

# MICROORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS E A PRODUTIVIDADE DO TRIGO: EXPERIMENTOS NO CAMPO

ANA M. HONMA <sup>(1)</sup>; VALERIA R. SALA <sup>(2)</sup>, JOSÉ G. FREITAS <sup>(3)</sup>, ADRIANA P. SILVEIRA <sup>(4)</sup>

Nº 0700001

## Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar, em condições de campo, o efeito da inoculação de novos isolados homólogos de bactérias diazotróficas endofíticas sob diferentes doses de nitrogênio, em duas localidades. Foram utilizados três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas (IAC-AT-8- *Azospirillum brasiliense*, IAC-HT-11- *Achromobacter insolitus*, IAC-HT-12- *Zoogloea ramigera*); e três doses de N, na forma de uréia (0, 60 e 120 kg ha<sup>-1</sup>). No experimento realizado em Mococa, no estágio de perfilhamento, na ausência de nitrogênio adicionado, o isolado IAC-HT-11 promoveu aumento na massa de matéria seca, houve um incremento na quantidade acumulada de N e um aumento do índice de eficiência de utilização do nitrogênio. Entretanto, somente houve aumento na produtividade de grãos, com este isolado, no experimento realizado em Campinas. Nas análises microbiológicas realizadas, houve influência da inoculação do isolado IAC-HT-12, em ambos os experimentos, ou seja, em Mococa houve aumento no C-biomassa, e, em Campinas, aumento na respiração basal do solo.

## Abstract

The aim of this study was to evaluate, on field conditions, the effect of inoculation of new homologous bacteria endophytic diazotrophic strains under different nitrogen doses. Three strains of diazotrophic bacteria (IAC-AT-8- *Azospirillum brasiliense*, IAC-HT-11- *Achromobacter insolitus*, IAC-HT-12- *Zoogloea ramigera*); and three levels of nitrogen fertilizer as urea (0, 60 e 120 kg ha<sup>-1</sup>) were tested. In Mococa experiment, at the tillering stage, the plants showed increase in dry matter, N accumulation and N-uptake efficiency in the absence of added N, with the strain IAC-HT-11. However, only in Campinas, this strain increased grain yield. In both experiments, the strain IAC-HT-12 affected the soil microbial

---

<sup>(1)</sup>Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, PUC Campinas, Campinas-SP. E-mail: ana\_mayumi@hotmail.com

<sup>(2,4)</sup>Instituto Agrônomo- IAC, Centro de Solos e Recursos Ambientais, CP-28, CEP-13010-970, Campinas, SP. E-mail: apdsil@iac.sp.gov.br

<sup>(3)</sup>Instituto Agrônomo- IAC, Centro de Grãos e Fibras. E-mail: jfreitas@iac.sp.gov.br

variables, increasing the microbial biomass carbon in Mococa, and, the soil respiration in Campinas.

## **Introdução**

Fertilizantes nitrogenados utilizados em plantas não leguminosas como o trigo constituem um dos mais altos custos da agricultura. Um elemento essencial para uma agricultura sustentável é o aproveitamento eficiente do N atmosférico.

De acordo com Bashand & Levanony (1990), aumentos em torno de 20%, atribuídos à presença de bactérias diazotróficas endofíticas, seriam considerados comercialmente significativos. Em artigo de revisão sobre 20 anos de inoculação de *Azospirillum* em experimentos de campo, os autores recomendam a implantação de um inoculante comercial, e concluem que é possível promover o aumento da produtividade em importantes culturas agrícolas, em diferentes solos e em diferentes regiões climáticas. Apesar de muitos anos de pesquisa, se observam ainda respostas muito variáveis. A falta de reprodutibilidade dos resultados ocorre até mesmo em ambientes mais controlados, como na casa de vegetação, o que limita a produção de um inoculante comercial (Dobbelaere et al., 2002).

