

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE AGRONOMIA**

**DANYLLO FERREIRA DOS REIS**

**EFEITO RESIDUAL DA INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense* E DA  
ADUBAÇÃO NITROGENADA NA CULTURA DO MILHO EM CASA DE  
VEGETAÇÃO**

**Uberlândia – MG  
Setembro – 2013**

**DANYLLO FERREIRA DOS REIS**

**EFEITO RESIDUAL DA INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense* E DA  
ADUBAÇÃO NITROGENADA NA CULTURA DO MILHO EM CASA DE  
VEGETAÇÃO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado  
ao curso de Agronomia, da Universidade  
Federal de Uberlândia, para obtenção do  
grau de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Césio Humberto de Brito

**Uberlândia – MG  
Setembro – 2013**

**DANYLLO FERREIRA DOS REIS**

**EFEITO RESIDUAL DA INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense* E DA  
ADUBAÇÃO NITROGENADA NA CULTURA DO MILHO EM CASA DE  
VEGETAÇÃO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado  
ao curso de Agronomia, da Universidade  
Federal de Uberlândia, para obtenção do  
grau de Engenheiro Agrônomo.

Aprovado pela Banca Examinadora em 13/09/2013.

Eng. Agr. Wender Santos Rezende

Membro da Banca

Msc. Tâmara Prado de Moraes

Membro da Banca

---

Prof. Dr. Césio Humberto de Brito  
Orientador

## RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o desenvolvimento inicial de plantas de milho e a atividade das enzimas urease e fosfatase, no solo cultivado com esta cultura, em resposta ao efeito residual da inoculação com *Azospirillum brasilense* e da aplicação de doses de nitrogênio. O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) – MG, nos meses de maio e junho de 2011. O delineamento estatístico adotado foi o de blocos ao acaso com os tratamentos distribuídos em esquema fatorial 3 x 3, com cinco repetições e parcelas formadas por dois vasos com uma planta de milho cada. O primeiro fator correspondeu ao residual de doses de nitrogênio (0, 100 e 200 kg ha<sup>-1</sup>) aplicadas em ensaio anterior, e o segundo, à dose do inoculante líquido à base de *Azospirillum* (0, 100 e 200 mL ha<sup>-1</sup>) utilizado na inoculação via sementes do híbrido anteriormente. Para avaliação do desenvolvimento das plantas de milho foram analisadas, 40 dias após a semeadura, as seguintes características: altura da planta (cm), diâmetro de caule (mm), volume de raiz (mL) e massas de matéria fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular (g). Também foram avaliados teores de fósforo (g kg<sup>-1</sup>), nitrogênio (g kg<sup>-1</sup>), e clorofila nas plantas (ICF) e atividade das enzimas urease (μg NH<sub>4</sub><sup>+</sup> g<sup>-1</sup> solo seco h<sup>-1</sup>) e fosfatase (μg PNP g<sup>-1</sup> solo seco h<sup>-1</sup>) no solo. A utilização de *Azospirillum brasilense* em cultivo anterior não influencia o desenvolvimento vegetativo de plantas de milho na semeadura subsequente, tampouco a atividade das enzimas urease e fosfatase. Por sua vez, o residual da aplicação de fertilizante nitrogenado afeta o desenvolvimento vegetativo das plantas, os teores de clorofila e de nitrogênio.

**Palavras-chave:** *Zea mays* L., bactéria diazotrófica, doses de nitrogênio, atividade enzimática.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the initial development of maize plants and the activity of urease and phosphatase enzymes, in soil previously cultivated with this crop, in response to the residual effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* and the application of nitrogen. The trial was conducted at the Federal University of Uberlândia's greenhouse in May and June, 2011. A randomized block design was set up in a 3 x 3 factorial arrangement, with five replicates in experimental plots consisting of two pots with one maize plant each. The first factor corresponded to residual nitrogen rates (0, 100 and 200 kg ha<sup>-1</sup>) applied in a previous trial, and the second factor, to the *Azospirillum* inoculant (0, 100 and 200 mL ha<sup>-1</sup>) used earlier in seeds inoculation. Plant height (cm), stem diameter (mm), root volume (mL) and fresh and dry weights of the aerial part and the root system (g) were analyzed 40 days after sowing. It was also evaluated levels of phosphorus (g kg<sup>-1</sup>), nitrogen (g kg<sup>-1</sup>), and chlorophyll in plants (ICF) and the enzymes urease (μg NH<sub>4</sub><sup>+</sup> g<sup>-1</sup> dry soil h<sup>-1</sup>) and phosphatase (μg PNP g<sup>-1</sup> dry soil h<sup>-1</sup>) in the soil. The use of *Azospirillum brasilense* in a previous crop does not influence the vegetative growth of maize plants, neither the activity of the enzymes urease and phosphatase. The residual nitrogen fertilizer application affects the plant development, besides the content of chlorophyll and nitrogen in the plant.

**Key words:** *Zea mays* L., diazotrophs, nitrogen rates, enzymatic activity.

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

- Tabela 1** – Propriedades químicas e físicas do solo analisadas anteriormente ao primeiro ensaio – Uberlândia-MG, 2011.....16
- Tabela 2** – Medidas de altura, diâmetro de colmo, acúmulo de massas de matéria fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular e volume de raízes de plantas de milho, aos 40 dias após a semeadura (DAS), em função do residual de doses de nitrogênio. Uberlândia – MG, 2011. .... 20
- Tabela 3** – Atividades das enzimas urease ( $\mu\text{g NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ solo seco h}^{-1}$ ) e fosfatase ( $\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo seco h}^{-1}$ ) em solo cultivado com milho, aos 40 dias após a semeadura (DAS), em função do residual de nitrogênio e de *Azospirillum*..... 21
- Tabela 4** – Teores de clorofila, nitrogênio e fósforo de plantas de milho, aos 40 dias após a semeadura (DAS), em função do residual de doses de nitrogênio. Uberlândia – MG, 2011.. 22
- Figura 1** – Temperaturas máximas e mínimas durante o período de 2 de abril a 12 de maio na casa de vegetação do instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia – MG, 2011.....17

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	9
2.1 Adubação nitrogenada na cultura do milho.....	9
2.2 O gênero <i>Azospirillum</i> .....	10
2.3 <i>Azospirillum</i> em associação com milho e outras gramíneas .....	12
2.4 Nitrogênio residual .....	13
2.5 Sobrevivência e efeito residual de <i>Azospirillum</i> .....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	16
3.1 Delineamento experimental.....	16
3.2 Condução do ensaio.....	16
3.3 Avaliações .....	18
3.3.1 Altura (cm), diâmetro de caule (mm), volume de raiz (mL) e massas de matéria fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular (g) das plantas de milho.....	18
3.3.2 Atividades das enzimas urease e fosfatase.....	19
3.3.3 Teores de clorofila, nitrogênio e fósforo.....	19
3.4 Análise estatística .....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
4.1 Desenvolvimento vegetativo das plantas de milho .....	20
4.2 Atividade das enzimas urease e fosfatase.....	21
4.3 Teores de clorofila, nitrogênio e fósforo .....	22
5 CONCLUSÕES .....	24
REFERÊNCIAS .....	25
ANEXOS.....	28

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre os nutrientes essenciais para o desenvolvimento das plantas, o nitrogênio (N) deve ser destacado, em virtude do seu preço elevado e seu requerimento em maiores quantidades pela maioria das culturas, sobretudo o milho (CRUZ et al., 2005). Uma vez que a maioria dos solos das regiões tropicais apresenta deficiência de N, adubações nitrogenadas se fazem necessárias para suprir a demanda pela cultura garantindo ótimas produções (SOUZA, 2006). No entanto, de maneira geral, as espécies cultivadas são capazes de aproveitar somente cerca de 50% do fertilizante nitrogenado aplicado, enquanto o restante é perdido no sistema solo-planta por lixiviação, volatilização e desnitrificação (SAIKIA; JAIN, 2007).

