

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

mestrado

BC/49495

IB/ 81788

INSTITUTO DE BIOLOGIA



**ATIVIDADE E ALGUNS COMPONENTES DA COMUNIDADE MICROBIANA
DO SOLO E MICRORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS ENDOFÍTICOS
SOB INFLUÊNCIA DO NITROGÊNIO NA CULTURA DO MILHO**

VANESSA POLON DONZELI
Bióloga

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Vanessa Polon Donzeli
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada à Universidade Estadual
de Campinas, para a obtenção do título de
Mestre em Genética e Biologia Molecular,
Área de concentração em Microbiologia.

CAMPINAS
Estado de São Paulo
2002

UNIDADE I-B
 Nº CHAMADA 16.837/0
 V EX
 TOMBO BCI 49495
 PROC 16.837/0
 C DX
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA _____
 Nº CPD _____

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

31/12/02

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

D719a **Donzeli, Vanessa Polon**
 Atividade e alguns componentes da comunidade microbiana do solo e
 microrganismos diazotróficos endofíticos sob influência do nitrogênio
 na cultura do milho/Vanessa Polon Donzeli.--
 Campinas, SP:[s.n.], 2002

Orientadora: Sueli dos Santos Freitas
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia

1.Micorriza. 2.Fixação de nitrogênio. 3.Nitrificação. I. Freitas, Sueli dos
 Santos. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
 III. Título.

Data da Defesa: 05/03/2002

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Sueli dos Santos Freitas (orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Maria Luíza C. O. Lombardi



Assinatura

Profa. Dra. Marlene Schiavinato



Assinatura

Profa. Dra. Elke J. B. N. Cardoso

Assinatura

Aos meus pais, Pedro e Helena, pelos valores transmitidos, com muito amor e gratidão,

DEDICO.

Com muito carinho, pelo apoio e compreensão, à Camila e ao Sérgio,

AGRADEÇO.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Sueli dos Santos Freitas pela orientação competente deste trabalho e, acima de tudo, pela amizade e dedicação.

Às Dras. Adriana P. D. da Silveira e Maria Luíza C. O. Lombardi pela amizade e valiosas sugestões apresentadas à elaboração e discussão deste trabalho.

Aos Drs. José Guilherme de Freitas e Paulo B. Gallo, responsáveis pelos experimentos de campo, pela atenção e apoio.

Aos Drs. Heitor Cantarella, Maria Elisa A. G. Z. Paterniani, Pedro R. Furlani, Angela M. C. Furlani, e Ricardo M. Coelho pelas muitas sugestões.

À Dra. Vera L. D. Baldani pelos ensinamentos prestados.

Ao Instituto Agrônômico pela acolhida e uso dos laboratórios.

À Universidade Estadual de Campinas pela oportunidade do treinamento.

À FAPESP pelo indispensável apoio financeiro.

Às empresas EMBRAPA, CARGILL e Dow Agrosience (Dinamilho Carol) pelo fornecimento de sementes de milho e ao Eng^o. Agr^o. Renato Donzelli Neto pela ajuda na sua obtenção.

E, com carinho especial, a todas as amigas da Microbiologia do Solo pela oportunidade de convivência amiga e respeitosa: às funcionárias Maria Tereza B. Mangussi, Rosana G. Gonçalves e Maria Leonilde M. de Souza pela competência e presteza e às colegas Deise, Mirela, Valéria, Carol, Drica, Bia, Sara, Márcia, Marinês, Silvana, Karina e Soraya pela ajuda e amizade em todos os momentos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	x
I.INTRODUÇÃO.....	1
II.REVISÃO DE LITERATURA.....	4
II.1 Influência do Manejo na Comunidade Microbiana do Solo.....	5
II.2 Bactérias Diazotróficas Endofíticas.....	10
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
III.1 Experimento de Campo.....	18
III.1.1 Quantificação de Amônio e Nitrato do Solo e de Microrganismos Envolvidos na Ciclagem do Nitrogênio no Solo.....	19
III.1.2 Análise da Atividade Microbiana por Respirimetria.....	21
III.1.3 Análise do Carbono, Nitrogênio e Relação entre C e N da Biomassa Microbiana do Solo.....	21
III.1.4 Quantificação de Esporos de Fungos Micorrízicos Arbusculares e Colonização Micorrízica.....	23
III.1.5 Quantificação e Isolamento de Bactérias Diazotróficas Endofíticas.....	24
III.2 Experimento em Casa de Vegetação.....	26
III.3 Análise Estatística.....	28
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
IV.1 Experimento de Campo.....	30
IV.1.1 Quantificação de Amônio e Nitrato do Solo e de Microrganismos Envolvidos na Ciclagem do Nitrogênio no Solo.....	30
IV.1.2 Análise da Atividade Microbiana por Respirimetria.....	38
IV.1.3 Análise do Carbono, Nitrogênio e Relação entre C e N da Biomassa Microbiana do Solo.....	40
IV.1.4 Quantificação de Esporos de Fungos Micorrízicos Arbusculares e Colonização Micorrízica.....	47

IV.1.5	Quantificação e Isolamento de Bactérias Diazotróficas Endofíticas.....	52
IV.2	Experimento em Casa de Vegetação.....	63
V.	CONCLUSÕES.....	71
VI.	BIBLIOGRAFIA CITADA.....	72

**ATIVIDADE E ALGUNS COMPONENTES DA COMUNIDADE MICROBIANA
DO SOLO E MICRORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS ENDOFÍTICOS
SOB INFLUÊNCIA DO NITROGÊNIO NA CULTURA DO MILHO**

Aluna: Vanessa Polon Donzeli

Orientadora: Dra. Sueli dos Santos Freitas

RESUMO

Devido à importância da cultura do milho para o Brasil e o mundo e levando-se em consideração que o nitrogênio é o macronutriente mais limitante para essa cultura, o presente trabalho teve o objetivo de estudar a atividade e parte da comunidade microbiana do solo sob cultivo de três genótipos de milho (BR3123, C333b e DINA766) e adubado com três doses de uréia (0, 90 e 210 kg N ha⁻¹). Utilizaram-se amostras de solo e de raízes de experimento de campo para a avaliação das seguintes variáveis: números de microrganismos amonificadores, nitritadores e nitratores, teor de amônio e nitrato no solo, carbono e nitrogênio da biomassa microbiana, liberação de CO₂ do solo, número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), colonização micorrízica das raízes de milho e números de bactérias cultivadas em meios de cultura semi-específicos para crescimento de *Azospirillum* spp., *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. Efetuou-se também o isolamento das bactérias presentes nesses três meios de cultura, para a obtenção de isolados de bactérias diazotróficas endofíticas, que foram testados quanto à eficiência nos respectivos genótipos de origem em casa de vegetação.

Não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos para o teor de NH₄⁻ no solo e para os números de microrganismos amonificadores e nitratores. No entanto, o número de microrganismos nitritadores apresentou-se linearmente menor com o aumento da dose de N aplicada e foi maior no solo sob o cultivo do genótipo de milho

BR3123. O teor de nitrato no solo apresentou regressão linear positiva com a dose de N aplicada.

Os resultados da análise de respirometria não mostraram diferenças significativas na quantidade de CO_2 liberado nos diferentes tratamentos. Já os valores de carbono da biomassa microbiana apresentaram regressão linear positiva às doses de N e foram maiores no solo sob cultivo do genótipo BR3123. Esses valores também se apresentaram maiores para o genótipo BR3123 na interação com a maior dose de N aplicada. O nitrogênio da biomassa microbiana não diferiu significativamente entre os tratamentos, porém a relação C/N da biomassa microbiana apresentou regressão linear positiva em relação a dose de N aplicada e foi maior no solo sob cultivo do genótipo BR3123 na maior dose de N aplicada. A quantidade de esporos de FMAs presentes no solo apresentou-se linearmente menor com o aumento da dose de N aplicada. No entanto, a colonização radicular por esses fungos foi alta em todos os tratamentos e não se apresentou diferente entre eles. Esses valores de colonização radicular por FMAs não tiveram correlação com os números de bactérias diazotróficas presentes nas raízes das plantas. Não houve diferenças significativas no número de bactérias quantificadas nos meios de cultura NFb, JNFb e LGI-P entre os tratamentos. Foram isoladas bactérias dos gêneros *Azospirillum* spp. (45 isolados) e *Herbaspirillum* spp. (17 isolados) sendo que não houve ocorrência de bactérias do gênero *Gluconacetobacter diazotrophicus* nas raízes dessas plantas. Apenas o isolado HM-1 do genótipo BR3123 resultou em um aumento significativo da matéria seca da parte aérea. O isolado AM-12A do genótipo DINA766 promoveu um aumento significativo no teor do nitrogênio da parte aérea e a inoculação do AM-13C resultou em um aumento significativo do teor de N acumulado na parte aérea da planta, mas nenhum deles conseguiu isentar as plantas dos sintomas de deficiência de nitrogênio.

