# ANÁLISE DE NOVOS ISOLADOS BACTERIANOS QUANTO À CAPACIDADE DE PROMOVER O CRESCIMENTO DO MILHO (*Zea mays*)

Venicios Vieira Gabre (BIC/Fundação Araucária/UEPG), Breno Augusto Moraes [1]
Laís Priscila Karas[2], Helio Antonio Wood Joris[6]
, Ângelo Rafael Bini[4], Leticia Reis[4], Eduardo Favero Caires[3], Carolina Weigert Galvão[5], Ricardo Antônio Ayub[6], Rafael Mazer Etto[7] (Orientador) email:

Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG
[1] Graduando em Agronomia; [2]Graduando em Farmácia [3]Departamento de Ciências do Solos e Engenharia Agrícola; [4]Doutourando em Agronomia ; [5]Departamento de Biologia Estrutural Molecular e Genética; [6]Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade; [7]Departamento de Química.

**Agronomia; Microbiologia e Bioquímica do Solo**

**Palavras-chave:** Fixação Biológica de Nitrogênio, Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal, Inoculantes, Microrganismos em plantas

## Resumo

O objetivo deste trabalho foi investigar a resposta do milho (*Zea mays*) à inoculação de diferentes bactérias em variados pHs do solo. O experimento foi realizado em casa de vegetação em delineamento inteiramente aleatorizado em esquema fatorial 2x9 (dois níveis de pH do solo 4,1 e 6,4,) e nove condições de inoculação: (I) sem nitrogênio e sem inoculação; (II) com nitrogênio em cobertura e sem inoculação; sem nitrogênio e com inoculação de (III) *Azospirillum brasilense* AbV5/ AbV6; (IV) *Rhizobium* sp. B3D; (V) *Psedomonas* sp H2D; (VI*) Enterobacter* sp. 11V22; (VII) *Acinetobacter* sp. 10N4; (VIII) *Burkloderia* sp. 1P31 e o (IX) chamado de coquetel que no caso é a inoculação simultânea dos isolados em um mesmo tratamento. As bactérias do tratamento III são BPCV comerciais e as demais, são potenciais BPCV isoladas no Laboratório de Biologia Molecular Microbiana da UEPG. Aos 55 dias após semeadura do milho, foram coletados dados biométricos de altura, massa fresca e massa seca da parte aérea. Os resultados confirmam o potencial dos gêneros *Pseudomonas* sp. e *Azospirillum brasilense* na promoção do crescimento vegetal.

## Introdução

Um dos grandes desafios do século XXI será alimentar aproximadamente 10 bilhões de pessoas em 2050 e ao mesmo tempo reduzir o impacto ambiental e os custos da produção agrícola (FOLEY et al., 2011).

A produção de milho no Brasil para a safra 2016/17 está estimada em 84 milhões de toneladas. O Paraná é o segundo maior produtor de milho e estima-se que a produção paranaense 2016/17 será superior a 17,5 milhões toneladas (SEAB, 2017). A importância do milho esta na sua ampla utilização, que vão desde a alimentação humana, animal até a indústria de alta tecnologia. O uso de milho como alimentação animal representa a maior parte, sendo que no Brasil, de 70% a 90% da

produção, é inserida na cadeia produtiva do leite, de ovos e da carne bovina, suína e aves (PINAZZA et al., 2007). Desta forma, considerando-se a importância do estado do Paraná como produtor de milho e a escassez de inoculantes para cultura, a descoberta de novas bactérias promotoras de crescimento vegetal é urgente e imperativa.