Estudos têm demonstrado que existem interações entre o N e bactérias diazotróficas na assimilação e utilização desse nutriente (REIS JÚNIOR et al., 2008). Neste sentido, seu uso associado à cultura do milho representa um grande potencial para reduzir a dependência de fertilizantes nitrogenados sintéticos e, conseqüentemente, a poluição ambiental e os custos de produção da lavoura.

Dentre os micro-organismos fixadores de nitrogênio encontrados em associações com o milho, destacam-se as espécies do gênero *Azospirillum*. Estas bactérias apresentam ampla distribuição nos solos tropicais e subtropicais. Porém, pouco se sabe sobre sua sobrevivência nesses solos na ausência da planta hospedeira.

Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o desenvolvimento inicial de plantas de milho e a atividade das enzimas urease e fosfatase, no solo previamente cultivado com esta cultura, em resposta ao efeito residual da inoculação com *Azospirillum brasilense* e da aplicação de doses de nitrogênio.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Adubação nitrogenada na cultura do milho

O nitrogênio é um macronutriente de conhecida importância quanto às suas funções no metabolismo das plantas, sendo constituinte de proteínas, coenzimas, ácidos nucleicos, citocromos, clorofila etc. (MIFLIN et al., 1976; HARPER, 1994). Em decorrência disto, seu balanço tem influência direta na formação de raízes, fotossíntese, taxa de crescimento entre folhas e raízes e a produção e transporte de fotoassimilados, sendo o crescimento foliar primordialmente afetado (RYLE et al., 1979; TAIZ ; ZEIGER, 2004).

As formas de nitrogênio prontamente assimiláveis pelas plantas são o nitrato e o amônio. A entrada de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) através da plasmalema das células da epiderme e do córtex da raiz ocorre por meio de alguns transportadores específicos para essas formas de nitrogênio (LARSSON; INGEMARSSON, 1989).

O nitrogênio é um dos nutrientes que proporcionam os resultados mais incríveis no aumento da produção de grãos na cultura do milho, pois é de suma importância no metabolismo celular (BÜLL, 1993). Cerca de 20 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio são necessário para cada tonelada de grãos produzida (FANCELLI, 2000). Todavia, ocorre deficiência desse nutriente na maioria dos solos tropicais, o que torna necessária a adubação nitrogenada visando suprir a demanda pela cultura, permitindo ótimas produções (SOUZA, 2006). Vale salientar que a adubação nitrogenada, de maneira geral, tem apresentado baixo rendimento, caracterizando um grande problema ambiental e econômico para os produtores.

Sabe-se que cerca de 50% de todo fertilizante nitrogenado aplicado é perdido no sistema solo-planta. Ocorrem perdas por volatilização de amônia, desnitrificação, escoamento superficial, lixiviação e imobilização microbiana (SAIKIA; JAIN, 2007).

Por sua vez, a maximização no uso do adubo nitrogenado pode ser feita através de algumas práticas de manejo, como localização do fertilizante nas áreas mais ativas do sistema radicular e sua aplicação no estágio fenológico da cultura de maior demanda pelo nutriente, aliado a condições adequadas de regime hídrico (OLSON; KURTZ, 1982).

Segundo Pöttker e Wiethölter (2004), citado por Sousa et al. (2011), a época de aplicação de nitrogênio na cultura do milho pode variar, mas, de maneira geral, é comumente feita parcelando-se o nitrogênio na semeadura e o restante em cobertura, quando as plantas estão com quatro a oito folhas (V<sub>4</sub> a V<sub>8</sub>). É recomendado o emprego de 30 kg de N ha<sup>-1</sup> no

momento da semeadura e o restante em cobertura (CANTARELLA; DUARTE, 1995; SÁ et al., 1995).

Alguns estudos apontam que a máxima absorção de nitrogênio pela cultura do milho acontece no período entre 40 e 60 dias após a germinação, embora este nutriente seja absorvido durante todo o ciclo (FRANÇA et al., 1994). O potencial produtivo da planta de milho é definido entre os estádios vegetativos V<sub>4</sub> e V<sub>6</sub> (quatro a seis folhas completamente desenvolvidas), necessitando nessa época de um aporte adequado de N, pois a deficiência desse nutriente neste período reduz o número de óvulos nos primórdios da espiga, causando grandes perdas de produtividade (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000).

Existem muitas fontes diferentes de nitrogênio de uso agrícola e, dentre os adubos nitrogenados mais utilizados, estão a ureia e o sulfato de amônio. Embora a ureia seja uma alternativa economicamente viável para os produtores rurais, suas perdas quando aplicada na superfície do solo em função da volatilização de NH<sub>3</sub> são bem acentuadas. Por outro lado, o sulfato de amônio mesmo tendo um custo maior, propicia perdas mínimas de NH<sub>3</sub> quando o pH do solo está abaixo de sete. No entanto, este fertilizante, teoricamente, pode ter seu efeito comprometido devido à lixiviação de nitratos (CANTARELLA, 2007 apud SOUSA, 2011).

## **2.2 O gênero *Azospirillum***

Os altos custos dos adubos nitrogenados, seu baixo rendimento e a dependência de cerca de 70% da ureia utilizada na agricultura do comércio exterior (BONIFÁCIO; SOUSA, 2007) torna clara a necessidade de se buscar alternativas para a obtenção do nitrogênio demandado pelas plantas.

Deste modo, as bactérias promotoras do crescimento de plantas podem ser uma alternativa na busca pela sustentabilidade, pois, auxiliam no crescimento das plantas de diversas maneiras, sendo as mais relevantes: a capacidade de fixação biológica de nitrogênio (bactérias diazotróficas), aumento na atividade da redutase do nitrato quando crescem endofiticamente nas plantas, produção hormonal como giberelinas, etileno, auxinas e citocininas e podem atuar também no controle de patógenos (DOBBELAERE et al., 2003; HUERGO et al., 2008).

Dentre as bactérias promotoras do crescimento de plantas destacam-se as do gênero *Azospirillum*. São micro-organismos de vida livre e habitam quase todos os ambientes terrestres (HUERGO et al., 2008). De 30 a 90% dos solos coletados em todo mundo contêm

*Azospirillum brasilense* ou *Azospirillum lipoferum* (DÖBEREINER et al., 1976). Estas bactérias podem colonizar as raízes e o colmo da planta sem causar sintomas de doenças (TERVER; HOLLIS, 2002). São também chamadas diazotróficas, pois conseguem aproveitar os gases atmosféricos que penetram entre os espaços porosos do solo, fixando o nitrogênio atmosférico através de uma enzima chamada desidrogenase, que rompe a tripla ligação do N<sub>2</sub> reduzindo-o à amônia (HUNGRIA et al., 2007).

As bactérias da espécie *Azospirillum brasilense* são gram-negativas, em formato de bastonetes, apresentam um movimento vibroide característico e possuem um padrão de flagelo misto no qual um flagelo polar é sintetizado durante o crescimento em meio líquido e vários flagelos laterais são sintetizados em meio sólido (HALL; KRIEG, 1984). Possuem o diâmetro de 1 micrômetro (µm) e o comprimento de 2,1 a 3,8 µm (SILVA et al., 2004). Sua temperatura ótima de crescimento varia entre 28 e 41°C (ECKERT et al., 2001). São micro-organismos aeróbicos típicos quando supridos com fonte de nitrogênio combinado, e microaerófilos quando crescem dependente da fixação de N<sub>2</sub> (DONZELI, 2002). Algumas bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> estão presentes na superfície de raízes, entretanto, algumas espécies do gênero *Azospirillum* ocorrem dentro das raízes, entre o meio intercelular e, em alguns casos, no interior de algumas células de raiz, a exemplo do protoxilema que pode ser completamente tomado por estas (SIQUEIRA; FRANCO, 1988).