SUMMARY

Maize is an important crop for Brasil and nitrogen it's most limitant nutrient. Therefore, this work was carried out to study the microbial activity and part of the microbial community of the soil under maize crop (genotypes BR3123,C333b and DINA766) treated with different rates of urea-N (0, 90 and 210 kg N ha⁻¹).

Soil and roots were sampled from a field experiment to estimate the following parameters: number of ammonifying and nitrifying microorganisms, soil ammonium and nitrate, nitrogen and carbon in the microbial biomass, basal respiration, arbuscular micorrhizal fungi (AMF) sporulation and mycorrhizae colonization, number of bacteria grown in selective media for nitrogen-fixing bacteria *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp., and *Gluconacetobacter diazotrophicus*. The bacteria grown in three media were isolated and tested for the interaction with plants in a greenhouse experiment.

There were no significant differences among the treatments for soil extrable ammonium and number of ammonifying microorganisms. However, the number of nitrifying microorganisms was significantly lower for the higher rate of N applied, and was higher in the plants grown with the maize genotype BR3123. Soil nitrate content increased with the increasing rates of N applied.

There was no significant difference among the treatments for the CO₂ evolved. Nevertheless, the values of microbial biomass C increased with rates and were higher for the maize genotype BR3123. Nitrogen in the microbial biomass was not affected by the treatment, however the C/N ratio of the microbial biomass was higher with the increase of the N level. This ratio was also higher in the soils under the genotype BR3123. The higher the rate of N fertilizer decreased the number of AMF spores. However, the micorrhizal colonization was high in all treatments and was not correlated with the number of diazotrophic bacteria found in the roots, grown in the selective media, which were not affected by the treatments. *Azospirillum* spp. (45 isolates) and *Herbaspirillum* spp. (17 isolates) were isolated from maize roots, but *Gluconacetobacter diazotrophicus* could not be found. The HM-1 isolated from maize genotype BR3123

contributed to increase the shoot dry matter, and the AM-12A and AM-13C isolated from DINA766 promoted an increase in the shoot N content, but neither were able to relieve the N-deficiency symptoms of unfertilized maize plants.

I. INTRODUÇÃO

Há uma crescente demanda mundial por alimentos e pelo desenvolvimento industrial dos países subdesenvolvidos.

O milho é um alimento de considerável importância para milhões de pessoas, sendo que na América do Sul, Ásia e África muitas vezes representa a principal fonte alimentar. O milho é o cereal que apresenta maior número de produtos industrializados e possui um alto conteúdo de carboidratos (70%), principalmente amido, assim como outros componentes, tais como proteínas (10%), óleo e vitaminas (Tosello, 1987).

A produtividade de grãos é o resultado da interação entre o potencial genético dos cultivares e o ambiente. Além da redução causada por doenças, insetos e plantas daninhas, as deficiências de nitrogênio e fósforo, a toxicidade de alumínio e também o excesso ou a falta de água no solo são fatores comumente limitantes à produtividade do milho. É de conhecimento que mais de 80% da produção de milho no Brasil é oriunda de regiões com algum tipo de estresse ambiental e que mais de 70% dessa produção é realizada por pequenos e médios agricultores, envolvendo uma área superior a 3 milhões de hectares na América do Sul (Pereira, 1995).

A adequação da cultivar ao ambiente e/ou a melhoria das condições ambientais para suprir as exigências do genótipo permitem maximizar a exploração do potencial genético das sementes comercializadas e, no primeiro caso, proporcionam aumento da produtividade sem alterar custos (Duarte & Paterniani, 2000).

O milho tem se destacado entre as graníferas por ser a primeira em área e volume de produção no País, pela participação preponderante das empresas privadas na pesquisa, produção e comercialização de sementes melhoradas. No entanto, a maioria dos programas de melhoramento de plantas que visam aumentos de produção utilizam altas quantidades de fertilizantes (Pereira, 1995). Fertilizantes nitrogenados utilizados em plantas não leguminosas como o milho constituem um dos mais altos custos na agricultura, além de que o excesso de nitrogênio no solo é normalmente perdido por

lixiviação, o que constitui um risco potencial à saúde como consequência da contaminação do lençol freático com nitrato e pode, também, aumentar a emissão de N_2O para a atmosfera, sendo essa uma grande fonte de poluição ambiental dos sistemas agrícolas (Machado et al., 1998). Nessas condições, de aplicação excessiva de fertilizantes, a colonização por microrganismos economizadores de nutrientes e seus efeitos no hospedeiro são mínimos ou antagônicos, geralmente não sendo considerados ou monitorados pelos melhoristas de plantas. No entanto, a redução de aplicações de fertilizantes nitrogenados deve ser considerada como fator importante para o desenvolvimento de uma agricultura favorável ao meio ambiente (Reis et al., 2000). Assim, o potencial de utilização de microrganismos no desenvolvimento e nutrição mineral das plantas deve ser considerado em programas de melhoramento para maximizar a eficiência de utilização de nutrientes em culturas que demonstrem variabilidade na colonização ou na resposta à infecção por microrganismos benéficos.

O nitrogênio constitui o macroelemento mais limitante na produtividade do milho, determinando aumento no peso e número de espigas, sendo que pequenas doses do elemento aplicadas precocemente aumentam o número de grãos por espiga (Malavolta & Dantas, 1987). O ciclo do N no solo é controlador da disponibilidade de nitrogênio para a nutrição de plantas. Apesar de sua grande importância, nota-se que pouca atenção tem sido dada aos estudos de transformação de N nos solos, sendo que maior atenção tem sido voltada para estudos de fixação biológica de N_2 (Victoria et al., 1992).

Entre os sistemas biológicos capazes de aproveitar o nitrogênio diretamente da atmosfera, a simbiose rizóbio-leguminosas é o sistema mais especializado. No Brasil, salienta-se a importância econômica da fixação biológica do nitrogênio com o exemplo da soja, que dispensa totalmente a adubação nitrogenada sem causar perda de produtividade. Um dos grandes interesses dos pesquisadores é a extensão desses processos biológicos para outras culturas, como gramíneas forrageiras e cereais, especialmente os de grande importância sócio-econômica.

Desde a descoberta de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas à cana de açúcar por Döbereiner e colaboradores (1975) citada por Baldani et al. (1997), foi

demonstrado o enorme potencial de bactérias endofíticas diazotróficas em aumentar a biomassa de gramíneas na ausência de fertilizantes nitrogenados, principalmente em plantas de via fotossintética C₄, que em condições favoráveis podem capturar duas vezes ou mais a energia solar em relação às plantas C₃ (Reis et al., 2000). Durante os últimos vinte anos novas bactérias fixadoras de nitrogênio vêm sendo isoladas e identificadas, incluindo espécies dos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*, graças à elucidação dos mecanismos de funcionamento da nitrogenase. Essas bactérias não possuem mecanismos de proteção ao oxigênio, demonstrando maior eficiência na utilização de fontes de carbono para fixação de N₂, devido ao fato de serem endofíticas (Döbereiner et al., 1995).

O solo representa um sistema heterogêneo que permite o desenvolvimento de grande diversidade de microrganismos, cujo equilíbrio é afetado por fatores bióticos e abióticos do ambiente. Ocorrem interações entre microrganismos do solo na rizosfera das plantas, mas que são relativamente pouco estudadas, como por exemplo a dos fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas.