Assim sendo, é de grande importância intensificar a realização de experimentos de campo, visando o desenvolvimento de práticas agrícolas para uma agricultura mais sustentável, entre elas a substituição, mesmo que parcial, do adubo nitrogenado por bactérias diazotróficas.

O objetivo desse trabalho foi avaliar, em condições de campo, o efeito da inoculação de isolados homólogos de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas de trigo em duas localidades, sob três níveis de adubação nitrogenada.

## **Material e métodos**

Os experimentos de campo foram instalados em 2006 no CEC do IAC/APTA e na Pólo APTA Noroeste Paulista, Mococa, ambos com irrigação por aspersão. O delineamento experimental utilizado foi de parcelas subdivididas ( $1,2 \times 24,0\text{m} = 28,8\text{m}^2$ ), com seis repetições, sendo na parcela três isolados de bactérias diazotróficas endofíticas, IAC-AT-8- *Azospirillum brasiliense*, IAC-HT-11- *Achromobacter insolitus* e IAC-HT-12- *Zoogloea ramigera*; e na sub-parcela três doses de N, na forma de uréia, 0, 60 e 120 kg ha<sup>-1</sup>. Esses isolados foram selecionados em razão do seu desempenho positivo em experimentos prévios (Sala, 2007). O genótipo de trigo empregado foi o IAC-370, *Triticum aestivum* hard L. Foi utilizada turfa em pó como carreador. As coletas foram realizadas no estágio de perfilhamento e de maturidade fisiológica. A massa de matéria seca foi obtida após secagem das plantas em estufa a 60°C com circulação de ar. Posteriormente, procedeu-se à moagem e homogeneização para determinação da concentração de N pelo método micro-Kjeldahl.

Por ocasião da colheita foi avaliada a produtividade de grãos. As amostras para as análises microbiológicas foram obtidas 40 dias após a semeadura, fase de perfilhamento das plantas. Foi coletado solo rizosférico na profundidade de 0-20 cm. As seguintes análises foram realizadas: 1. Análise da atividade microbiana: 1a. Análise da respiração basal do solo medida pelo CO<sub>2</sub> liberado, 1b. Quociente metabólico, calculado pela razão entre respiração basal e a biomassa microbiana, 1c. Atividade da enzima desidrogenase; 2. Análise do carbono da biomassa pelo método da fumigação-extração. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo programa Sanest, fazendo-se análise da variância seguida da comparação das médias pelo teste de Duncan a 5%. Para comparação entre doses de nitrogênio foram feitas regressões polinomiais.

## Resultados e Discussão

Em Mococa, no estágio de perfilhamento, na ausência de nitrogênio adicionado, houve um aumento na massa de matéria seca com o emprego do isolado IAC-HT-11 (Tabela 1). Isto pode indicar que está ocorrendo fixação biológica do nitrogênio na presença deste isolado, uma vez que, também houve um incremento na quantidade acumulada de N, e um aumento significativo do índice de eficiência de utilização do nitrogênio (Tabela 2).

**Tabela 1** – Matéria seca da parte aérea de plantas de trigo, no estágio de perfilhamento, do experimento de campo instalado em Mococa-SP, em função de três doses de N, sem e com inoculação de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas. Média de 6 repetições.

| Tratamentos | Doses de N, kg ha <sup>-1</sup> |   |        |       | Equação de Regressão              | R <sup>2</sup> |
|-------------|---------------------------------|---|--------|-------|-----------------------------------|----------------|
|             | 0                               | 60  | 120    | Média |                                   |                |
|             |                                 | Massa de matéria seca, g m linear <sup>-1</sup> |        |       |                                   |                |
| IAC-AT-8    | 10,1B                           | 21,8AB  | 29,9A  | 20,6A | y=10,71+0,166x                    | 0,99           |
| IAC-HT-11   | 15,3A                           | 18,6B   | 26,3AB | 20,1A | y=14,57+0,092x                    | 0,95           |
| IAC-HT-12   | 9,6B                            | 23,1A   | 27,5AB | 20,1A | y=9,65+0,30x-0,0013x <sup>2</sup> | 1,00           |
| TEST        | 7,9B                            | 21,0AB  | 23,9B  | 17,6B | y=7,9+0,30x-0,0014x <sup>2</sup>  | 1,00           |

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. As letras comparam os valores na vertical, entre os isolados dentro da mesma dose de N. Os coeficientes de variação relativos a isolados e doses foram 11,88 e 16,05, respectivamente.