As bactérias deste gênero provavelmente possuem uma vantagem seletiva importante em relação a outros micro-organismos da rizosfera, uma vez que suas células exibem uma alta motilidade aliada à quimiotaxia positiva de certos ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos (ZHULIN et al., 1988). Em relação ao *Azospirillum brasilense* destacam-se dois aspectos que o caracterizam: sua alta mobilidade, mesmo em meios de cultura alcalinos envelhecidos (DÖBEREINER, 1992), e sua incapacidade de utilizar glicose como fonte de carbono, devido à ausência de enzimas glicolíticas e de um transportador específico na membrana plasmática (GOEBEL; KRIEG, 1984). As fontes de carbono preferenciais destes micro-organismos são ácidos orgânicos, como o malato e o piruvato, e há uma notável preferência de frutose em relação à glicose. Além do nitrogênio atmosférico, algumas outras fontes podem fornecer nitrogênio, como amônia, nitrato, nitrito e aminoácidos (DÖBEREINER, 1992).

### 2.3 *Azospirillum* em associação com milho e outras gramíneas

Embora os melhores resultados da fixação biológica de nitrogênio (FBN) tenha sido demonstrada na interação entre rizóbios e leguminosas, há relatos de incrementos significativos da disponibilidade de nitrogênio por meio da FBN em gramíneas, a exemplo do arroz (BODDEY et al., 1995), cana-de-açúcar (JAMES, 2000), milho, sorgo e trigo (RONCATO-MACCARI et al., 2003). Dentre os micro-organismos diazotróficos que apresentam associação com gramíneas um dos gêneros mais estudados atualmente é o *Azospirillum*, sendo vasto o número de trabalhos acerca de sua fisiologia, bioquímica e genética (BALDANI et al., 1997; BASHAN; HOLGUIN, 1997).

No Brasil, foram realizados diversos trabalhos a fim de comprovar a eficiência da inoculação com *Azospirillum* para a cultura do milho, dentre os quais Hungria et al. (2010) observaram que o rendimento dos tratamentos inoculados com *Azospirillum brasilense* foi, em média, 24% superior ao tratamento controle. Este trabalho, aliado a outros na mesma linha de pesquisa, permitiu a autorização pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) da produção de inoculantes comerciais de algumas estirpes de *Azospirillum brasilense* destinados à cultura do milho, uma vez que resultaram em incrementos na produção de grãos de 662 a 823 kg ha<sup>-1</sup>.

Segundo Hungria (2011), avaliando a cultura do milho, a inoculação com *Azospirillum* junto à aplicação de 24 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio na semeadura proporcionou uma produtividade de 3400 kg ha<sup>-1</sup> de grãos, representando uma boa alternativa para o cultivo em época de segunda safra (safrinha) e para a agricultura familiar. No mesmo trabalho, avaliou-se também a suplementação de 30 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio em cobertura, que proporcionou uma produtividade de 7000 kg ha<sup>-1</sup>. Sumner (1990), através de um levantamento de dados sobre a aplicação de estirpes de *Azospirillum* em cereais, documentou que 32 ensaios apresentaram resposta positiva à inoculação sobre o rendimento de grãos (dados entre os anos de 1983 a 1985). Ainda, segundo Dobbelaere et al. (2001), através de um sumário de experimentos envolvendo a inoculação com *Azospirillum* em gramíneas, conduzidos na década de 1990, mostraram resultados satisfatórios em diversos países como Israel, França, Argentina, México e África do Sul. Cavallet et al. (2000) inocularam sementes de milho com um produto comercial à base de *Azospirillum* spp. e obtiveram respostas positivas no comprimento médio das espigas e na produtividade (17%), de 5211 para 6067 kg ha<sup>-1</sup>, e de 6% na média do comprimento das espigas.

Embora exista no mercado, inclusive no Brasil, inoculantes à base de *Azospirillum*, a sua utilização ainda é restrita devido a uma série de fatores, entre eles: limitações e inconsistências no desempenho do processo de colonização da planta hospedeira pela bactéria (MORRISSEY et al., 2004), e inconvenientes decorrentes do tratamento de sementes na propriedade, uma vez que a tendência do mercado atual é fornecer sementes já tratadas e prontas para a semeadura.

## 2.4 Nitrogênio residual

O nitrogênio aplicado via solo, na forma de adubo verde ou fertilizantes minerais, segue diferentes rotas. Parte deste nutriente é perdido no sistema solo-planta por processos de erosão, lixiviação, volatilização e desnitrificação (LARA CABEZAS et al., 2000; SAIKIA; JAIN, 2007), parte é aproveitado pelas plantas e o restante permanece no solo, na maior parte das vezes, sob a forma orgânica (SCIVITTARO et al., 2003).

Na cultura do milho, o aproveitamento do nitrogênio, no cultivo em que o mesmo foi aplicado, é cerca de 50%, quando utilizado como fertilizante mineral, e, em média, de 20% como adubo verde (SCIVITTARO et al., 2000), permanecendo nitrogênio residual no solo que poderá ser aproveitado por cultivos subsequentes (HARRIS et al., 1994). O baixo aproveitamento do nitrogênio de fontes minerais e, principalmente orgânicas, destaca o efeito residual deste nutriente em cultivos subsequentes à sua aplicação no solo (AZAM et al., 1985; SCIVITTARO et al., 2000).

Estudos com adubos verdes marcados com  $^{15}\text{N}$  demonstram alto retorno do nitrogênio presente na matéria seca da planta para o solo (LARA CABEZAS et al., 2000), e este N oriundo de fontes orgânicas é o que apresenta maior recuperação no solo por parte da planta em cultivos subsequentes, variando entre 44 e 89%, enquanto que para os adubos minerais a recuperação de nitrogênio está entre 12 e 53 % (AZAM et al., 1985; HARRIS; HESTERMAN, 1990; HARRIS et al., 1994; SCIVITTARO et al., 2003). Silva et al. (2006) relatam maior aproveitamento do nitrogênio via ureia em comparação com N disponibilizado pela palhada na cultura do milho. Estes autores ainda observaram, na absorção pelo milho do N residual oriundo da ureia, valores relativamente pequenos, onde, mesmo variando as doses de nitrogênio aplicadas, o milho absorveu em média  $4 \text{ kg ha}^{-1}$  (2%), fato este também observado por Sampaio e Salcedo (1993).

## 2.5 Sobrevivência e efeito residual de *Azospirillum*

Bactérias do gênero *Azospirillum* sobrevivem por longos períodos de tempo na rizosfera de inúmeras espécies de plantas (BASHAN; LEVANONI, 1990), pois a colonização das raízes é inespecífica e as bactérias migram entre diferentes espécies vegetais (BASHAN; HOLGUIN, 1994; BASHAN et al., 1994; BASHAN et al., 1989). No entanto, existem várias dúvidas sobre a sobrevivência desta bactéria no solo próximo à rizosfera. Alguns estudos demonstram a ocorrência de *Azospirillum* na maioria dos solos tropicais (DOBEREINER; BALDANI, 1979; DOBEREINER et al., 1976) e em alguns solos de regiões de clima temperado (GERMIDA, 1986). Por outro lado, estudos realizados principalmente em zonas temperadas e semi-áridas (ALBRECHT et al., 1983; DE CONINCK et al., 1988) e nas regiões tropicais (NAYAK et al., 1986) verificaram que *Azospirillum* spp. apresenta altas taxas de mortalidade nesses solos e dificilmente sobrevive por um período longo de tempo (HARRIS et al., 1989).