O presente trabalho teve por objetivos: estudar a atividade e a comunidade microbianas do solo sob influência do nitrogênio e diferentes genótipos de milho e, mais especificamente, os microrganismos diazotróficos endofíticos e seus possíveis benefícios ao desenvolvimento das plantas.

II. REVISÃO DE LITERATURA

O milho destaca-se entre as graníferas por ser uma das primeiras em área cultivada e volume de produção no país e pela participação preponderante das empresas privadas na pesquisa, produção e comercialização de sementes melhoradas (Duarte & Paterniani, 1998).

As necessidades nutricionais de qualquer planta determinam a quantidade de nutrientes que extrai durante o seu ciclo. Dentre os nutrientes, a importância do nitrogênio se sobressai quando o sistema de produção agrícola passa de extrativo, com baixas produções por unidade de área, para uma agricultura intensiva e tecnificada, com o uso de irrigação (Coelho & França, 1995). O nitrogênio constitui o macroelemento mais limitante na produtividade do milho, determinando aumento no peso e número de espigas, sendo que pequenas doses do elemento aplicadas precocemente aumentam o número de grãos por espiga (Malavolta & Dantas, 1987).

No que se refere à exportação dos nutrientes nos grãos, 75% do nitrogênio é translocado para as sementes, resultando, segundo Yamada (1995), em aproximadamente 20 a 25 kg de nitrogênio exportados em cada tonelada de grãos.

Com relação ao nitrogênio, o milho apresenta dois períodos de máxima absorção, durante as fases de desenvolvimento vegetativo e reprodutivo ou formação de espiga, e menores taxas de absorção no período compreendido entre a emissão do pendão e início da formação da espiga (Coelho & França, 1995).

No solo, o nitrogênio encontra-se nas formas orgânica (matéria orgânica já incorporada ao solo e resíduos das culturas), mineral (na solução do solo e adsorvido às argilas) e gasosa (nos poros do solo). A passagem de uma forma para a outra dá-se principalmente pela atividade microbiana (Yamada, 1995; 1996).

As principais formas de nitrogênio disponíveis no solo para as plantas são amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-), as quais representam menos que 2% do nitrogênio total

do solo. Considerando-se que quase todo o nitrogênio do solo faz-se presente na forma orgânica, é importante considerar também o nitrogênio que seria mineralizado durante o ciclo da cultura (Coelho & França, 1995).

II.1 Influência do Manejo na Comunidade Microbiana do Solo

É de conhecimento geral o papel que as populações de microrganismos exercem na manutenção da fertilidade do solo, armazenando temporariamente em sua biomassa nutrientes como nitrogênio, fósforo e enxofre, assim como participando do processo de ciclagem dos nutrientes na matéria orgânica, importante fator de produtividade (Grisi, 1984; Cerri et al., 1992). Os resíduos orgânicos incorporados ao solo sofrem o ataque de microrganismos quimiorganotróficos para dar atendimento às suas necessidades metabólicas na formação de seus constituintes protoplasmáticos. Durante esse processo, normalmente ocorrem liberação de CO_2 para a atmosfera e oscilações no balanço de nitrogênio do solo, dentre outras reações. Medições das variações da comunidade microbiana, da liberação de CO_2 e das concentrações de amônio e nitrato são utilizadas como parâmetros indicadores da vida microbiana do solo (Nuernberg et al., 1984). A maior liberação de CO_2 é devida à maior atividade biológica, que por sua vez, está relacionada com o C do solo e, ou, da biomassa microbiana (Balota et al., 1998). A imobilização do nitrogênio por microrganismos ocorre principalmente com o NH_4^+ ; no entanto, se essa forma não está disponível, a forma NO_3^- é assimilada na presença de carbono disponível. Não se sabe muito sobre a competição entre raízes de plantas, processos de perdas e imobilização pelos produtos da mineralização, mas o processo de mineralização é fundamental, e reflete as propriedades do substrato e sua interação com o ambiente (Jarvis et al., 1996).

A mineralização do nitrogênio no solo (amonificação e nitrificação) é um processo essencialmente microbiano. A amonificação pode ser definida como a liberação da amônia (NH_3) de compostos orgânicos nitrogenados ($\text{R-N}_2 \rightarrow \text{NH}_4^+$), que

são usados por um grupo diversificado de microrganismos quimiorganotróficos como fonte de carbono e nitrogênio, sendo uma etapa importante no ciclo do nitrogênio no solo, porque torna disponível esse elemento às plantas. Os invertebrados existentes no solo também são de grande contribuição para a ocorrência da mineralização, pois são responsáveis pela redistribuição de matéria orgânica no solo, pelo aumento da taxa de ciclagem, mudando quimicamente o meio durante seu metabolismo e tendo efeito direto sobre as populações de microrganismos, criando e removendo condições apropriadas para a sua atividade.

A nitrificação (quimiolitotrófica) é uma etapa importante que sucede a amonificação do nitrogênio. É intermediada por dois grupos de bactérias Gram negativas aeróbias da família Nitrobacteriaceae, que oxidam o NH_4^+ a NO_3^- , embora grupos de microrganismos quimiorganotróficos também tenham sido relatados, principalmente em solos ácidos. Como oxidantes do amônio do solo ($2\text{NH}_4^+ + 3\text{O}_2 \rightarrow 2\text{NO}_2^- + 4\text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$), os gêneros de bactérias quimiolitotróficas identificadas são: *Nitrosomonas*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* e *Nitrosobrio*, enquanto a oxidação do nitrito a nitrato ($2\text{NO}_2^- + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{NO}_3^-$) apenas o gênero *Nitrobacter* é conhecido (Andrade et al., 1994).

A transformação de NH_4^+ (relativamente imóvel) a formas mais móveis, NO_3^- e NO_2^- , propicia um passo fundamental no ciclo do N, conduzindo freqüentemente a um excesso de NO_3^- e subsequente perda de N por lixiviação ou denitrificação. A nitrificação depende de vários fatores, como a aeração do solo, o valor de pH, o tipo de substrato e principalmente as populações apropriadas de microrganismos. A nitrificação também pode ser fortemente influenciada pela adição de N mineral como fertilizante (Jarvis et al., 1996).

As mudanças nas populações dos microrganismos causadas pelo manejo do solo também poderão ser facilmente avaliadas pela estimativa da biomassa dos microrganismos (Grisi, 1984). A biomassa presente no solo compreende dois grupos de organismos, as espécies autóctones, que se mantêm em baixa e relativamente constante atividade e as espécies zimógenas, as quais reagem rapidamente ao acréscimo de substratos que podem ser metabolizados e retornam à dormência. A existência desses

dois tipos de populações tem sido usada para explicar as dinâmicas de C e N durante a decomposição da matéria orgânica (Jarvis et al., 1996).

Os trabalhos envolvendo análise da biomassa microbiana do solo podem fornecer informações extremamente úteis sobre a dinâmica de um reservatório lábil da matéria orgânica do solo. Isso pode ter conseqüências importantes no funcionamento do ecossistema e na qualidade do solo, refletindo-se, a longo prazo, na produtividade (Wardle, 1994).

A medida da atividade microbiana ou de sua biomassa pode ser realizada por diversos métodos, como, por exemplo, a medida de respiração pela liberação de CO₂; fumigação, para a avaliação da biomassa de carbono; extração e determinação de ATP; e observação e contagem direta dos microrganismos (Grisi, 1984).

Nuernberg et al. (1984) determinaram que as adubações mineral e organomineral foram mais efetivas quanto ao aumento do número de bactérias e actinomicetos e na sua atividade do que a orgânica, sendo que os incrementos na comunidade e atividade microbiana foram relacionados com a quantidade de restos culturais provenientes dos diferentes tipos de adubação. Em geral, o tratamento sem adubação apresentou menor densidade populacional e menor atividade microbiana em três diferentes sucessões de culturas.

Em um trabalho envolvendo diferentes sistemas de preparo de solo e sucessão de culturas, Balota et al. (1998) verificaram que a prática do plantio direto promoveu maiores valores de biomassa microbiana e respiração basal do que o plantio convencional.

