

## INTERAÇÃO ENTRE BACTÉRIAS *Azospirillum brasilense* E *Herbaspirillum seropedicae* COM ADUBAÇÃO NITROGENADA, VISANDO O FORNECIMENTO DE NITROGÊNIO PARA O MILHO

Luiz Claudio Offemann<sup>1\*</sup>; Vandeir Francisco Guimaraes<sup>2</sup>; Ricardo Felipe Braga De Souza<sup>3</sup>; Adriano Mitio Inagaki<sup>4</sup>; Andre Gustavo Battistus<sup>3</sup>; Leandro Rampim<sup>4</sup>

SAP 7-PV      Data envio: 15/08/2014      Data do aceite: 02/10/2014  
Scientia Agraria Paranaensis – SAP; ISSN: 1983-1471  
Marechal Cândido Rondon, v. 14, n. suplemento, dez, p. 276-280, 2015

**RESUMO** - Objetivou-se investigar a interação entre as bactérias *A. brasilense* e *H. seropedicae* associadas à adubação nitrogenada, visando o fornecimento de nitrogênio para o milho. O delineamento experimental adotado foi de blocos ao acaso, em esquema fatorial 4 x 3, com quatro repetições. O primeiro fator foi formado pelos tratamentos: sem inoculação, inoculação com *H. seropedicae* e *A. brasilense* de forma isolada e associação das duas estirpes. O segundo fator referiu-se às doses de nitrogênio de 0, 60 e 120 kg ha<sup>-1</sup> de N. Cada parcela experimental foi constituída de seis linhas de 3,5 metros, onde foi realizada a avaliação dos componentes de produção: número de fileiras de grãos e número de grãos por fileira, massa de mil grãos, massa média de grãos por espiga e produtividade. A inoculação isolada com as bactérias dos gêneros *A. brasilense* (AbV5) e *H. seropedicae* (SmR1) resultou em ganhos em especial para massa de mil grãos, onde pode-se observar que para doses inferiores à dose máxima de nitrogênio, houve o mesmo rendimento. Não houve ganho em relação à produtividade com a utilização de inoculação das sementes de milho com rizobactérias dos gêneros *A. brasilense* (AbV5) e *H. seropedicae* (SmR1) em relação à adubação nitrogenada.

Palavras-chave: bactérias diazotróficas, *Zea mays* L., nitrogênio.

### *Interaction between bacteria *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* with nitrogen fertilization, aiming to supply nitrogen for corn*

**ABSTRACT** - This study aimed to investigate the interaction between the bacteria *A. brasilense* and *H. seropedicae* associated with nitrogen fertilization, aiming to supply nitrogen for corn crop. The experimental design was randomized blocks, in 4 x 3 factorial design with four replications. The first factor was formed by the treatments: no inoculation, inoculation *H. seropedicae* and *A. brasilense* in isolation and combination of the two strains. The second factor referred to nitrogen levels, 0, 60 and 120 kg ha<sup>-1</sup> of N. Each experimental plot consisted of six corn lines of 3.5 meters, where the evaluation of yield components was performed: number of rows grain and number of kernels per row, thousand grain mass, average mass of grains per spike and productivity. Isolated inoculation with the bacteria *A. brasilense* (AbV5) and *H. seropedicae* (SMR1) resulted in gains especially for thousand grain weight, which can be observed that for less than the maximum dose of nitrogen doses, remained the same yield. There were no gains in productivity with respect to the use of corn seed inoculation with rhizobacteria of the genus *A. brasilense* (AbV5) and *H. seropedicae* (SMR1) in relation to nitrogen fertilization.

**Key words:** diazotrophic bacteria, *Zea mays* L., nitrogen.

<sup>1</sup>Mestrando em Agronomia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Rua Pernambuco 1777, CEP 85960-000, Marechal Cândido Rondon, PR, Brasil. E-mail: [l.offemann@hotmail.com](mailto:l.offemann@hotmail.com). \*Autor para correspondência

<sup>2</sup>Bolsista Produtividade CNPq, Centro de Ciências Agrárias, UNIOESTE, Marechal Cândido Rondon, PR

<sup>3</sup>Mestrando em Agronomia pela UNIOESTE, Marechal Cândido Rondon, PR

<sup>4</sup>Pesquisador Científico CAPES/PNPD pela UNIOESTE, Marechal Cândido Rondon, PR

## INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) devido ao seu valor nutricional tornou-se um dos principais grãos produzidos e consumidos do mundo; dentre os cereais o terceiro mais importante (CONAB, 2013).