Bashan e Vázquez (2000), através de estudos sobre os fatores que influenciam a sobrevivência de cinco espécies de bactérias promotoras do crescimento, incluindo *Azospirillum*, demonstram que alguns componentes variáveis de solo influenciam diretamente sua sobrevivência, tais como a textura e os níveis de carbonato. Altas porcentagens de areia e carbonato tinham impacto altamente negativo sobre a sobrevivência destas bactérias no solo.

Oliveira et al. (2004), em ensaio avaliando a sobrevivência de bactérias diazotróficas endofíticas no solo sob diferentes teores de umidade, relataram pouca influência deste fator sobre a sobrevivência de *Azospirillum brasilense*. No entanto, a umidade influencia diretamente a culturabilidade das espécies endofíticas *Azospirillum amazonense* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Bashan et al. (1995) também encontraram resultados semelhantes quanto à resposta destas bactérias à umidade, uma vez que, na ausência de plantas, as características gerais de sobrevivência de *A. brasilense* diferia muito em relação à área geográfica e origem dos solos, mas não de acordo com a aridez original dos mesmos. Bashan et al. (1995) ainda revelaram neste trabalho uma correlação positiva de porcentagem de argila, nitrogênio, matéria orgânica e capacidade de retenção de água associados à sobrevivência de *A. brasilense*.

Um dos principais obstáculos na eficiência de *A. brasilense* é sua sobrevivência no solo antes da colonização das raízes, apesar de sua alta capacidade de se mover em direção as raízes em crescimento (JAGNOW, 1987; MICHIELS et al., 1989), uma vez que esta bactéria

é um colonizador rizosférico e não sobrevive, na maioria dos solos, se submetido a períodos prolongados de tempo (BASHAN, 1995). Embora muitos estudos que permeiam a sobrevivência desta bactéria estejam ligados diretamente ao seu efeito residual no solo, há ausência de trabalhos que mencionem especificamente esta variável, daí a necessidade de se fazer um estudo que mensure o efeito residual oriundo da aplicação de produtos comerciais à base de *Azospirillum*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi realizado em condições de casa de vegetação no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia em Uberlândia – MG, nos meses de maio e junho de 2011.

#### 3.1 Delineamento experimental

O delineamento estatístico adotado foi o de blocos ao acaso (DBC) com os tratamentos distribuídos em esquema fatorial 3 x 3, com cinco repetições e parcelas formadas por dois vasos de plástico (com capacidade de 2L e com drenos) com uma planta de milho cada.

#### 3.2 Condução do ensaio

Este experimento foi realizado utilizando-se o substrato de um ensaio conduzido anteriormente, no qual foram avaliadas doses de nitrogênio e de *Azospirillum*. As temperaturas máximas e mínimas registradas no decorrer do primeiro ensaio estão contidas na figura 1. Nesse primeiro ensaio, os tratamentos foram compostos por doses de nitrogênio (0, 100 e 200 kg ha<sup>-1</sup>) e doses de *Azospirillum* aplicado via semente (0, 100 e 200 mL ha<sup>-1</sup>). As sementes foram inoculadas com um produto comercial que contém estirpes da bactéria *Azospirillum brasilense* na concentração de 2x10<sup>8</sup> células viáveis por mL<sup>-1</sup>, foram utilizados sacos plásticos para auxiliar na inoculação das sementes. As sementes inoculadas foram mantidas por cerca de 4 horas em local protegido do sol, até o momento da semeadura, a qual foi efetuada com três sementes por vaso a 3 cm de profundidade. Utilizou-se, como substrato, Latossolo Vermelho Distrófico.

A adubação de base, realizada no primeiro ensaio, consistiu da aplicação do equivalente a 120 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 50 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O e 50 kg ha<sup>-1</sup> de N nas fontes superfosfato triplo (37% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), cloreto de potássio (58% de K<sub>2</sub>O) e sulfato de amônio (20% de N), respectivamente. Os adubos foram distribuídos no solo a 5 cm da superfície. A adubação de cobertura foi realizada quando as plantas de milho estavam no estágio de desenvolvimento V<sub>4</sub>, com cloreto de potássio (58% de K<sub>2</sub>O) e nitrato de amônio (32% de N) em doses equivalentes a 150 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O e, de acordo com o tratamento, 50 e 150 kg ha<sup>-1</sup> de N. Os

dados da análise de solo, realizada anteriormente à implantação do primeiro ensaio, estão contidos na Tabela 1.

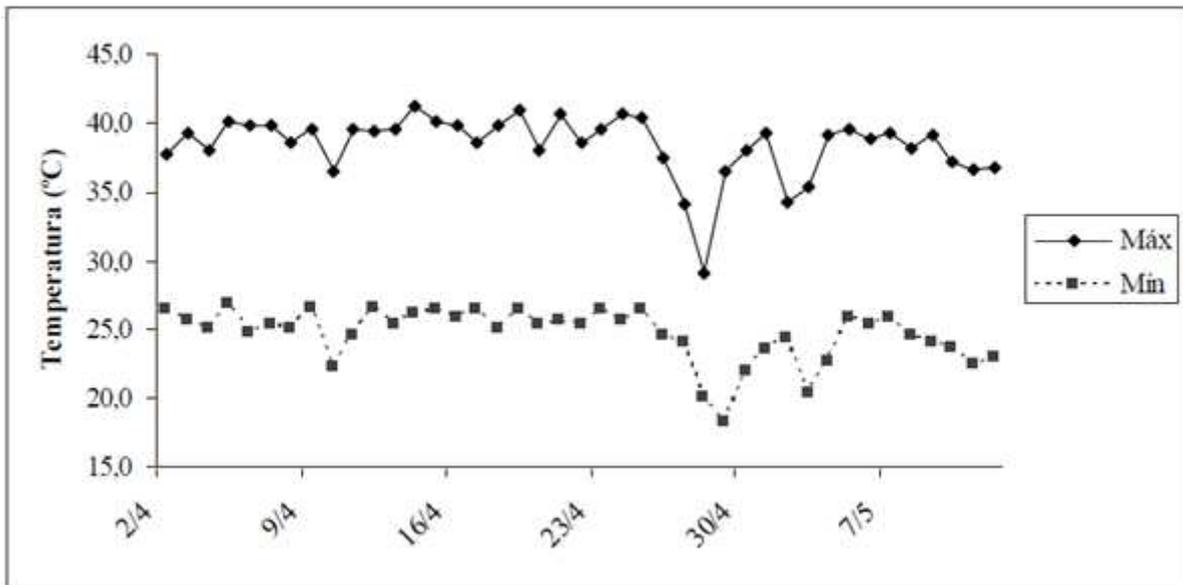
Após o término do primeiro ensaio, o qual foi avaliado 40 dias após a semeadura do milho, foi instalado o presente trabalho. Para tanto, o solo proveniente de cada parcela do ensaio anterior foi homogeneizado, peneirado e reutilizado. Posteriormente, foram semeadas três sementes de um híbrido comercial de milho, a 3 cm de profundidade, em cada vaso contendo o substrato citado acima.

Neste ensaio, os tratamentos avaliados foram compostos por dois fatores. O primeiro fator correspondeu ao residual das doses de nitrogênio (0, 100 e 200 kg ha<sup>-1</sup>) aplicadas no ensaio anterior, e o segundo, ao residual das doses de inoculante líquido à base de *Azospirillum* (0, 100 e 200 mL ha<sup>-1</sup>) também aplicadas no ensaio anterior.