Já, na maior dose de nitrogênio utilizada (120 kg ha<sup>-1</sup>), houve aumento da massa de matéria seca com o isolado IAC-AT-8, e também, aumento no índice de eficiência de utilização de nitrogênio, diferindo significativamente do tratamento testemunha. Muitas vezes os efeitos positivos propiciados pela inoculação de *Azospirillum* podem ser devido à produção de fitormônios e não pela fixação biológica do nitrogênio, e inclusive, já foi demonstrado que esse isolado produz AIA em cultura pura de células (Sala, 2007). Entretanto, independente da dose de nitrogênio utilizada, a inoculação promoveu aumento da massa de matéria seca

da parte aérea e do aproveitamento do nitrogênio.

**Tabela 2** – Quantidade acumulada e índice de eficiência de utilização do N de plantas de trigo, no estágio de perfilhamento, no experimento de campo instalado em Mococa-SP, em função de três doses de N, sem e com inoculação de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas. Média de 6 repetições.

| Tratamentos | Doses de N, kg ha <sup>-1</sup>                               |         |          |         | Equação de Regressão                | R <sup>2</sup> |
|-------------|---|---------|----------|---------|-------------------------------------|----------------|
|             | 0   | 60      | 120      | Média   |                                     |                |
|             | Quantidade acumulada, g m linear <sup>-1</sup>                |         |          |         |                                     |                |
| IAC-AT-8    | 0,23A   | 0,92A   | 1,29A    | 0,81A   | ns                                  |                |
| IAC-HT-11   | 0,40A   | 0,74A   | 1,12A    | 0,75A   | ns                                  |                |
| IAC-HT-12   | 0,22A   | 0,87A   | 1,24A    | 0,78A   | ns                                  |                |
| TEST        | 0,18A   | 0,9A    | 1,06A    | 0,71A   | ns                                  |                |
|             | Índice de eficiência, g <sup>2</sup> g m linear <sup>-1</sup> |         |          |         |                                     |                |
| IAC-AT-8    | 448,03B   | 525,75A | 711,32A  | 561,70A | y= 430,05+2,194x                    | 0,94           |
| IAC-HT-11   | 608,44A   | 472,80A | 643,20AB | 574,81A | y= 608,4+4,811x-0,042x <sup>2</sup> | 1,00           |
| IAC-HT-12   | 413,74B   | 623,03A | 608,73AB | 548,50A | y= 451+1,625x                       | 0,7            |
| TEST        | 340,50B   | 493,57A | 543,52B  | 459,20B | y= 340,5+3,410x-0,014x <sup>2</sup> | 1,00           |

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. As letras comparam os valores na vertical, entre os isolados dentro da mesma dose de N. Os coeficientes de variação relativos a isolados e doses foram para quantidade acumulada, 15,5 e 23,8; e, para o índice de utilização do N, 13,1 e 22,4, respectivamente.

No estágio de maturidade fisiológica, a inoculação não promoveu aumento na massa de matéria seca da parte aérea (dados não apresentados). Os efeitos benéficos propiciados pelos isolados IAC-HT-11 e IAC-AT-8, no estágio de perfilhamento, não resultaram em maior produtividade de grãos (dados não apresentados). Não houve efeito benéfico da inoculação na análise da atividade microbiana medida pela respiração basal e no quociente metabólico (dados não apresentados). Entretanto, observou-se aumento no carbono da biomassa, na ausência de nitrogênio, com o emprego do isolado IAC-HT-12 (Tabela 3), apresentando um ajuste linear decrescente em relação às doses de nitrogênio adicionadas.