Uma das principais tecnologias empregadas recentemente no cultivo de milho, as bactérias diazotróficas, são microrganismos que possuem um complexo enzimático da nitrogenase, que são capazes de reduzir o  $N_2$  atmosférico em  $NH_3$ . (REIS et al., 2006; CANTARELLA, 2007).

Cerca de 25% dos gastos energéticos das plantas estão relacionados com o N, em reações que englobam desde a redução de  $NO_3^-$  a  $NH_4^+$  e a subsequente incorporação do N às formas orgânicas nas plantas (EPSTEIN; BLOOM, 2006; CANTARELLA, 2007).

As principais formas de absorção de nitrogênio pelas raízes das plantas são nas formas de amônio ( $NH_4^+$ ) e nitrato ( $NO_3^-$ ) que em seguida são reduzidos formando aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hormônios, clorofilas, entre outros. Esse processo de redução pode ocorrer tanto nas raízes como nas folhas, dependendo da espécie vegetal, sendo que o mais comum é que em plantas de ciclo C4 ocorra nas raízes, e em espécies do ciclo C3 ocorra nas folhas. Essa reação ocorre sob condições de temperatura e pressão atmosférica ambiente em virtude do complexo nitrogenase, que é formado por duas subunidades: um heterotetrâmero, a dinitrogenase  $\alpha_2\beta_2$ , e um homodímero, a dinitrogenase redutase  $\gamma_2$ , em que a região  $\alpha$  possui um sítio ativo para redução de  $N_2$ , chamado de FeMo-co-fator (EPSTEIN; BLOOM, 2006; REIS et al., 2006).

Dobbelaere et al. (2003) relatam que algumas das bactérias diazotróficas não realizam apenas a fixação biológica do nitrogênio (FBN), mas também em alguns casos podem atuar como promotores do crescimento vegetal pela solubilização de fosfatos entre outros minerais do solo, e modificando as concentrações de hormônios vegetais, tais como auxinas, giberelinas, citocininas e etileno.

Grande parte dos estudos que envolvem a associação de bactérias diazotróficas em não leguminosas, destacam como os principais gêneros de bactérias envolvidos nessa associação, se destacando o *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia* (BALDANI et al., 1986).

O objetivo do trabalho foi investigar a interação entre as bactérias *Azospirillum Brasilense* AbV5 e *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 associada à adubação nitrogenada, visando o fornecimento de nitrogênio para o milho.

## MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio em condições de campo foi conduzido na fazenda experimental “Professor Antônio Carlos dos Santos Pessoa” (latitude 24° 33’ 22’’ S e longitude 54° 03’ 24’’ W, com altitude aproximada de 400 m), pertencente à Universidade Estadual do Oeste Paraná - Campus Marechal Cândido Rondon, cujo solo foi classificado como Latossolo Vermelho Eutroférico de textura argilosa.

O solo utilizado foi classificado como Latossolo Vermelho Eutroférico (LVef) (EMBRAPA, 2013), com as seguintes características químicas pH em  $CaCl_2$ : 5,30; MO: 34,18 g  $dm^{-3}$ ; P: 18,34 mg  $dm^{-3}$ ; 0,20; 2,92; 1,52; 7,19; 0,27; 4,64 e 11,84 de K, Ca, Mg, H+Al,  $Al^{+3}$ , SB, CTC, respectivamente e V: 45,50%.

O experimento foi implantado no dia 18 de setembro de 2011, com a cultura de milho híbrido DKB 390, com 4,2 sementes por metro. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso em esquema fatorial 4 x 3, com quatro blocos. O primeiro fator foi formado pelo tratamento controle (sem inoculação de sementes), inoculação das sementes com as estirpes das bactérias *A. brasilense* AbV5 e *H. seropedicae* SmR1, respectivamente, de forma isolada e associação das duas estirpes. O segundo fator referiu-se às doses de nitrogênio (N), com 0, 50 e 100% da dose recomendada para a cultura de 120 kg  $ha^{-1}$  de N, correspondendo a 0, 60 e 120 kg  $ha^{-1}$  de N.