O desbaste foi realizado 10 dias após a semeadura, mantendo-se uma planta por vaso. Durante todo o ensaio, a umidade do substrato manteve-se próxima à capacidade de campo. Para o controle de plantas infestantes foram realizadas, sempre que necessário, capinas manuais.

**TABELA 1.** Propriedades químicas e físicas do solo analisadas anteriormente ao primeiro ensaio – Uberlândia-MG, 2011.

Propriedades	Amostra (0-20 cm)
pH (H <sub>2</sub> O)	5,9
P me <sup>h</sup> -1 (mg dm <sup>-3</sup> )	4,1
K <sup>+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,24
Ca <sup>2+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	2,2
Mg <sup>2+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1,2
Al <sup>3+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,0
H + Al (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	2,7
M.O. (dag kg <sup>-1</sup> )	3,0
SB (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	3,64
t (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	3,64
T (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	6,34
V (%)	57
m (%)	0
Areia grossa (g kg <sup>-1</sup> )	152
Areia fina (g kg <sup>-1</sup> )	101
Silte (g kg <sup>-1</sup> )	62
Argila (g kg <sup>-1</sup> )	685



**FIGURA 1.** Temperaturas máximas e mínimas durante o período de 2 de abril a 12 de maio de 2011 na casa de vegetação do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia.

### 3.3 Avaliações

#### 3.3.1 Altura (cm), diâmetro de caule (mm), volume de raiz (mL) e massas de matéria fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular (g) das plantas de milho.

Aos 40 dias após a semeadura, foram analisadas as seguintes características: altura da planta (cm), diâmetro de caule (mm), volume de raiz (mL) e massas de matéria fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular (g). A altura das plantas de milho foi determinada com auxílio de uma trena e compreendeu a distância entre a região do colo e a inserção da última folha completamente desenvolvida. Na região do colo, foi determinado também o maior diâmetro do caule com um paquímetro digital. Para determinação do volume de raízes das plantas de milho, as mesmas foram lavadas em água corrente, secas e submersas em proveta contendo água. O volume foi determinado pela diferença entre os volumes inicial e final do recipiente. As massas da matéria fresca da parte aérea e raiz foram obtidas após lavagem do sistema radicular em água corrente e posterior separação das partes (aérea e radicular) com um corte na altura do colo, sendo pesadas em uma balança com sensibilidade de 0,01g. Em seguida, as raízes e a parte aérea foram acondicionadas, separadamente, em sacos de papel e submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar a 65-70°C até peso constante, para determinação da massa seca.

### 3.3.2 Atividades das enzimas urease e fosfatase

Após retirada das plantas de milho dos vasos (no fim do ensaio), o solo foi homogeneizado e retirada uma amostra para determinação da atividade enzimática (equivalente a um copo descartável de 250 mL). O solo foi acondicionado em sacos plásticos e mantido em geladeira. As atividades das enzimas urease e fosfatase, no solo, foram determinadas por meio de espectrofotometria, seguindo os protocolos de execução propostos por Guan (1986) e por Tabatabai e Bremner (1969), respectivamente.

### 3.3.3 Teores de clorofila, nitrogênio e fósforo

O teor médio de clorofila nas folhas foi determinado através de um clorofilômetro eletrônico (marca clorofiLOG modelo CFL 1030), que foi utilizado seguindo as recomendações do fabricante (FALKER, 2008). Foram realizadas duas leituras por planta, feitas no terço superior da última folha completamente desenvolvida.

As quantificações de nitrogênio e fósforo nas plantas foram feitas seguindo o protocolo descrito no Manual de Análises Químicas do Solo, Plantas e Fertilizantes (EMBRAPA, 2009). As amostras secas passaram, respectivamente, por processos de digestão sulfúrica, destilação e titulação (N-Kjeldahl), e por espectrofotometria com amarelo-de-vanadato.

## 3.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 0,05 de significância. As análises foram realizadas com o software Sisvar (FERREIRA, 2000).

Foram testadas as pressuposições necessárias à análise de variância, utilizando os testes de Shapiro e Wilk (1965) e Levene (1960), respectivamente para a normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, utilizando-se o software SPSS. Os dados de altura de planta, massa fresca de parte aérea (MFPA) e massa fresca de raiz (MFR) foram transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$ , massa seca de parte aérea (MSPA) e teor de fósforo em  $\sqrt{x + 1}$ , e teor de clorofila em  $\sqrt{x}$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Desenvolvimento vegetativo das plantas de milho

Para o fator relacionado ao desenvolvimento de plantas de milho (medidas de altura, diâmetro de colmo, acúmulo de massas de matéria fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular e volume de raízes de plantas de milho) em resposta ao efeito residual da inoculação da bactéria do gênero *Azospirillum*, não se observou diferenças significativas entre as diferentes doses, apenas para o residual de fertilizante nitrogenado os resultados foram significativos (Tabela 2).

Os caracteres altura de planta, diâmetro de colmo, matéria fresca da parte aérea (MFPA), matéria seca da parte aérea (MSPA) e volume de raiz para as doses de 100 e 200 (kg ha<sup>-1</sup>) de residual do fertilizante nitrogenado, não demonstraram diferenças entre si. Porém, quando comparadas à testemunha demonstraram resultados superiores. Para a dose de 200 kg ha<sup>-1</sup> obteve-se 9,84 mm de diâmetro de colmo, enquanto que para a testemunha este diâmetro foi de 5,92 mm, representando um acréscimo de 66,2%. Para a variável massa seca de parte aérea (MSPA) a diferença entre a dose de nitrogênio 200 kg ha<sup>-1</sup> e a testemunha foi de 2,52 g, resultado que representa mais de 340% de acréscimo.

Em relação à matéria seca da raiz (MSR), obteve-se maior resultado com o residual do fertilizante nitrogenado aplicado na dose de 100 kg ha<sup>-1</sup> seguida pela dose de 200 kg ha<sup>-1</sup>, que foram de 0,75 g e 0,60 g, respectivamente. O maior peso de matéria seca da raiz obtido em resposta ao residual da dose intermediária de nitrogênio (100 kg ha<sup>-1</sup>) pode ser explicado pelo fato da concentração desse nutriente próximo a raiz ser restrita estimulando o crescimento das raízes a fim de uma melhor exploração do solo (BONIFAS et al., 2005).

A testemunha obteve as menores médias quando comparada com as doses de nitrogênio testadas, em todos os caracteres vegetativos exceto no desenvolvimento de raízes, demonstrando a importância deste nutriente para o crescimento inicial das plantas de milho, participando ativamente do metabolismo e divisão celular e da constituição de ácidos nucleicos (BÜLL, 1993).

O efeito residual do nitrogênio no desenvolvimento vegetativo de plantas de milho também foi observado por Mascarenhas (2011), em que foi verificado acréscimo na produtividade e na massa de 1000 grãos.

**TABELA 2.** Medidas de altura, diâmetro de colmo, acúmulo de massas de matéria fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular e volume de raízes de plantas de milho, aos 40 dias após a semeadura (DAS), em função do residual de doses de nitrogênio. Uberlândia – MG, 2011.

Dose de nitrogênio (kg ha <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	Altura de planta <sup>2</sup> (cm)	Diâmetro do colmo (mm)	MFPA <sup>2</sup> (g)	MFR <sup>2</sup> (g)	MSPA <sup>3</sup> (g)	MSR (g)	Volume de raiz (mL)
0	10,83b	5,92b	5,24b	11,14b	0,57b	0,40c	8,45b
100	22,77a	10,20a	25,16a	14,87a	2,52a	0,75a	14,28a
200	20,69a	9,84a	23,72a	13,38ab	2,52a	0,60b	12,46a

<sup>1</sup>médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância;

<sup>2</sup>dados transformados segundo  $\sqrt{x + 0,5}$ ;

<sup>3</sup>dados transformados segundo  $\sqrt{x + 1}$ .