**Tabela 3** – Análise do carbono da biomassa, no solo rizosférico, no experimento de campo instalado em Mococa-SP, em função de três doses de N, sem e com inoculação de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas. Média de 5 repetições.

| Tratamentos | Doses de N, kg ha <sup>-1</sup>         |          |         |         | Equação de Regressão               | R <sup>2</sup> |
|-------------|---|----------|---------|---------|------------------------------------|----------------|
|             | 0                                       | 60       | 120     | Média   |                                    |                |
|             | Biomassa-C, µgC g <sup>-1</sup> de solo |          |         |         |                                    |                |
| IAC-AT-8    | 187,5B                                  | 190,51B  | 197,03A | 191,60B | ns                                 |                |
| IAC-HT-11   | 178,00B                                 | 204,75AB | 191,85A | 191,53B | ns                                 |                |
| IAC-HT-12   | 237,34A                                 | 216,26AB | 204,20A | 219,26A | y=235,34- 0,27x                    | 0,98           |
| TEST        | 187,46B                                 | 228,58A  | 223,73A | 213,26A | y=187,46+1,06x-0,006x <sup>2</sup> | 1,00           |

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. As letras comparam os valores na vertical, entre os isolados dentro da mesma dose de N. Os coeficientes de variação relativos a isolados e doses foram 8,3 e 11,54, respectivamente.

No experimento realizado em Campinas, no estágio de maturidade fisiológica, independentemente da dose de nitrogênio empregada, houve aumento na matéria seca do colmo e folhas na presença do isolado IAC-HT-12 (Tabela 4), entretanto, somente os isolados IAC-AT-8 e IAC-HT-11 promoveram aumento na massa de matéria seca das espigas.

**Tabela 4** – Massa de matéria seca de plantas de trigo, no estágio de maturidade fisiológica, no experimento de campo instalado em Campinas-SP, em função de três doses de N, sem e com inoculação de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas. Média de 6 repetições.

| Tratamentos   | Doses de N, kg ha <sup>-1</sup> |        |         |         |
|---|---------------------------------|--------|---------|---------|
|   | 0                               | 60     | 120     | Média   |
| Massa de matéria seca (colmo + folha), g m linear <sup>-1</sup> |                                 |        |         |         |
| IAC-AT-8  | 38,18A                          | 34,94A | 38,33A  | 37,15B  |
| IAC-HT-11   | 35,12A                          | 44,15A | 34,54A  | 37,94B  |
| IAC-HT-12   | 37,52A                          | 51,7A  | 47,02A  | 45,41A  |
| TEST  | 34,14A                          | 40,72A | 41,1A   | 38,65B  |
| Massa de matéria seca (espiga, g m linear <sup>-1</sup> )       |                                 |        |         |         |
| IAC-AT-8  | 56,82A                          | 83,27A | 85,92A  | 73,34AB |
| IAC-HT-11   | 54,34A                          | 85,80A | 103,00A | 81,06A  |
| IAC-HT-12   | 53,37A                          | 87,46A | 78,22A  | 73,02BC |
| TEST  | 43,86A                          | 76,55A | 80,27A  | 66,90C  |

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. As letras comparam os valores na vertical, entre os isolados dentro da mesma dose de N. Os coeficientes de variação relativos a isolados e doses foram para matéria seca (colmo + folha), 10,16 e 22,1; matéria seca (espiga), 8,7 e 13,7, respectivamente.