As estirpes utilizadas foram *A. brasilense* AbV5 e *H. seropedicae* SmR1 em forma de meio de cultura líquido, fornecidas pelo Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

A inoculação das sementes com as bactérias, ocorreu imediatamente após a chegada do material, na concentração de 108 UFC  $ml^{-1}$ , utilizando 4 mL do inoculante para 1000 sementes. As sementes foram completamente homogeneizadas, a fim de garantir uma distribuição homogênea do inoculante, momentos antes da semeadura, num ambiente com temperatura e iluminação controlada (HUNGRIA, 2011).

Cada parcela experimental foi constituída de seis linhas espaçadas por 0,7 m entre elas, com 3,5 m de comprimento e área total de 17,5  $m^2$ . Para obtenção da área útil das parcelas foram desconsideradas as linhas laterais externas e 1,0 m das extremidades das linhas de cada parcela, tendo 4,20  $m^2$  de área útil.

A adubação com fósforo (P) e potássio (K) foi realizada na semeadura, na dose de 50 kg  $ha^{-1}$  de  $K_2O$  e 40 kg  $ha^{-1}$  de  $P_2O_5$ , sendo realizada simultaneamente à semeadura mecanizada. A adubação nitrogenada foi baseada nos tratamentos, com aplicação no sulco de semeadura 30 kg  $ha^{-1}$ , e o restante da dose, em cobertura, entre os estádios V4 e V6, exceto para o tratamento sem nitrogênio. Aos 10 dias após a emergência das plântulas (estádio V1), foram realizados o desbaste e a capina manual das plantas daninhas.

No final do ciclo da cultura foram determinados os seguintes componentes da produção: número de fileiras por espiga, números de grãos por fileira, massa de mil grãos (em g) e produtividade. Para tais avaliações foram colhidas 10 espigas aleatoriamente na área útil.

A produtividade foi obtida através da produção da área útil de cada parcela, expressa em kg  $ha^{-1}$ , após a correção da umidade dos grãos para 13% (base úmida).

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro (FERREIRA, 2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, são apresentados os valores referentes ao número (nº) de fileiras por espiga e nº de grãos por fileira, em relação às doses de nitrogênio e tratamentos com inoculação das sementes, onde pode ser observado que em ambas as variáveis, não houve diferença significativa tanto em função de doses de nitrogênio, quanto para a inoculação com as estirpes de AbV5 (*Azospirillum brasilense*) e SmR1 (*Herbaspirillum seropedicae*).

Em trabalho desenvolvido por Novakowski et al. (2011), avaliando o efeito residual da adubação nitrogenada e utilização de *A. brasilense* AbV5 na cultura do milho em Guarapuava, PR, foi verificado que *A. brasilense* AbV5 foi semelhante a maior dose de N para o

número de fileiras por espiga, contudo para o número de grãos por fileira, o *A. brasilense* AbV5 não substituiu a adubação com nitrogênio na semeadura; tendo identificado efeito quadrático tanto para número de fileiras por espiga, quanto para número de grãos por fileira com o efeito residual do cultivo anterior.

Quanto aos resultados referentes à massa de mil grãos apresentados na Tabela 2, foi possível observar que as doses de N e os tratamentos com inoculação das sementes na ausência de aplicação de N apresentou efeito significativo para a inoculação das sementes com as estirpes AbV5 e SmR1, sendo superiores à testemunha sem inoculação e associação entre as estirpes.

**TABELA 1.** Médias para nº de fileiras por espiga e nº de grãos por espiga de plantas de milho híbrido DKB 390, em função de doses de nitrogênio e inoculação com as estirpes de *A. brasilense* AbV5 e *H. seropedicae* SmR1. Uniãoeste, Marechal Cândido Rondon, PR, 2011.