#### 4.2 Atividade das enzimas urease e fosfatase

Quanto à atividade das enzimas urease e fosfatase em resposta ao residual de doses de nitrogênio e da aplicação de *Azospirillum* não foram observadas diferenças entre os tratamentos (Tabela 3).

Apesar dos micro-organismos serem relevantes na atividade ureolítica do solo, essa atividade deriva também das chamadas ureases do solo as quais são oriundas de resíduos de plantas e de bactérias mortas imobilizadas em argilas e no húmus do solo (BREMNER; KROGMEIER, 1989). Este resultado pode ser explicado também pelo declínio da população microbiana, ligada diretamente com a atividade destas enzimas, no período em que os vasos ficaram sem as plantas de milho, entre o primeiro ensaio e o presente ensaio. *Azospirillum brasilense* é um colonizador rizosférico que apresenta altas taxas de mortalidade na maioria dos solos quando está fora da região rizosférica. Sua sobrevivência no solo está diretamente ligada à manutenção de plantas (BASHAN, 1995).

A quantificação das atividades enzimáticas tem sido uma ferramenta para estimar as populações microbianas e mudanças na ecologia do solo resultantes das interações entre inoculantes microbianos e populações pré-existentes do solo (DOYLE; STOTZKY, 1993).

Ao contrário do presente trabalho, alguns autores descrevem uma correlação positiva entre o aumento da atividade enzimática e a inoculação com *Azospirillum*. Vásquez (2000) relata um aumento de 150% na atividade da fosfatase na rizosfera de plantas de milho quando

inoculadas com diferentes espécies de *Azospirillum*. Madhaiyan et al. (2009) descrevem maior atividade das enzimas urease e fosfatase na cultura do arroz quando as sementes foram inoculadas com *Azospirillum* sp.

**TABELA 3.** Atividades das enzimas urease ( $\mu\text{g NH}_4^+ \text{g}^{-1}$  solo seco  $\text{h}^{-1}$ ) e fosfatase ( $\mu\text{g PNP g}^{-1}$  solo seco  $\text{h}^{-1}$ ) em solo cultivado com milho, aos 40 dias após a semeadura (DAS), em função do residual de nitrogênio e de *Azospirillum*. Uberlândia – MG, 2011.

Dose de nitrogênio ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) <sup>1</sup>	Dose de <i>Azospirillum</i> ( $\text{mL ha}^{-1}$ )			Médias
	0	100	200	
<b>Urease</b>				
0	65,32	66,21	67,70	66,41 a
100	60,43	56,89	63,70	60,34 a
200	46,43	68,58	58,12	57,71 a
<b>Médias</b>	57,39 A	63,89 A	63,17 A	
<b>Fosfatase</b>				
0	268,11	258,01	250,58	258,90 a
100	269,54	289,31	277,21	278,69 a
200	276,75	264,53	299,40	280,22 a
<b>Médias</b>	271,47 A	270,62 A	275,73 A	

<sup>1</sup>médias seguidas por letras iguais, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

### 4.3 Teores de clorofila, nitrogênio e fósforo

Em função do residual de doses de nitrogênio, observaram-se respostas positivas tanto nos teores de clorofila quanto nos teores de nitrogênio na planta, o que não ocorreu com os teores de fósforo (Tabela 4). O residual das doses de inoculante não proporcionou diferenças nos teores de clorofila, nitrogênio e fósforo.

O tratamento com a maior dose de nitrogênio aplicada no cultivo anterior proporcionou um ICF de 60,56 e um teor de nitrogênio na planta de 57,62  $\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente 275 e 272% em relação à testemunha. Isto evidencia o efeito residual desse nutriente no solo. O teor de nitrogênio na planta é tanto maior quanto sua disponibilidade no solo na forma assimilável, devido à possibilidade desse nutriente estar disposto na região de maior atividade das raízes em maiores quantidades, facilitando sua absorção. Purcino (1992) correlaciona à inoculação de estirpes de *Azospirillum brasilense* o aumento no teor de nitrogênio nas folhas e nos grãos de milho, resultados semelhantes no aumento do teor de nitrogênio podem não ter sido observados neste ensaio devido a fatores relacionados à

sobrevivência da bactéria. As temperaturas na casa de vegetação tanto no primeiro ensaio quanto neste, apresentavam frequentemente médias maiores que 35°C. Tais temperaturas afetam diretamente a sobrevivência da bactéria (HUNGRIA, 2011).

Também nota-se uma relação estreita entre os teores de nitrogênio na planta e os teores de clorofila, descrita por Booij et al. (2000), em decorrência, principalmente, do fato de 50 a 70% do nitrogênio presente nas folhas ser integrante de enzimas associadas aos cloroplastos (STOCKING; ONGUN, 1962). Essas enzimas são constituídas basicamente de proteínas, havendo assim, uma estreita interdependência entre a clorofila e esse nutriente (LARCHER, 2006).

Embora o nitrogênio aumente o peso, altura e sistema radicular das plantas, de maneira geral, afetando de forma positiva a absorção de fósforo e de água no solo, não se observou diferença entre os tratamentos para os teores de fósforo na planta.

**TABELA 4.** Teores de clorofila, nitrogênio e fósforo de plantas de milho, aos 40 dias após a semeadura (DAS), em função do residual de doses de nitrogênio. Uberlândia – MG, 2011.

Dose de nitrogênio (kg ha <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	Clorofila <sup>2,3</sup>	N <sup>4</sup>	P <sup>4,5</sup>
0	22,04c	21,15c	6,66a
100	53,09b	45,30b	5,61a
200	60,56a	57,62a	6,01a

<sup>1</sup>médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância;

<sup>2</sup>médias expressas em ICF (Índice de Clorofila Falker);

<sup>3</sup>dados transformados segundo  $\sqrt{x}$ ;

<sup>4</sup>médias expressas em g do nutriente kg<sup>-1</sup> de tecido seco (parte aérea + raízes);

<sup>5</sup>dados transformados segundo  $\sqrt{x + 1}$ .

## 5 CONCLUSÕES

A utilização de *Azospirillum brasilense* em cultivo anterior não influencia o desenvolvimento vegetativo de plantas de milho na semeadura subsequente, tampouco a atividade das enzimas urease e fosfatase. Por sua vez, o residual da aplicação de fertilizante nitrogenado afeta o desenvolvimento vegetativo das plantas, os teores de clorofila e de nitrogênio.

## REFERÊNCIAS

- AZAM, F.; MALIK, K.A. & SAJJAD, M.I. Transformations in soil and availability to plants of  $^{15}\text{N}$  Applied as inorganic fertilizer and legume residues. **Plant Soil**, 86:3-13, 1985.
- BALDANI, J. L.; CARUSO, L. V.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p 911-922, 1997.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum* – plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.103-121, 1997.
- BASHAN, Y.; VAZQUEZ, P. Effect of calcium carbonate, sand, and organic matter levels on mortality of five species of *Azospirillum* in natural and artificial bulk soils. **Biol. Fertil. Soils.**, 30:450-459, 2000.
- BODDEY, R. M.; MORAES SÁ, J. C.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. The contribution of biological nitrogen fixation for sustainable agricultural systems in the tropics. **In: International Symposium - Sustainable Agriculture for the Tropics: The Role of Biological Nitrogen Fixation**. Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brazil, 1995. p. 787-799,
- BONIFAS, K.D.; et al. The effects of nitrogen supply on root: shoot ratio in corn and velvetleaf. **Weed Science**, Champaign, v.53, p. 670-675, 2005.
- BOOIJ, R.; VALENZUELA, J.L.; AGUILERA, C. Determination of crop nitrogen status using non-invasive methods. In: HAVERKORT, A.J.; MACKERRON, D.K.L. (Eds.). Management of nitrogen and water in potato production. The Netherlands, **Wageningen Pers**, 2000. p.72-82.
- BREMNER, J.M.; KROGMEIER, M.J. 1989. Evidence that the adverse effect of urea fertilizer on seed germination in soil is due to ammonia formed through hydrolysis of urea by soil urease. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 86, 8185-8188.
- BÜLL, L.T. Nutrição mineral do milho. In: BÜLL, L.T.; CANTARELLA, h. (Ed.). Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: **POTAFOS**, 1993. p.63-145.
- CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAES, R.F.; ALVAREZ, V.H.; BARROS, N.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. (Eds). **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de ciência do solo, 2007. p.375-470.
- CANTARELLA, H.; DUARTE, A. P. **Adubação do milho safrinha**. In: SEMINÁRIO SOBRE A CULTURADO MILHO SAFRINHA, 3., 1995, Assis. Resumos...Campinas: IAC/CDV, 1995. p. 21-27.