Em um estudo de avaliação da resposta da soja e do carbono da biomassa microbiana do solo à incorporação de resíduos de cinco genótipos de sorgo, Vasconcellos et al. (1999) relataram que alguns resíduos culturais de sorgo afetaram, independentemente do estágio de colheita, o desenvolvimento da soja, a absorção de N, o peso de nódulos e a biomassa microbiana do solo. Tais efeitos também variaram com o método de incorporação do resíduo. O teor de carbono imobilizado pela biomassa foi maior quando os resíduos de sorgo foram distribuídos na superfície do solo. Paré et al. (2000) também demonstraram que o tipo de resíduo utilizado como fonte de nitrogênio

influencia fortemente a taxa de mineralização e que a mineralização do N também é maior na presença de raízes vivas, ou seja, quando há plantas em crescimento.

Lupwayi et al. (1998) demonstraram que o cultivo convencional reduziu significativamente a diversidade de bactérias no solo sob cultura de trigo, aumentando a predominância de poucos grupos de microrganismos e reduzindo a fertilidade do solo. Esses efeitos foram mais pronunciados no segundo ano de cultivo, sendo a diversidade mais influenciada em profundidade. Esses resultados indicam que a rotação de culturas permite aumento na diversidade das comunidades microbianas no solo e pode afetar a sustentabilidade dos sistemas agrícolas.

Por fim, pode-se dizer que a biomassa varia consideravelmente em termos temporais e espaciais, determinados por fatores abióticos e bióticos. O conhecimento da influência dessas variáveis sobre a comunidade e a atividade microbiana pode auxiliar na recomendação de práticas culturais que minimizem a competição por nutrientes (imobilização) entre os microrganismos e as plantas cultivadas ou que aumentem a eficiência de uso dos nutrientes pelas plantas, resultantes da mineralização da matéria orgânica do solo (Nuernberg et al., 1984). O desafio consiste em determinar as conseqüências diretas dessas variações nos ecossistemas e na produtividade dos sistemas agrícolas auto-sustentáveis.

Outros microrganismos de importância fundamental à agricultura podem ser influenciados pelo manejo do solo, bem como por outros fatores bióticos e abióticos. Associações entre fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e raízes de plantas têm uma importante contribuição para a nutrição das plantas, pois a micorriza geralmente promove o aumento da absorção de nutrientes e o crescimento da planta. Têm particular importância quando se considera a nutrição de plantas por nutrientes pouco móveis, como o fósforo, além do N-NH_4^+ como fonte de nitrogênio (Frey & Schüepp, 1993; Subramanian & Charest, 1999; Bagayoco et al., 2000).

Estudos com FMAs e assimilação de nitrogênio em milho após período de seca (Subramanian & Charest, 1998) demonstraram que a colonização micorrízica com *Glomus intraradices* em duas cultivares de milho promoveu uma melhor condição nutricional de N, possivelmente pelo transporte de N do meio de cultura pelas hifas do

fungo. Isso pode ter ocorrido em função de um aumento na atividade das enzimas de assimilação de N (NR, GS e GOGAT) e concentrações de proteínas e aminoácidos.

Em um experimento realizado em condições de casa de vegetação, Martins e Cruz (1998) avaliaram a contribuição de FMAs no processo de transferência de ^{15}N para plantas de milho. A inoculação do fungo aumentou a matéria seca e a quantidade de ^{15}N e P na parte aérea das plantas, sendo que a transferência direta de ^{15}N via hifas de FMAs foi de 21,2% e a transferência indireta mediada pelo micélio foi de 9,6%. Rogers et al. (2001) também verificaram um aumento da produção de matéria seca e teor de nitrogênio na parte aérea de trevo branco em plantas que receberam inóculo de FMA, embora a transferência de ^{15}N para as plantas tenha ocorrido independentemente do FMA, pois o tamanho dos poros das barreiras utilizadas permitiu a transferência de N marcado por difusão.

Quintero et al. (1993), citado por Pereira (1995), encontraram diferenças significativas na massa da matéria seca de milho híbrido e nativo. O milho nativo respondeu mais eficientemente à inoculação com FMA que o híbrido, sendo que o efeito de diferentes endófitos foi mais importante que a intensidade de colonização nas respostas dos hospedeiros. Um outro estudo que teve como objetivo avaliar o impacto de associações de FMAs e plantas de milho mostrou que houve um aumento significativamente maior na massa de folhas de plantas de milho colonizadas pelo fungo *G. etunicatum* em comparação com um controle não micorrizado. Esse aumento da matéria seca das folhas de milho foi de 15,9% a 23,9%, dependendo da espécie de fungo; no entanto, não houve diferenças significativas entre os tratamentos quando comparada a matéria seca total da parte aérea das plantas (Boucher et al., 1999).

Liu et al. (2000) conduziram um trabalho em condições de casa de vegetação que mostrou que as quantidades de N e P adicionadas aos vasos influenciaram na colonização micorrízica, sendo que a colonização de milhos híbridos e a produção de hifas extraradiculares foram maiores na quantidade menor de P aplicada e na quantidade intermediária de N aplicada. A colonização de raízes correlacionou-se com a razão N/P da parte aérea somente na dose intermediária de N, e as concentrações de P, Mg, Zn e Cu foram significativamente maiores nas plantas micorrizadas do que nos controles sem

o fungo. Esse mesmo trabalho ainda mostrou que a espécie de milho híbrido folhoso de estatura normal teve uma maior colonização micorrizica do que outros tipos de milho híbrido.

A forma de manejo do solo parece influenciar pouco a ocorrência de associações entre fungos micorrízicos e plantas de milho, embora poucos trabalhos tratem sobre esse assunto. Franke-Snyder et al. (2001) verificaram que 3 tipos de manejo, praticados durante 15 anos consecutivos, não causaram muitas diferenças entre as comunidades de fungos. A maioria de 15 espécies de FMAs estavam presentes em todos os tratamentos, embora a esporulação de algumas dessas espécies tenha sido diferenciada.

II.2 Bactérias Diazotróficas Endofíticas

Döbereiner e Ruschel, em 1958, isolaram uma bactéria, *Beijerinckia fluminensis*, da rizosfera da cana de açúcar, em solos tropicais, e demonstraram o potencial das diazotróficas associadas a gramíneas. No entanto, foi depois da redescoberta do gênero *Azospirillum*, por Döbereiner e Day em 1975, que, segundo Pereira (1995), havia sido observado pela primeira vez e classificado por Beijerinck em 1925, que cientistas de todo o mundo se interessaram pela associação entre bactérias diazotróficas e gramíneas (Baldani et al., 1997). Esse interesse reflete a importância da fixação biológica de nitrogênio no sustento do sistema de agricultura no Brasil, o qual pode diminuir a quantidade de aplicação de fertilizantes nitrogenados, que vêm sendo utilizados em quantidades muito altas na agricultura atual (Baldani et al., 1997).

As bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas podem ser agrupadas em três categorias: organismos rizosféricos (espécies que colonizam as raízes superficialmente), endofíticos facultativos (capazes de colonizar raízes interna e externamente) e endofíticos obrigatórios, tidos como os mais importantes, que colonizam o interior das raízes e também a parte aérea das plantas (Baldani et al., 1997).

As bactérias fixadoras de nitrogênio, pela nitrogenase (complexo enzimático que exige energia na forma de ATP), catalisam a redução do nitrogênio molecular a amônio,

que é assimilável pelas plantas. O nitrogênio é transportado nas plantas na forma de aminoácidos, sendo que em gramíneas, tais como o milho, a glutamina é a via preferencial (Pereira, 1995).