Inoculação	Nº fileiras por espiga				Nº Grãos por fileira			
	0	60	120	Média	0	60	120	Média
	-----kg ha <sup>-1</sup> N-----				-----kg ha <sup>-1</sup> N-----			
Controle	17,65	17,45	17,58	17,56a	35,45	35,50	37,59	36,84a
AbV5	17,50	17,60	17,80	17,63a	36,48	37,45	36,50	36,81a
SmR1	18,00	17,04	17,70	17,58a	37,15	37,84	37,23	37,40a
AbV5+SmR1	17,35	17,15	17,45	17,32a	34,00	36,15	36,43	35,52a
Média	17,62A	17,31A	17,63A	-----	35,77A	37,23A	36,93A	-----
CV (%)	3,36				4,82			

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p < 0,05).

**TABELA 2.** Médias para massa de mil grãos de milho híbrido DKB 390, em função de doses de nitrogênio e inoculação com as estirpes de *A. brasilense* AbV5 e *H. seropedicae* SmR1. Uniãoeste, Marechal Cândido Rondon, PR, 2011.

Inoculação	Massa de 1000 grãos (g)		
	0	60	120
	-----kg ha <sup>-1</sup> N-----		
Controle	383,2bB	370,9cB	399,2aA
AbV5	397,8aA	409,2aA	379,9bB
SmR1	384,4abB	399,5abA	389,1abAB
AbV5+SmR1	383,2bA	387,3bA	388,2abA
CV (%)	2,72		

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05).

Na dose de 60 kg ha<sup>-1</sup> de N, pode ser observado efeito da inoculação das sementes com as estirpes *A. brasilense* AbV5 e *H. seropedicae* SmR1, sendo superiores ao tratamento sem inoculação e a associação entre as estirpes AbV5 + SmR1; sobretudo, a associação entre as estirpes AbV5 + SmR1 foi superior ao tratamento sem inoculação. Na dose máxima de N (120 kg ha<sup>-1</sup>), pode-se observar que no tratamento sem inoculação, a inoculação individual da estirpe SmR1 e a inoculação associativa entre as estirpes AbV5 + SmR1 se destacaram em relação a estirpe AbV5 isolada.

Ainda comparando as doses dentro da inoculação para a massa de mil grãos, pode ser observado que na

ausência de inoculação, a maior média foi obtida com 120 Kg ha<sup>-1</sup>. Ao observar a inoculação de *A. brasilense* AbV5, as doses de 0 e 60 kg ha<sup>-1</sup> de N apresentaram médias mais elevadas. No entanto, para o tratamento com a inoculação de SmR1, as doses de 60 e 120 kg ha<sup>-1</sup> apresentaram as maiores médias, no entanto na associação entre as estirpes AbV5 + SmR1, não houve diferença nas doses de N.

Em relação à massa de grãos de uma espiga (Tabela 3), não houve interação entre doses de nitrogênio e inoculação. Foi possível verificar que na ausência de inoculação, uso de AbV5 e SmR1 apresentaram valores semelhantes, porém a associação entre *A. brasilense* e *H. seropedicae* foi inferior a testemunha sem inoculação.

**TABELA 3.** Massa de grãos de uma espiga (MGE) de plantas de milho e produtividade, híbrido DKB 390, em função de doses de nitrogênio e inoculação com as estirpes de AbV5 (*A. brasilense*) e SmR1 (*H. seropedicae*). Uniãoeste, Marechal Cândido Rondon, PR, 2011.

Inoculação	(MGE) (g)			Média	Produtividade (t ha <sup>-1</sup> )			Média
	0	60	120		0	60	120	
	-----kg ha <sup>-1</sup> N-----				-----kg ha <sup>-1</sup> N-----			
Controle	182,36	216,16	229,02	209,18a	6,66	8,05	8,20	7,63a
AbV5	154,98	208,88	218,13	194,00ab	5,73	7,11	8,41	7,08a
SmR1	186,09	193,88	202,99	194,32ab	5,57	6,50	8,02	6,69a
AbV5+SmR1	129,54	161,12	207,21	165,96b	5,56	6,14	8,33	6,68a
Média	163,24B	195,01A	214,34A	-----	5,88C	6,94B	8,24A	-----
CV (%)	18,09				13,93			