**Materiais e Métodos**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular Microbiana da UEPG (LABMOM) em parceria com o Laboratório de Fertilidade do Solo da UEPG. No início das atividades foi realizado o preparo do meio de cultura DYGS líquido e sólido para crescimento e mensuração da velocidade de crescimento em $1x10^9$ UFC $ml^{-1}$ exigido pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Na sequência preparou-se um Cambissolo Háplico para o cultivo das plantas. O solo foi peneirado e separado em 2 partes onde a segunda parte de solo recebeu uma dose de calcário de (1,27g/kg) (PRNT 80,5%) para elevar o pH a faixa de 6,4 (saturação por base em 70%). A primeira parte do solo não recebeu adição de calcário permanecendo com o pH 4,1 (V em 15,5%). Passado um mês após adição do calcário (período de reação) o solo foi colocado em vaso de 5 $dm^3$ obtendo-se 36 vasos para cada faixa de pH.

No dia da semeadura do milho foi realizado no laboratório o crescimento dos isolados em meio DYGS. Em seguida, os isolados crescidos, já na concentração de no mínimo $1x10^9$ UFC/mL, foram inoculados nas sementes de milho (*Zea mays*) caracterizadas como grão alaranjado duro liso, melhorado pela UEPG, assim como o inoculante comercial utilizado como tratamento padrão, seguindo as seguintes recomendações:

- *Azospirillum brasilense* (inoculante comercial para milho): Dose de 100 mL para cada 25 kg de semente de milho. Portanto, para cada 56 sementes utilizaram-se 0,064mL do inoculante.
- Nos tratamentos com isolados, para cada 56 sementes utilizaram-se 0,067mL do inóculo (bactérias na concentração crescidas em meio DYGS) + 0,08mL de solução com açúcar.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente aleatorizado em fatorial 2x9 (dois níveis de acidez do solo - 4,1 e 6,4, e nove condições de inoculação) com um total de 18 tratamentos com quatro repetições cada, sendo: (I) sem nitrogênio e sem inoculação; (II) com nitrogênio em cobertura e sem inoculação; sem nitrogênio e inoculação de (III) *Azospirillum brasilense* AbV5/ AbV6; (IV) *Rhizobium sp.* B3D; (V) *Psedomonas sp*. H2D; (VI) *Enterobacter sp*. 11V22; (VII) *Acinetobacter sp*. 10N4; (VIII) *Burkholderia sp*. 1P31 e o (IX) chamado de coquetel que no caso é a inoculação simultânea dos isolados do laboratório em um mesmo tratamento (*Rhizobium sp.* B3D; *Psedomonas sp* H2D; *Enterobacter sp*. 11V22; *Acinetobacter sp.* 10N4; *Burkholderia sp*. 1P31).

Em cada vaso foram semeadas 7 sementes, a uma profundidade de 5 cm e após 15 dias da emergência foi realizado o desbaste deixando apenas uma planta por vaso. Aos 16 dias após a germinação o tratamento 2 (com nitrogênio em cobertura), recebeu aplicação do nitrogênio na forma de nitrato de amônia, para cada vaso aplicou-se 1,6g de nitrato de amônia. Após 55 dias da semeadura foi feita a coleta de dados de altura de planta, peso da massa fresca da parte aérea. Em seguida as partes aéreas foram pesadas para mensurar massa fresca, identificadas

e levadas à estufa de secagem em temperatura de 40° C para posterior coleta dos dados de massa seca da parte aérea. Os dados foram submetidos à Análise de Variância – ANOVA, e quando significativo as médias foram comparadas pelo Teste SNK (Student, Newman, Keuls).

**Resultados e Discussão**

As plantas de milho inoculadas não apresentaram interação significativa quando submetidos em teste de Análise de Variância (ANOVA) entre os fatores pH e tratamentos, portanto, as variáveis foram analisadas comparando os tratamentos dentro de cada nível de pH do solo. As características biométricas que apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) entre média foram: Altura de planta, Massa fresca parte aérea e massa seca parte aérea. Para a variável altura na média geral dos pHs os tratamentos inoculados com *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas sp.* e N em cobertura apresentaram médias superiores ao tratamento Sem N e sem bactéria com ($p<0,05$) de significância quando submetido ao teste de separação de médias. Cardoso et al. (2008) em trabalho realizado em casa de vegetação observou aumentos na altura de plantas de milho inoculadas com bactérias do gênero *Pseudomonas*.