A inoculação promoveu o aumento da produção de grãos, na maior dose de nitrogênio utilizada (Tabela 5). Entretanto, na ausência de nitrogênio, e também na dose 60 kg ha<sup>-1</sup>, o isolado IAC-HT-11 superou todos os demais tratamentos, sendo que, o mesmo efeito pode ser observado excluindo-se o fator doses de nitrogênio. Todos os tratamentos empregados apresentaram um ajuste linear ascendente em relação às doses de N adicionadas.

**Tabela 5** – Produtividade de plantas de trigo, do experimento de campo instalado em Campinas-SP, em função de três doses de N, sem e com inoculação de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas. Média de 6 repetições.

| Tratamentos                        | Doses de N, kg ha <sup>-1</sup> |        |       |       | Equação de Regressão              | R <sup>2</sup> |
|------------------------------------|---------------------------------|--------|-------|-------|-----------------------------------|----------------|
|                                    | 0                               | 60     | 120   | Média |                                   |                |
| Produtividade, kg ha <sup>-1</sup> |                                 |        |       |       |                                   |                |
| IAC-AT-8                           | 2046B                           | 3454AB | 4172A | 3224B | y=2046+29,22x-0,096x <sup>2</sup> | 1,00           |
| IAC-HT-11                          | 2568A                           | 3750A  | 4036A | 3451A | y=2568+27,17x-0,125x <sup>2</sup> | 1,00           |
| IAC-HT-12                          | 1983B                           | 3467AB | 4260A | 3236B | y=1983+30,5x-0,096x <sup>2</sup>  | 1,00           |
| TEST                               | 1832B                           | 3320B  | 3696B | 2949C | y=1832+34,06x+0,154x <sup>2</sup> | 1,00           |

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. As letras comparam os valores na vertical, entre os isolados dentro da mesma dose de N. Os coeficientes de variação relativos a isolados e doses foram 4,18 e 8,47, respectivamente.

Houve aumento da respiração basal do solo, na dose de 60 kg ha<sup>-1</sup> com a inoculação (Tabela 6). Entretanto, com a adição de 120 kg ha<sup>-1</sup>, ou, independentemente da dose de nitrogênio empregada, somente os isolados IAC-HT-11 e IAC-HT-12 promoveram aumento na respiração do solo.

Não houve efeito da inoculação na atividade microbiana avaliada pela atividade da enzima desidrogenase (dados não apresentados).

**Tabela 6** – Análise da atividade microbiana por respirometria do solo rizosférico, no experimento de campo instalado em Campinas-SP, em função de três doses de N, sem e com inoculação de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas. Média de 5 repetições.

| Tratamentos | Doses de N, kg ha <sup>-1</sup> |         |         |   | Equação de Regressão                 | R <sup>2</sup> |
|-------------|---------------------------------|---------|---------|---|--------------------------------------|----------------|
|             | 0                               | 60      | 120     | Média   |                                      |                |
|             |                                 |         |         | Respirometria, µg CO <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> |                                      |                |
| IAC-AT-8    | 31,48B                          | 35,41B  | 34,36B  | 33,75B  | ns                                   |                |
| IAC-HT-11   | 30,34A                          | 42,72A  | 42,95A  | 41,33A  | ns                                   |                |
| IAC-HT-12   | 37,84A                          | 40,33AB | 43,17A  | 40,44A  | y=37,78 + 0,044x                     | 1,00           |
| TEST        | 40,55A                          | 21,02C  | 36,68AB | 32,75B  | y=40,55 - 0,61x-0,0049x <sup>2</sup> | 1,00           |

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. As letras comparam os valores na vertical, entre os isolados dentro da mesma dose de N. Os coeficientes de variação relativos a isolados e doses foram 9,53 e 13,24, respectivamente.

### Referências Bibliográficas

- BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, v.36, p.591-605, 1990.
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, v.36, p.284-297, 2002.
- SALA, V.M.R. **Resposta da cultura do trigo aos novos endófitos, *Achromobacter* e *Zoogloea*, em condições de campo**. Tese de Doutorado, Esalq-USP, Piracicaba. 2007. 139p.