL de solução salina ($NaCl$, $8,5 g L^{-1}$). As alíquotas de 0,1 mL das diferentes diluições foram transferidas, em triplicata para frascos de vidro contendo 5 ml de meios semi-sólidos, para os seguintes meios JMV, LGI e JNFb. Após essas diluições, os frascos de vidro foram incubados em estufa durante 7 dias em temperatura $30^{\circ}C$. Foi considerado positivo os meios com formação de uma película aerotóxica típica na superfície do meio. A contagem das bactérias diazotróficas nos meios semi-sólidos foi realizada por meio da técnica do número mais provável (NMP) (Döbereiner et al., 1995), utilizando à Tabela de McCrady para três repetições por diluição.

Análise estatística

Os resultados obtidos na tabela McCrady foram submetidos à transformação logarítmica, em seguida, foram calculadas as médias e o erro padrão da média para cada tratamento. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na contagem do número mais provável (NMP), foi possível verificar que bactérias diazotróficas permaneceram ao longo de todo cultivo da cultura (Figura 1), corroborando com trabalhos que inoculam bactérias diazotróficas no cultivo de milho (Novakowski et al., 2001; Costa et al., 2012).

Verificou-se também que as bactérias diazotróficas habitam naturalmente as raízes do milho, uma vez que o NMP do controle, com o uso dos meios semi-sólidos JMV, LGI e JNFb, não diferiu dos demais tratamentos inoculados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Segundo Döbereiner et al. (1995) e Baldani et al. (1996), os meios de cultura semi-sólidos JMV, LGI e JNFb permitiram o isolamento das bactérias dos gêneros *Herbaspirillum* spp, *Acetobacter* spp, *Burkholderia* spp., respectivamente.

CONCLUSÕES

As bactérias diazotróficas habitam naturalmente as raízes de milho.

O NMP de bactérias diazotróficas não diferiu entre os tratamentos.

REFERÊNCIAS

ARRUDA, L. M. **Seleção e Caracterização de Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Milho Cultivas no Rio Grande do Sul.** Tese de Mestrado, Porto Alegre, 2012.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. **Meios de cultura específicos para o isolamento de bactérias endofíticas que fixam o N₂ atmosférico.** Comunicado Técnico, Embrapa Agrobiologia, n.12, 1996. 4p.

BALDOTTO, L. E.B.; BALDOTTO, M.A.; OLIVARES, F. L.; PIO VIANA, A.; BRESSAN-SMITH, R. **Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) cultivar vitória durante aclimatização.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 34, p. 349-360, 2010.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos.** 8º ed. Brasília: Conab, 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/boletim_graos_maior_pdf2016>. Acesso em 26 de maio de 2016.

COSTA, N. R.; ANDREOTTI, M.; GAMEIRO, R. A.; PARIZ, C. M.; BUZETTI, S.; LOPES, K S. M. **Adubação nitrogenada no consórcio de milho com duas espécies de braquiária em sistema plantio direto.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília-DF, v.47, n. 9, p. 1038-1047, 2012.

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

INMET, INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/>> Acesso em 30 de maio de 2016.

NOVAKOWISKI, H.; SANDINI, E.; FALBO, K.; DE MORAIS, A.; NOVAKOWISKI, J.; CHENG, C. **Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho.** Ciências Agrárias, v.32, p.1687-1698, 2001.

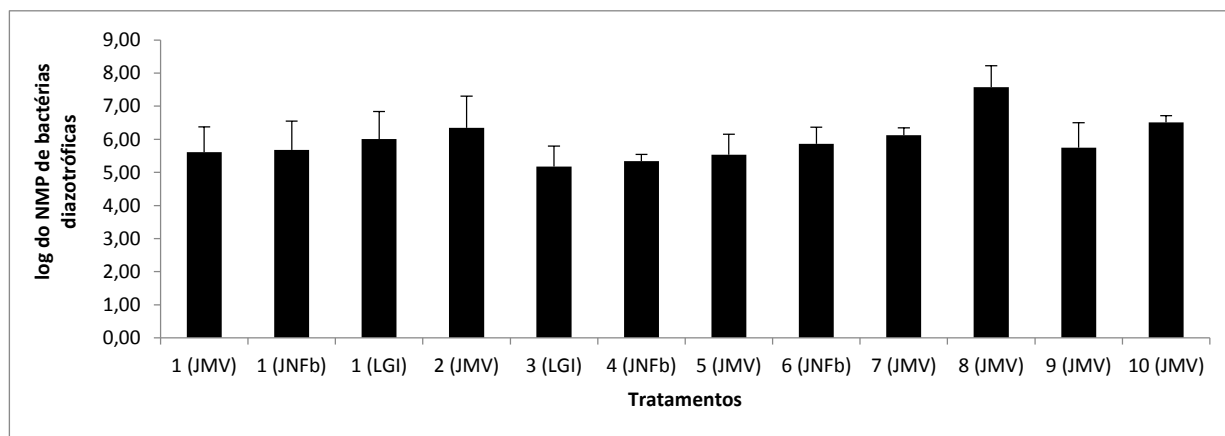


Figura 1 – Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas associadas às raízes de milho nos diferentes meios de cultivo (log do número de células g⁻¹ de raízes). T1 (controle), T2 (UFV1214), T3 (UFV1154), T4 (UFV1141), T5 (UFV2212), T6 (UFV3143), T7 (UFVL-162), T8 (UFVL-163), T9 (UFVL-164), T10 (UFVLSOF7). Não houve diferença entre as médias dos tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.