CAVALLET, L.E.; PESSOA A.C.S.; HELMICH JU.J.; HELMICH P. R.; OST C.F. Produtividade do milho em resposta a aplicação de nitrogênio e inoculação com sementes de *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Engenharia ambiental**, Campina Grande, v 4n.1, p. 129-32, 2000.

CRUZ, J.C.; PEREIRA, F.T.F.P.; PEREIRA FILHO, I.A.; COELHO, A.M. **Resposta de cultivares de milho à adubação nitrogenada em cobertura**. Sete Lagoas: EMBRAPA. Dezembro, 2005. p.65.

DOBBELAERE, S; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant-growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 22, n. 2, p.107-149, 2003.

DOBBELAERE, S.; CROONRNBOGHES, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, P.; LABANDERA-GONZALEZ, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; AGUIRRE, J.F.; KAPULNIK, Y.; BRENER, S.; BURDMAN, S.; KADOURI, D.; SARIG, S.; OKON, Y. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.871-879, 2001.

DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. In.: CARDOSO, E.J.B.N., TSAI, S.M., NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas : SBCS, 1992. p. 173-180.

DÖBEREINER, J.; MARRIEL, I.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Canadian Journal of Microbiology**, v.22, p.1464–1473, 1976.

Doyle, D.J., Stotzky, G., 1993. Methods for the detection ochanges in the microbial ecology of soil caused by the introduction of micro-organisms. **Microbial Rel.** 2, 63–72.

DONZELI, V.P. **Atividade de alguns componentes da comunidade microbiana do solo e microrganismos diazotróficos endofíticos sob influência do nitrogênio na cultura do milho**. 2002. Dissertação (Mestrado Pós-Graduação Instituto de Biologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002. 84p.

ECKERT, B. et al. *Azospirillum doebereinae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.17-26, 2001.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2. ed. rev. ampl. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 627p.

FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA LTDA. Manual do medidor eletrônico de clorofila ClorofiLOG CFL 1030, Porto Alegre, 2008. 4p.

FANCELLI, A.L. **Nutrição e adubação do milho**. Piracicaba: USP, 2000. 43p.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do SISVAR (Sistema para análise de variância) Windows 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometrias, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FORNASIERI FILHO, D. **A cultura do milho**. Jaboticabal: FUNEP, 1992.

FRANÇA, G. E.; COELHO, A. M.; RESENDE, M.; BAHIA FILHO, A. F. C. **Parcelamento da adubação nitrogenada em cobertura na cultura do milho irrigado**. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. Relatório técnico anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo: 1992- 1993. Sete Lagoas, 1994. p. 28-29.

GOEBEL, E.M.; KRIEG, N.R. 1984. Fructose catabolism in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. **J. Bacteriol.** 159: 86-92.

GUAN, S.Y. **Soil enzyme and its methodology**. Beijing: China Agricultural Press, 1986. p.274-340.

HALL, P. G.; KRIEG, N. R. Application of the indirect immunoperoxidase stain technique to the flagella of *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 47, p. 433-435, 1984.

HARRIS, G.H.; HESTERMAN, O.B.; PAUL, E.A.; PETERS, S. & E.JANKE, R.R. Fate of legume and fertilizer nitrogen-15 in a long term cropping systems experiment. **Agron. J.**, 86:910-915, 1994.

HARRIS, G.H. & HESTERMAN, O.B. Quantifying the nitrogen contribution from alfafa to soil and two succeeding crops using nitrogen-15. **Agron. J.**, 82:129-134, 1990.

HARPER, J.E. Nitrogen metabolism. In: BOOTE, K.J., BENNETT. J.M., SINCLAIR, T.R., *et al.* **Physiology and determination of crop yield**. Madison : ASA/CSSA/SSSA, 1994. Chapt.11A. p.285-302.

HUERGO, L.F.; MONTEIRO, R.A.; BONATTO, A.C.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L.S.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. *Azospirillum* sp.: cell hysiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiologia, Argentina, 2008. p.17-35.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283). (ISSN 1516-781X; N 283)

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**, v.331, n.1-2, p.413-425, 2010.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense***: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: EMBRAPA-SOJA, 2011. 36p. (Documentos EMBRAPA-SOJA, ISSN 1516-781X, N.325).

LARA CABEZAS, W.A.R.; TRIVELIN, P.C.O.; KORNODÖRF, G.H. & PEREIRA, S. Balanço da adubação nitrogenada sólida e fluida de cobertura na cultura do milho em sistema plantio direto no Triângulo Mineiro. **R. Bras. Ci. Solo**, 14:363-376, 2000.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RIMA Artes e Textos, 2006. 532p.

LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. In: OLKIN, I. et al. (eds.) **Contributions to probability and statistics**: essays in honor of Harold Hotelling. California: Stanford University Press, 1960. p.278-292.

MADHAIYAN M, POONGUZHALI S, KANG BG, LEE YJ, CHUNG JB, SA TM (2009). Effect of co-inoculation of methylotropic *Methylobacterium Oryzae* with *Azospirillum brasilense* and *Burkholderia pyrrocinia* on growth and nutrient uptake of tomato, red pepper and rice. **Plant Soil**, 328: 71-82.

MATOS, E.H.S.F. **Dossiê técnico**: Cultivo protegido de hortaliças. Brasília: CDT/UNB, 2007

MATSON, P.A.; BILLOW, C.; HALL, S.; ZACHARIASSEN, J. Fertilization practices and soil variations control nitrogen oxide emissions from tropical sugar cane. **Journal of Geophysical Research**, v.101(13), p.18533-18545, 1996.

MIFLIN, B.J.; LEA, P.J. The pathway of nitrogen assimilation in plants. **Phytochemistry**, New York, v.15, p.873-885, 1976.

MORRISSEY, J.P.; DOW, M.; MARK, G.L.; O'GARA, F., 2004. **Are microbes at the root of a solution to world food production? Rational exploitation of interactions between microbes and plants can help to transform agriculture**. *EMBO Rep* 5:922-926.

OLSON, R.A.; KURTZ, L.T. Crop nitrogen requirements, utilization and fertilization. In: STEVENSON, F.J., ed. *Nitrogen in agricultural soils*. Madison, American Society of Agronomy, 1982. p.567-604 (*Agronomy*, 22).

PÖTTKER, D.; WIETHÖLTER, S. Épocas e métodos de aplicação de nitrogênio em milho cultivado no sistema plantio direto. **Ciência Rural**, v.34, p.1015-1020, 2004.