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Em relação aos dados de produtividade (Tabela 3), pode ser observado que não houve diferença significativa entre os tratamentos com as estirpes, independente da dose de nitrogênio. No entanto, Hungria et al. (2010) obtiveram incrementos na produtividade de milho, e dependendo da estirpe de *A. brasilense* avaliada, o aumento na produtividade foi de 24 a 30%, correspondendo a 662 a 823 kg ha<sup>-1</sup> de grãos. Cavallet et al. (2000) também obtiveram resultados positivos, constatando aumento de 17% na produtividade de grãos de milho ao utilizar bactérias diazotróficas. De fato, no presente trabalho, para massa de 1000 grãos, a inoculação isolada de *A. brasilense*, nas doses de 0 e 60 kg ha<sup>-1</sup> de N, apresentou valores superiores à dose de 120 kg ha<sup>-1</sup>, dando evidências que a fixação biológica pode ocorrer e que pode substituir parcialmente a adubação nitrogenada para a cultura do milho.

Para a adubação nitrogenada com a dose de 120 kg ha<sup>-1</sup> de N foi superior a 60 kg ha<sup>-1</sup>, a qual superou a ausência de fornecimento de nitrogênio pela adubação à cultura de milho. Os efeitos pela adubação nitrogenada sobre os componentes da produção de milho já foram

descritos por outros autores tais como Amaral Filho et al. (2005) e Sangoi et al. (2005), tendo em vista que é o nutriente requeridos em maior quantidade pela cultura, sendo componente de moléculas de proteínas, enzimas, coenzimas, ácidos nucleicos e citocromos.

## CONCLUSÕES

Os tratamentos com inoculação isolada com as bactérias dos gêneros *A. brasilense* (AbV5) e *H. seropedicae* (SmR1), resultaram em ganhos em especial para massa de mil grãos, onde pode se observar que para doses inferiores à dose máxima de nitrogênio, mantiveram o mesmo rendimento.

Não houve ganhos em relação à produtividade com a utilização de inoculação das sementes de milho com rizobactérias dos gêneros *A. brasilense* AbV5 e *H. seropedicae* SmR1 em relação à adubação nitrogenada.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná, afiliada à Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior – SETI, à CAPES/PNPD e ao CNPq/INCT-FBN, pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL-FILHO, J.P.R.; FORNASIERI-FILHO, D.; FARINELLI, R.; BARBOSA, J.C. Espaçamento, densidade populacional e adubação nitrogenada na cultura do milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v.29, n.3, p.467-473, 2005.
- BALDANI, V.L.D.; ALVAREZ, M.A.B.; BALDANI, J.I. e DÖBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and roots of field grown wheat and sorghum. **Plant Soil**, v.90 n.1 p.35-46, 1986.
- CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; BARROS N. F; FONTES, R. L.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p.375-470.
- CAVALLET, L. H.; PESSOA, A. C. dos S.; HELMICH, J. J.; HELMICH, P. R.; OST, C. F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 4, n. 1, p. 129-132, 2000.
- CONAB, **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em 20 de maio de 2012.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **CRC Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v.22, n.2, p.107-149, 2003.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. 2. ed. Tradução de Maria Edna Tenório Nunes. Londrina: Ed Planta, 2006. 403 p. Título original: Mineral nutrition of plants.
- FERREIRA D. F. (2011). **SISVAR: A computer statistical analysis system**. *Ciência e Agrotecnologia*, 35: 1039–1042.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3.ed. Brasília, Embrapa, 2013. 353 p
- HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. In: **Documentos - EMBRAPA Soja**, Londrina, 36p. 2011.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.S.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, Netherlands, v.331, n.1, p.413-425, 2010.
- NOVAKOWISKI, J.H.; SANDINI, I.E.; FALBO, M.K.; MORAES, A. de; NOWAKOWISKI, J.H.; CHENG, N.C. Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, suplemento 1, p.1687-1698, 2011.
- REIS, V.M.; O, A.L.M.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I. Fixação Biológica de Nitrogênio Simbiótica e Associativa. In: **FERNANDES, M.S.** (Ed) **Nutrição Mineral de Plantas. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa-MG, p. 153-174, 2006.
- SANGOI, L.; ERNANI, P.R.; SILVA, P.R.F. da. Maize response to nitrogen fertilization timing in two tillage systems in a soil with high organic matter. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa-MG, v.31, n.3, p.245-251, 2007.