O uso de meios de cultura semi-sólidos sem N é a condição ideal para o crescimento de microrganismos diazotróficos que, nessas condições, fixarão nitrogênio da atmosfera. Essas bactérias, devido a sua característica de aerotaxia, deslocam-se nesse meio para a região onde a taxa de difusão de O₂ está em equilíbrio com sua taxa de respiração. O descobrimento de cinco espécies de *Azospirillum* (Döbereiner et al., 1995) deve-se à introdução desse meio de cultura. Dentre essas espécies atualmente identificadas (endofíticas facultativas), as mais estudadas são *A. lipoferum* e *A. brasilense*, que ocorrem em grande abundância, principalmente em regiões tropicais, em associação com diversas gramíneas. Döbereiner et al. (1995) citam que números na faixa de 10⁶ células/g de raízes e solo foram encontrados durante o ciclo vegetativo do milho e sorgo em condições tropicais. Outra espécie que ocorre em solos tropicais é *A. amazonense*, que foi inicialmente isolada de gramíneas forrageiras e pupunha nativa da região amazônica. As espécies *A. halopraeferans*, isolada da gramínea "Kallar Grass", cultivada em solos do Paquistão, e *A. irakense*, isolada de plantas de arroz cultivadas no Iraque, nunca foram relatadas no Brasil (Döbereiner et al., 1995).

Azospirillum spp. podem ser caracterizadas como bactérias Gram negativas, tipo bastonete, móveis, com 0,8 a 1 µm de diâmetro e 2 a 4 µm de comprimento, com grânulos intracelulares de poli-hidroxibutirato. São aeróbios típicos, quando supridos com fonte de nitrogênio combinado, e microaerofílicos, quando crescem dependentes da fixação de N₂. Em meio semi-sólido formam uma película delgada em forma de véu, abaixo da superfície do meio, onde a concentração de oxigênio permite a fixação do nitrogênio para iniciar seu crescimento, movendo-se em direção à superfície, quando as células atingem número suficientemente elevado, para escoar o O₂ excessivo que se acumula à sua volta, ativando assim a nitrogenase (Döbereiner et al., 1995).

De acordo com Abrecht et al. (1981), muitos trabalhos demonstraram resultados positivos no crescimento de plantas que receberam bactérias associativas fixadoras de nitrogênio, enquanto outros reportaram a falta de resposta a esse tipo de inoculação.

Swdrynska (2000) verificou um aumento de 27% na produção de plantas de trigo pela inoculação de *A. brasilense*. Já Karpati et al. (2000) observaram que a inoculação de um isolado dessa mesma bactéria foi prejudicial ao crescimento de plantas do cultivar Rigola, de arroz.

Segundo Okon & Kapulnik (1986), muitos trabalhos demonstram que a inoculação com *Azospirillum* spp. pode beneficiar as plantas por vários mecanismos, sendo que depois da inoculação essa bactéria se adsorve às raízes e nelas prolifera, aparentemente invadindo seus tecidos internos, causando alterações no arranjo das células e aumentando a absorção mineral (N, P, K e possivelmente microelementos) da planta.

Embora um grande número de trabalhos mostrem aumentos significativos do conteúdo de nitrogênio da planta proveniente da inoculação com *Azospirillum* (Pereira, 1995), há dúvidas sobre se esse benefício seria causado pela fixação biológica de nitrogênio, ou pela produção de substâncias promotoras de crescimento (Arshad & Frankenberger Jr, 1998), como foi demonstrado pela presença, nas bactérias, de genes de biossíntese de AIA por vande Brock & Vanderleyden (1995), citado por Baldani et al. (1997) e Okon & Kapulnik (1986). Balota et al. (1995) também verificaram a capacidade da produção dessas substâncias promotoras de crescimento por bactérias diazotróficas isoladas de plantas de mandioca, sendo que um isolado de *Azospirillum lipoferum* produziu 130 μ M de AIA, *in vitro*, depois de 48 horas de incubação.

Durante uma contagem de *Azospirillum* spp. em raízes de cereais feita por Baldani em 1984, foi observada uma freqüente ocorrência de pequenas colônias de coloração branca com pontos esverdeados no centro. Estudos realizados com esses novos isolados, por Baldani et al. (1986), permitiram que fosse proposto um novo gênero de bactérias fixadoras de N₂. Essas bactérias endofíticas, que hoje apresentam grande importância, pertencem ao gênero *Herbaspirillum* e são endofíticas obrigatórias.

Há duas espécies conhecidas de *Herbaspirillum* descritas como capazes de fixar nitrogênio e que podem apresentar efeitos benéficos para o crescimento das plantas (Olivares et al., 1997): *H. seropedicae*, que tem sido isolado de um grande número de amostras de raízes, colmos e folhas de gramíneas, e *H. rubrisubalbicans*, até então

conhecida como *Pseudomonas rubrisubalbicans*, considerada um patógeno que causa a chamada estria mosqueada em algumas variedades de cana de açúcar plantadas nos EUA, mas não nas variedades cultivadas no Brasil (Döbereiner et al., 1995; James et al., 1997; Olivares et al., 1997)

Herbaspirillum spp. são bactérias Gram negativas, em formato de bastonetes, menores que *Azospirillum* (0,6 a 0,7 μm x 3 a 5 μm), ligeiramente curvos (Döbereiner et al., 1995). Essas bactérias apresentam-se como fixadoras de nitrogênio em condições microaerófilas.

As duas espécies podem ser diferenciadas pelo uso de fontes de C, N-acetilglucosamina e meso-eritrol, ou pelo uso de sondas de oligonucleotídeos (Döbereiner et al., 1995). Ureta et al. (1995) descrevem algumas metodologias baseadas em critérios bioquímicos e genéticos para a identificação de bactérias diazotróficas endofíticas, como, por exemplo, a utilização de fontes variadas de carbono, resistência a antibióticos, ampliações por PCR e análise de proteínas totais.

Uma outra espécie de bactéria fixadora de nitrogênio, *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Yamada, 1997), denominada anteriormente *Acetobacter diazotrophicus* (isolada por Cavalcanti & Döbereiner em 1988, e descrita por Gillis et al., 1989) foi isolada em meio semi-sólido, tendo caldo de cana de açúcar como componente e vem sendo encontrada em grande número na raiz e colmo de cana de açúcar, além de em espécies que se propagam vegetativamente, como é o caso de batata doce e capim (Boddey et al., 1995; Kirchhof et al., 1998). Segundo Döbereiner et al. (1995), *G. diazotrophicus* é a única espécie do gênero capaz de fixar N_2 . Foi isolada principalmente em plantas cultivadas no Brasil, mas há dados sobre sua ocorrência em outros países. Essa bactéria está incluída no grupo das bactérias endofíticas obrigatórias, pois encontra-se apenas no interior das raízes e colmo da planta (Baldani et al., 1997).

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria pequena (0,7 a 0,8 μm x 2 a 4 μm), Gram negativa, aeróbia (Boddey & Döbereiner, 1995; Döbereiner et al., 1995), que possui como característica mais comum a alta tolerância a sacarose (10%), crescendo e fixando nitrogênio em baixos valores de pH (5,0 ou menos); não reduz nitrato e por tanto é capaz de fixar nitrogênio em meio com altas concentrações de NO_3^-

(Baldani et al., 1997; Pereira, 1995). O meio ideal utilizado para o seu isolamento é o LGI-P sólido acrescido de extrato de levedura. Sua presença é detectada pela formação de colônias de cor alaranjada, sendo purificada em meio Batata-P onde as colônias formadas apresentam coloração chocolate (Döbereiner et al., 1995).

Estudos realizados com ^{15}N mostraram que muitas cultivares de cana de açúcar brasileiras são capazes de obter até 60% de seu nitrogênio ($>150 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$) da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Boddey et al., 1995). Pereira (1995) cita trabalhos em que foi estimado um potencial de fixação biológica em milho de até $2 \text{ kgN ha}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e em *Paspalum notatum* cv Batatais, de $90 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$.

Kirchhof et al. (1997) isolaram bactérias fixadoras de nitrogênio (*Herbaspirillum* e *Azospirillum*) de gramíneas (*Pennisetum*, *Spartina* e *Miscanthus*) e relataram que essas associações são limitadas quando um fertilizante nitrogenado é acrescentado em excesso.