PURCINO, A.A.C., I.E. MARRIEL., A.C. OLIVEIRA. 1992. Inoculação de milho com estirpes homólogas de *Azospirillum*. **Relatório Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo** 1988-1991. Sete Lagoas, 1992.

REIS JÚNIOR, F.B.; MACHADO, C.T.T.; MACHADO, A.T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 3, p. 1139-1146, 2008.

RONCATO-MACCARI, L.D.B. et al. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.45, p.39-47, 2003.

RYLE, G.J. A. et al. The respiratory costs of nitrogen fixation in soybean, cowpea, and white clover. II. Comparisons of the cost of nitrogen fixation and the utilization of combined nitrogen. **Journal of Experimental Botany**, v.30, p.145-153, 1979.

SÁ, J. C. M.; VIEIRA, A. M.; BOZZA, D. L.; AHRAUS, S. FERREIRA, A. O.; BUENO, L.; SÁ, J. C. M. Nitrogênio: influencia da rotação de culturas e resposta da cultura de milho em solos sob plantio direto. In: CURSO SOBRE MANEJO DO SOLO NO SISTEMA DE PLANTIO DIRETO, 1995, Castro. **Anais...** Castro: Fundação ABC, 1995. p.213-227.

SAIKIA, S.P.; JAIN, V. Biological nitrogen fixation with non-legumes: an achievable target or a dogma? **Current Science**, Bangalore, v. 92, n. 3, p. 317-322, 2007.

SAMPAIO, E.V.S.B. & SALCEDO, L.H. Mineralização e absorção por milheto do nitrogênio do solo, da palha de milho ( $^{15}\text{N}$ ) e da uréia ( $^{15}\text{N}$ ). **R. Bras. Ci. Solo**, 17:423-429, 1993.

SCIVITTARO, W.B.; MURAOKA, T.; BOARETTO, A.E. & TRIVELIN, P.C.O. Transformações do nitrogênio proveniente de mucuna-preta e uréia utilizados como adubo na cultura do milho. **Pesq. Agropec. Bras.**, 38:1427-1433, 2003.

SCIVITTARO, W.B.; MURAOKA, T.; BOARETTO, A.E. & TRIVELIN, P.C.O. Utilização de nitrogênio de adubos verdes e mineral pelo milho. **R. Bras. Ci. Solo**, 24:917-926, 2000

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality. **Biometrika**, London, v.52, n.3, p.591-599, 1965.

SILVA, A.A.O. et al. Ação do *Azospirillum brasiliense* no desenvolvimento das plantas de trigo (variedade IAC-24) e cevada (variedade CEV 95033). **Conscientiae Saúde**, v.3, p.29-35, 2004.

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC Ministério da Educação, ABEAS, Lavras: ESAL, FAEPE, 1988. 236p.  
SILVA, E.C.; MURAOKA, T.; BUZETTI, S.; GUIMARÃES, L. G.; TRIVELIN, P. C. O.;

SOUZA, J.A. Manejo da fertilidade de solo para a cultura do milho. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 233, p. 26-37, 2006.

STOKING, C.R.; ONGUN, A. The intracellular distribution of some metallic elements in leaves. **American Journal of Botany**, 49:284-289, 1962.

SUMNER, M.E. Crop responses to *Azospirillum inoculation*. **Advances in Soil Sciences**, New York, v.12, p.54-123, 1990.

TABATABAI, M.A.; BREMNER, J.M. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.1, p.301-307, 1969.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.449-484.

TERVER, I.W.; HOLLIS, J.P. Bacteria in the storage organs of healthy tissue. **Phytopathology Journal**, New York, v.38, p.960-967, 2002.

VÁZQUEZ, M. M.; CÉSAR, S.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. **Soil Ecology**, Granada, Spain. 6 April 2000.

VELOSO, M. E. C. Utilização do nitrogênio ( $^{15}\text{N}$ ) residual de coberturas de solo e da uréia pela cultura do milho. Rev. Bras. Ciênc. Solo v.30 n.6 Viçosa nov./dez. 2006  
plantio direto no Triângulo Mineiro. **R. Bras. Ci. Solo**, 14:363-376, 2000.

ZHULIN, I.B.; TRETAKOVA, S.E.; IGNATOV, V.V. 1988. Chemotaxis of *Azospirillum brasiliense* towards compounds typical of plant root exudates. **Folia Microbiol.** 33(4): 277-280.

## ANEXO A: PROTOCOLO DA UREASE

### Procedimentos:

1. 5 g de solo;
2. 5 mL de Solução Tampão Citrato pH 6,7;
3. 5 mL de Solução de Uréia 10%;
4. Incubar a 37°C por 3 horas em banho-maria;
5. Completar para 50 mL com água destilada;
6. Transferir 1 mL para tubos eppendorfer;
7. Centrifugar por 5' a 10000 rpm;
8. Em outros tubos eppendorfer adicionar 500 µL do Reagente 1 + 500 µL do Reagente 2;
9. Pipetar 100 µL da amostra centrifugada;
10. Levar para banho-maria por 10' a 37°C;
11. Ler em espectrofotômetro a 600 nm.

### Soluções:

- Solução Tampão Citrato pH 6,7: pesar 1,443 g de ácido cítrico e 98,995 g de citrato de sódio diidratado, diluir em balão volumétrico de 1000 mL.
- Solução de Uréia 10%: pesar 10 g de uréia para cada 100 mL de água.
- Solução de NH<sub>4</sub>Cl: pesar 0,1 g de NH<sub>4</sub>Cl para 1 L de água destilada.

### Curva Padrão:

Ponto	Tampão Citrato (µL)	NH <sub>4</sub> Cl (µL)	Reagente 1 (µL)	Reagente 2 (µL)
1	100	0	500	500
2	90	10	500	500
3	80	20	500	500
4	60	40	500	500
5	40	60	500	500
6	0	100	500	500

1. Levar para banho-maria por 5' a 37°C.

## ANEXO B: PROTOCOLO DA FOSFATASE

### Procedimentos:

1. Pesar 1 g de solo;
2. 4 mL de Tampão Modificado Universal pH 4,0;
3. 0,5 mL de fosfatase substrate (PNP);
4. Incubar a em banho-maria a 37°C por 1 hora;
5. Adicionar 1 mL de CaCl<sub>2</sub>;
6. Adicionar 4 mL de NaOH;
7. Transferir uma alíquota de 1 mL para tubos eppendorfer;
8. Centrifugar por 5' a 10000 rpm;
9. Ler em espectrofotômetro a 405 nm.

### Soluções:

- Solução Tampão Modificado Universal pH 4,0: pesar 5,763 g de ácido cítrico, 4,080 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1,854 g de ácido bórico. Completar o volume para 1 L com água destilada.
- Solução de PNP (fosfatase substrate): pesar 0,0339 g de PNP; adicionar 6 mL de TMU.
- Solução de CaCl<sub>2</sub> 0,5M: pesar 36,75 g de CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O e completar o volume para 1 L.
- Solução de NaOH 0,5M: pesar 20 g de NaOH e completar o volume para 1 L.
- Solução  $\rho$ -nitrophenol: pesar 0,8 g de  $\rho$ -nitrophenol e completar para 10 mL de água. Desta, retirar 200  $\mu$ L e completar o volume para 10 mL com TMU. Deste último tubo, retirar 1 mL e completar novamente para 10 mL com TMU, e desta solução pipetar os pontos da curva.

### Curva Padrão:

Ponto	$\rho$ -nitrophenol ( $\mu$ L)	TMU ( $\mu$ L)	NaOH ( $\mu$ L)	CaCl <sub>2</sub> ( $\mu$ L)
1	0	525	460	115
2	5	520	460	115
3	15	510	460	115
4	25	500	460	115
5	50	475	460	115
6	75	450	460	115