Quando comparado as inoculações em cada pH para variável altura o tratamento com N em cobertura foi superior a média do tratamento sem N e sem bactérias através do teste de médias a $p<0,05$ de significância.

Na massa fresca parte aérea a inoculação com *Rhizobium sp.* teve média inferior significativa ($p<0,05$) ao tratamento com N em cobertura. Na massa fresca parte aérea no milho cultivado em solo de pH 4,1a inoculação com *Rhizobium sp.* teve média inferior ao tratamento com N em cobertura.

Para a variável massa seca da parte aérea houve destaque para os tratamentos N em cobertura, *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas sp.*, apresentando médias superiores ($p<0,05$) em relação ao tratamento sem N e sem bactéria. Como relatado em vários trabalhos o uso de *Azospirillum brasilense* destaca-se por aumentar a biomassa e altura (HUNGRIA, 2010; VOGEL et al., 2013). No milho inoculado com *Rhizobium sp.* houve baixa influência na promoção do crescimento diferindo do relato de Zamariolli (2016) que observou valor de massa seca de parte aérea superior ao tratamento com NPK quando o milho foi inoculado com *Rhizobium sp.* em experimento em casa de vegetação.

Quando foi avaliado a massa seca da parte aérea em solo com pH 4,1 o tratamento com N em cobertura apresentou média superior significativa ($p<0,05$) em relação ao tratamento sem N e sem bactéria.

**Conclusões**

Os tratamentos que proporcionaram médias superiores em massa seca e altura das plantas foram inoculados com *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas sp.*. Esses resultados indicam potencial do isolado *Pseudomonas sp.* para promoção de crescimento do milho podendo ser empregados na produção de biofertilizantes futuramente.

**Agradecimentos**

A fundação Araucária, CNPq e INCT/MCT pelo suporte financeiro e à nossa equipe e Professores do Laboratório de Biologia Molecular Microbiana da UEPG (LABMOM) e a equipe do Laboratório de Fertilidade do Solo da UEPG.

**Referências**

CARDOSO, I. C. M. et al. Resposta de milho (Zea mays L.) precoce à inoculação de rizobactérias em casa-de-vegetação. **28ª Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, 12ª Reunião Brasileira sobre Micorrizas, 10º Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo, 7ª Reunião Brasileira de Biologia do Solo, Londrina. Anais, Fertibio**, 2008.

FANCELLI, A.L. Boas práticas para o uso eficiente de fertilizantes na cultura do milho. Piracicaba: **IPNI - International Plant Nutrition Institute Brazil**, 2010. 16p. (IPNI. Informações Agronômicas, 131).

FOLEY, Jonathan A. et al. Solutions for a cultivated planet. **Nature**, v. 478, n. 7369, p. 337-342, 2011.

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, pp.413-425, 2010.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13** de 24 de Março de 2011. 18 p.

PINAZZA, L. A. Panorama do mercado nacional. In: PINAZZA, L. A. **Cadeia Produtiva do Milho / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Vol 1. Brasília -DF, 2007.Disponível em : <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=122614&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22PINAZZA,%20L.A.%22&qFacets=autoria:%22PINAZZA,%20L.A.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>Acesso em :05 Maio.2016

SEAB; DERAL. Estimativa de safra. Curitiba, PR, 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=240

VESSEY, Joseph Kevin. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.

VOGEL; G. F.; MARTINKOSKI,L.; MARTINS , P. J.; BICHEL, A. Desempenho agronômico de azospirillum brasilense na cultura do arroz: uma revisão. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.6, n.3, p. 567-578, 2013.

ZAMARIOLLI, L. E. R. **Inoculação de pseudomonas via semente e eficiência agronômica de fosfatos na cultura do milho**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.