Efeitos da colonização dupla de plantas não leguminosas por bactérias diazotróficas e FMA foram investigados em cana-de-açúcar (Boddey et al., 1991). Essa dupla inoculação pode ser vantajosa, especialmente no caso de *G. diazotrophicus*, pois, sendo a bactéria uma endofítica obrigatória, não é encontrada no solo e, dentre outras hipóteses, à semelhança da transmissão por tecidos de plantas ou por um inseto vetor (Triplett, 1996), pode ser transmitida pelos esporos ou estruturas vegetativas do fungo (Paula et al., 1991). A colonização de uma planta micotrófica dá-se a partir de propágulos infectivos presentes no meio de crescimento vegetal, que podem provir de esporos, micélio externo ou interno (raízes infectadas contendo vesículas ou clamidosporos) (Pereira, 1995). Paula et al. (1991) detectaram a presença de várias bactérias diazotróficas em esporos de fungos micorrízicos, como *Glomus clarum*, mas ainda se desconhece sua função. No entanto, em um trabalho que avaliou a ocorrência de FMAs e *Azotobacter paspali* em *Paspalum notatum*, não foram encontradas células dessas bactérias nem na superfície nem dentro de esporos de FMA (Chu et al., 1998). A inoculação de esporos desinfectados de FMAs e *G. diazotrophicus* ou uma mistura de diazotróficos, incluindo *G. diazotrophicus*, *Klebsiella* e outros, foi estudada em plantas de sorgo sacarino, batata doce e cana-de-açúcar. O número de diazotróficos encontrados

foi significativamente maior com a inoculação de ambos do que quando comparado aos tratamentos sem inoculação ou somente com inoculação de diazotróficos.

Pereira (1995), em um experimento de campo utilizando diferentes genótipos de milho, detectou que houve correlação entre o número de esporos antes do plantio e o número de bactérias diazotróficas no colmo aos 40 dias após emergência em todos os genótipos avaliados. Levantamentos da ocorrência de FMAs e bactérias diazotróficas endofíticas também foram realizados em outras culturas. Balota et al. (1999) avaliaram a ocorrência desses microrganismos em plantas de mandioca de várias localidades do Brasil e observaram que bactérias diazotróficas foram detectadas em todas as partes das plantas, com exceção das folhas, em todas as localidades. Já a colonização micorrízica variou de 31% a 69% e a densidade de esporos variou de 10 a 384 esporos/100 ml de solo. Reis et al. (1999) também verificaram a ocorrência de bactérias diazotróficas em cana de açúcar em todas as 14 variedades de localidades estudadas no Rio de Janeiro e Pernambuco. Nesse mesmo trabalho encontraram números de esporos de FMAs variando de 18 a 2070/ml de solo, ocorrendo uma maior diversidade de espécies em cana de açúcar de Campos (RJ). Durante o processo de penetração das hifas infectivas ocorre maior exsudação de nutrientes pela planta, podendo acelerar o crescimento de bactérias diazotróficas (Paula et al., 1991). O efeito benéfico propiciado pela interação também pode ser devido ao incremento na absorção de P pelas plantas micorrizadas, propiciando melhores condições para o estabelecimento da associação com diazotróficos, o que representa alto custo energético (Pacovsky, 1989a).

Um estudo realizado por Pacovsky (1989b) procurou avaliar o efeito da inoculação de *Glomus fasciculatum* e *A. brasilense* na cultura do sorgo, utilizando como testemunha um tratamento suplementado com N e P, o tratamento de inoculação com o fungo sem adição de P, o tratamento de inoculação com a bactéria diazotrófica sem adição de N e o tratamento de inoculação com os dois microrganismos sem adição de P e N. As plantas colonizadas por *Glomus* continham um teor menor de P, Mn e sacarose e maior de Cu, Zn e prolina que as plantas colonizadas por *Azospirillum brasilense*. Plantas que receberam *A. brasilense* apresentaram um conteúdo menor de N, glucose, treonina e glutamina e mais ferro e glutamato que plantas tratadas com fertilizantes.

Nesse mesmo trabalho constatou-se, nas raízes das plantas colonizadas por *Glomus fasciculatum*, a presença de ácidos graxos que não haviam sido encontrados nas plantas originais, indicando que o fungo é capaz de converter eficientemente o carbono do hospedeiro em lipídio armazenado. Em um outro estudo realizado pelo mesmo autor (Pacovsky, 1989a), foram avaliadas as diferenças metabólicas para *Glomus* e *Azospirillum* em cultivares de milho. Em geral, plantas de milho colonizadas por *Glomus* apresentaram conteúdos maiores de Zn e Cu e menos P, prolina e treonina do que o tratamento com fertilizantes de P. Plantas de milho colonizadas por *Azospirillum* tiveram o conteúdo de N diminuído, assim como o de açúcares e proteínas solúveis, leucina e isoleucina, e um aumento de glutamato por área foliar, em relação a plantas fertilizadas com N. Balota et al. (1995), em um experimento de interação de FMAs e bactérias diazotróficas em plantas de mandioca, verificaram que as bactérias diazotróficas estimularam a colonização radicular por *Glomus clarum* depois de 30 dias. Os efeitos benéficos relatados por esses autores foram proporcionados por substâncias promotoras de crescimento e envolveram a susceptibilidade da planta à infecção por FMAs, germinação de esporos e crescimento do micélio, capacidade de aumentar o contato entre as hifas dos fungos e as raízes de plantas e conseqüentemente o aumento da colonização micorrizica. Gryndler & Hrselova (1998) inocularam 3 isolados de bactérias diazotróficas (ARR, AGR e POA), obtidos do micélio de FMAs associados a outras gramíneas, em plantas de milho micorrizadas e verificaram que não houve aumento do nitrogênio da parte aérea dessas plantas, tendo ocorrido ainda um decréscimo no crescimento das plantas que receberam o isolado POA. No entanto, a dupla inoculação de FMAs e esse isolado aumentou significativamente a concentração de fósforo na parte aérea dessas plantas em relação à testemunha.

Em um estudo de inoculação cruzada de fungos micorrízicos e *Gluconacetobacter diazotrophicus* em *Sorghum bicolor* (L) Moench, Isopi et al. (1995) verificaram que houve uma redução da infecção pelos fungos (isolados de solos alcalinos) quando co-inoculados com *G. diazotrophicus*, possivelmente devido à diminuição do valor do pH causada pelo metabolismo da bactéria, diferente do ocorrido quando Paula et al. (1991) inocularam *G. diazotrophicus* e *Glomus clarum*, fungo

micorrízico conhecidamente tolerante a condições ácidas. No mesmo trabalho, Isopi et al. (1995) sugerem que a infecção por micorrizas tenha promovido a penetração e a dispersão da bactéria não só no tecido cortical da região das raízes, mas também de estruturas radiculares que permitiram a sua transmissão para o caule e as espigas. Foi observado também um aumento na concentração de nitrogênio em todas as plantas micorrizadas em conjunto com *G. diazotrophicus*, mostrando resultados positivos para o crescimento da planta.

A inoculação de FMAs parece ser condição favorável à colonização de bactérias diazotróficas pelas plantas, principalmente por não poderem ser isoladas diretamente do solo. No entanto, na seleção do diazotrófico e FMA mais eficientes, um dos aspectos a ser considerado diz respeito ao genótipo da planta, que deve ser compatível com ambos, bem como as condições edafoclimáticas e tratos culturais.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1 Experimento de Campo

As amostragens de raízes de milho e de solo para as avaliações microbiológicas foram feitas em ensaios de campo instalados, no período da primavera-verão de 1998 e de 1999, respectivamente, na Estação Experimental de Mococa do Instituto Agrônomico (IAC), em ARGISSOLO VERMELHO Eutrófico típico, após pousio, sem irrigação. O ensaio foi parte do projeto: “Eficiência e Resposta de Genótipos de Arroz, Milho e Trigo ao Nitrogênio em Plantio Direto ou Convencional para o Estado de São Paulo e Estados Limitrofes”, coordenado pelo Dr. José Guilherme de Freitas, do Centro de Plantas e Graníferas do IAC.

As adubações de P e K e micronutrientes foram baseadas nas análises dos solos dos experimentos e na tabela de recomendação de adubação para a cultura do milho para o Estado de São Paulo (Raij e Cantarella, 1997). A adubação com fósforo, potássio, zinco e boro foi feita nas formas de superfosfato simples, cloreto de potássio, sulfato de zinco e bórax respectivamente. Foram aplicados 30 kg de N ha⁻¹ no sulco de semeadura, juntamente com P, K, B e Zn, com exceção da testemunha (ausência da aplicação de N). A fonte de nitrogênio utilizada foi a uréia e as doses aplicadas foram: 0, 90 e 210 kg de N ha⁻¹, parceladas em duas coberturas.

O delineamento estatístico utilizado foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições. As parcelas foram formadas de quatro linhas de 6,0 m de comprimento, espaçadas de 0,80 m, sendo a área útil correspondente às duas linhas centrais de 4,0 m.

Para as avaliações microbiológicas foram considerados 9 tratamentos sendo 3 genótipos de milho e 3 doses de nitrogênio, com 4 repetições de cada tratamento, perfazendo um total de 36 amostras.

Os genótipos de milho foram escolhidos de acordo com as características de eficiência (ser ou não produtivo na ausência de nitrogênio), responsividade ao N (responder ou não à aplicação do N) e tolerância ao alumínio, sendo eles: BR3123, baixa

eficiência, responsivo ao N e tolerante ao Al; C333B, alta eficiência, resposta intermediária ao N e tolerante ao Al; e DINA766, eficiência intermediária, responsivo ao N e tolerância intermediária ao Al.

As raízes utilizadas para as quantificações de bactérias diazotróficas endofíticas e colonização por fungos micorrízicos arbusculares foram de duas plantas por parcela, coletadas 10 semanas após a emergência na fase de florescimento, na qual a demanda de nutrientes é muito importante (Viégas & Peeten, 1987). A coleta dessas raízes ocorreu em janeiro de 1999. A avaliação dos microrganismos ligados à nutrição nitrogenada da cultura foi complementada pela quantificação dos microrganismos amonificadores e nitrificadores, dados esses aliados aos teores de N-NH_4^+ e N-NO_3^- no solo. O estudo também englobou a quantificação do carbono e nitrogênio da biomassa microbiana e a avaliação da atividade microbiana por respirometria.

As amostragens de solo para essas avaliações foram feitas nas linhas centrais de cada parcela, sendo cada amostra composta de duas subamostras obtidas na camada de 0 – 20 cm de profundidade, próximas às raízes do milho. As amostragens de solo foram feitas em dois experimentos diferentes. No primeiro deles, as amostras de solo foram coletadas 30 dias após a coleta das raízes (fevereiro de 1999) e com elas foi realizada a quantificação de esporos de fungos micorrízicos arbusculares. Na amostragem realizada em experimento semelhante (janeiro de 2000) a coleta de solo foi feita 15 dias após a última cobertura com adubo nitrogenado, coincidindo com a época da amostragem das raízes no experimento anterior. Com esse solo foram realizadas todas as outras avaliações microbiológicas.

III.1.1 Quantificação de Amônio e Nitrato do Solo e de Microrganismos Envolvidos na Ciclagem do Nitrogênio no Solo

Quantificação de Microrganismos Amonificadores

A quantificação dos microrganismos amonificadores foi realizada pelo método do número mais provável (NMP), que tem suporte estatístico no trabalho de Halvorson

& Ziegler (1932) e baseia-se na diluição à extinção. As diluições utilizadas foram definidas com base em testes preliminares e foram de 10^{-4} a 10^{-10} , sendo cada uma distribuída para 5 tubos com o meio de cultura específico para amonificadores proposto por Sarathchandra em 1978. A incubação foi feita por 5 dias a 28°C e os meios dos tubos com crescimento positivo demonstraram mudança de cor laranja para rosa, devido a elevação do valor de pH acima de 7,0, pelo indicador vermelho de fenol.

Quantificação de Microrganismos Nitrificadores

Para a avaliação de microrganismos nitrificadores presentes no solo também utilizou-se o método do número mais provável (NMP), que se baseia na diluição à extinção. Duas avaliações foram realizadas para quantificar, separadamente, microrganismos nitritadores e nitratores (Alexander & Clark, 1979), utilizando-se diferentes meios de cultura para cada um. As diluições utilizadas foram definidas com base em testes preliminares, sendo que para a avaliação de microrganismos nitritadores foram utilizadas diluições de 10^{-1} a 10^{-5} e para nitratores, diluições de 10^{-2} a 10^{-7} .

A presença de microrganismos nitritadores foi verificada em duas etapas, sendo a primeira pela adição de 3 gotas do reagente Griess-Ilosvay (aparecimento de coloração rosa/púrpura pela presença de nitrito no meio) e a seguinte pela adição de ZnCuMnO_2 nos tubos que se apresentaram negativos na primeira etapa (evidencia a presença de nitrato pela coloração rosa/púrpura).

A presença de microrganismos nitratores foi avaliada pela ausência de nitrito no meio de cultura.

Quantificação de NH_4^+ e NO_3^- no solo

O nitrogênio amoniacal e o nítrico foram quantificados, nas amostras de solo coletadas em janeiro de 2000, pelo laboratório de Fertilidade do Solo do Centro de Solos e Recursos Agroambientais do IAC.

III.1.2 Análise da Atividade Microbiana por Respirimetria

Para a quantificação da respiração pelos microrganismos presentes no solo utilizou-se o método de Pramer & Schimdt (1964). Cem gramas de cada amostra de solo foram transferidos para frascos de vidro hermeticamente vedados. A esse solo foi acrescentada água destilada correspondente a 60% da capacidade máxima de retenção de água, que foi previamente estimada para o solo. Em um frasco de Erlenmeyer, para cada frasco de respirometria, colocaram-se 10 ml de NaOH 0,1 N. Para cada amostra foram feitas 3 repetições e foram mantidos 3 frascos controles ou testemunhas, sem amostras de solo. Procedeu-se a uma incubação de 5 dias, para estabilização da umidade no solo, antes de ser colocada a soda e a incubação posterior foi de dois dias a 28°C.

Procedeu-se à avaliação da quantidade de CO₂ liberado, pela quantidade de NaOH utilizada ($2\text{NaOH} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{H}_2\text{O}$). Para essa análise, adicionaram-se 1 ml de cloreto de bário a 50% e 3 gotas de fenolftaleína e, em seguida, procedeu-se à titulação com HCl 0,1 N. Os resultados finais foram expressos em $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$.

III.1.3 Análise do Carbono, Nitrogênio e Relação entre C e N da Biomassa Microbiana do Solo

Análise do Carbono da Biomassa Microbiana

O método utilizado foi o da fumigação-extração, que tem como princípio analisar a biomassa microbiana extraível em solução aquosa de sulfato de potássio a 0,5 M. A fumigação do solo com clorofórmio lisa as células, liberando o citoplasma e permitindo sua extração do solo (Vance et al., 1987).

Para realizar a fumigação, utilizou-se o clorofórmio livre de etanol, deixando o solo exposto aos seus vapores sob vácuo, por 24 horas.

Tanto o solo fumigado quanto o não fumigado (20g de solo para cada amostra) foram agitados por 30 minutos com K_2SO_4 a 0,5 M, e, em seguida, decantados e filtrados. Os extratos de solo obtidos foram submetidos à digestão por dicromato de potássio. O dicromato remanescente foi quantificado por titulação com solução padronizada de sulfato ferroso amoniacal. Pela diferença entre o volume excedente do dicromato das amostras, fumigadas e não fumigadas, calculou-se o carbono extraído proveniente das células lisadas. Os resultados finais foram expressos em $\mu\text{g C g}^{-1}$ de solo (Brookes et al., 1985; Voroney et al., 1993).

Análise do Nitrogênio da Biomassa Microbiana

O método utilizado para a quantificação do nitrogênio da biomassa também foi o da fumigação-extração e o extrato utilizado para essa avaliação foi o mesmo que se utilizou para a quantificação de carbono da biomassa.

Foram transferidos 30 ml do extrato para tubos de digestão e acrescentou-se 1 ml de H_2SO_4 concentrado. Essa solução foi mantida em bloco digestor a 60°C até que a solução fosse reduzida a aproximadamente 2ml (5 dias). Após concentrado, acrescentaram-se 7 ml da solução digestora e elevou-se a temperatura para 360°C , na qual permaneceram por 5 horas. Após esfriar, essa solução foi submetida a uma destilação utilizando-se 10 ml de ácido bórico 2%. Como resultado da destilação, coletou-se um volume de 50 ml e titulou-se com H_2SO_4 0,1 N padronizado. Para cada bloco digerido fez-se uma prova em branco (Jenkinson, 1988). Os resultados foram expressos em $\mu\text{g N g}^{-1}$ de solo.

Cálculos da relação C/N

O cálculo da relação C/N foi realizado pela razão entre o carbono da biomassa e o nitrogênio da biomassa (Venzke Filho, 1999).

III.1.4 Quantificação de Esporos de Fungos Micorrízicos Arbusculares e Colonização Micorrízica

Quantificação de Esporos de Fungos Micorrízicos Arbusculares

A determinação do número de esporos de FMA na rizosfera do milho foi realizada pelo método de peneiramento úmido (Gerdemann & Nicolson, 1963). Portanto, para essa avaliação misturaram-se 100g do solo seco e água destilada. Essa solução foi passada por três peneiras, tendo elas: 0,250mm, 0,105 mm e 0,045 mm de malha. Esse procedimento foi repetido 10 vezes até que todos os esporos pudessem ficar retidos nas peneiras. O conteúdo das mesmas foi recolhido com solução de sacarose a 70% e centrifugado por 3 minutos a cerca de 800x g. As soluções foram novamente peneiradas, separadamente, e os esporos recolhidos com água destilada foram contados utilizando-se uma placa escavada. Foram feitas 3 repetições para cada amostra.

Colonização de Raízes por Fungos Micorrízicos Arbusculares

Para determinação da colonização micorrízica (Phillips & Hayman, 1970), as raízes mais finas foram lavadas em água destilada e mantidas em álcool 50%, até que fosse procedida a avaliação. Para tanto, as raízes foram bem lavadas em água corrente e colocadas em um béquer, mergulhadas em KOH 2,5% e levadas ao banho-maria (100°C) por 5 minutos (para seu clareamento). Novamente as raízes foram lavadas e imersas em HCl 2%, onde foram mantidas por 24 horas. Em seguida o ácido foi retirado e imediatamente acrescentou-se o corante azul de tripano. As raízes foram novamente levadas ao banho-maria por 5 minutos. Por fim, o corante foi retirado em água corrente e as raízes mergulhadas em glicerol acidificado até que se procedesse à quantificação, que foi feita pela observação da presença de estruturas fúngicas dentro das raízes, na região do córtex, pelo método da placa quadriculada (Giovanetti & Mosse, 1980), estimando-se a porcentagem do comprimento de raiz colonizada pelo FMA.

III.1.5 Quantificação e Isolamento de Bactérias Diazotróficas Endofíticas

A quantificação das bactérias foi realizada segundo Döbereiner et al. (1995). As raízes de milho coletadas no campo foram inicialmente bem lavadas com água corrente, para que não ficassem resíduos de solo aderidos. Em seguida, 10 g de raízes fasciculadas passaram por um processo de esterilização, para que todos os microrganismos presentes na sua parte externa fossem eliminados. A esterilização consistiu na imersão das raízes em cloramina T a 1% por 30 minutos. Em seguida, foram retiradas dessa solução, mergulhadas em água destilada por 10 minutos e transferidas para um tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0), no qual também permaneceram por 10 minutos. Posteriormente, as raízes foram lavadas em água destilada esterilizada e processadas em um liquidificador com 90 ml de solução de sacarose 4%, por aproximadamente 3 minutos. A partir dessa solução, foram feitas diluições de 10^{-2} a 10^{-7} . Cem microlitros de cada diluição foram distribuídos para 5 tubos de ensaio, com 10 ml do meio específico para o crescimento do microrganismo diazotrófico desejado. As bactérias diazotróficas endofíticas estudadas foram dos gêneros *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp. e *Gluconacetobacter diazotrophicus*, sendo os meios requeridos para seu crescimento o NFb, JNFb e LGI-P respectivamente. A quantificação desses microrganismos foi realizada pelo método do número mais provável, baseado na presença de película formada no meio semi-sólido. Essas películas foram transferidas para tubos com meio sólido, que foram armazenados com óleo mineral, até que pudesse ser iniciado o processo de isolamento aqui descrito.

O isolamento foi feito a partir de dois tubos por amostra, sendo os de maior e menor diluição escolhidos durante a quantificação.

Isolamento de *Azospirillum* spp.

O isolamento de *Azospirillum* spp. foi realizado de acordo com Döbereiner et al. (1995). As bactérias cultivadas no meio NFb foram transferidas para novos tubos com

NFb semi-sólido sem fonte de nitrogênio que foram mantidos a 35°C por 7 dias. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. Em seguida, as bactérias foram cultivadas em meio NFb sólido acrescido de 20mg de extrato de levedura/litro, sendo purificadas pela técnica de esgotamento. Após a incubação (de 3 a 7 dias) as colônias aparecem pequenas, secas e brancas. Essas colônias puras foram transferidas novamente para meio semi-sólido e, após a formação da película, foram cultivadas em meio de batata.

Nesse meio as colônias são inicialmente branco-amareladas, tornando-se róseas, pequenas e estruturadas após uma semana de incubação a 35°C. Terminada essa etapa, as colônias típicas formadas foram novamente transferidas para meio semi-sólido e incubadas por 48 horas a 35°C e avaliadas ao microscópio óptico. As células de *Azospirillum brasilense* podem ser identificadas como bastonetes curvos, móveis, com 1 x 3 a 5 µm, mesmo após o meio tornar-se alcalino. Células novas de *A. lipoferum* são idênticas, mas quando o meio se torna alcalino, as células ficam grandes, pleomórficas e imóveis.

Isolamento de *Herbaspirillum* spp.

O isolamento de *Herbaspirillum* spp. foi feito de acordo com Döbereiner et al. (1995). As bactérias cultivadas no meio JNFb foram transferidas para novos tubos com JNFb semi-sólido sem fonte de nitrogênio e foram incubadas a 35°C por 7 dias. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. Em seguida, as culturas foram cultivadas em meio JNFb sólido acrescido de 20mg de extrato de levedura/litro. Após a incubação, as colônias puras aparecem pequenas e inicialmente brancas, tornando-se seu centro azulado com uma semana de incubação. Essa característica pode ser mais evidenciada usando-se o meio JNFb contendo três vezes a concentração recomendada de azul de bromotimol. Essas colônias foram transferidas novamente para meio semi-sólido e, após a formação da película, foram transferidas para meio de batata. Nesse meio as colônias são úmidas e pequenas, com centro marrom e produzem um cheiro característico.

Terminada essa etapa, as colônias típicas formadas foram novamente transferidas para meio semi-sólido e incubadas por 48 horas a 35°C e avaliadas ao microscópio óptico. As células de *Herbaspirillum* spp. têm forma de bastão muito menores que as de *Azospirillum* spp., em geral, ligeiramente curvados, mostrando movimento espiralóide apenas quando próximas a bolhas de ar.

Isolamento de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

O isolamento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* foi realizado segundo Döbereiner et al. (1995). As bactérias cultivadas no meio LGI-P foram transferidas para novos tubos com LGI-P semi-sólido sem fonte de nitrogênio e foram incubadas a 30°C por 7 dias. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. Em seguida, as culturas foram cultivadas em meio LGI-P sólido acrescido de 20mg de extrato de levedura/litro. Após a incubação (de 7 a 10 dias) as colônias aparecem pequenas e de cor laranja. Essas colônias foram transferidas novamente para meio semi-sólido e, após a formação da película, foram transferidas para meio de batata-P. Nesse meio as colônias formadas são inicialmente claras e úmidas, tornando-se de coloração chocolate após sete a dez dias de incubação a 30°C. Terminada essa etapa, as colônias típicas formadas foram novamente transferidas para meio semi-sólido e incubadas por 48 horas a 35°C e avaliadas ao microscópio óptico. As células de *G. diazotrophicus* possuem tamanho de 0,7 a 0,8 x 2 a 4 µm e não apresentam movimento espiralado.

III.2 Experimento em Casa de Vegetação

Interação entre Genótipos de Milho e Diazotróficos Endofíticos

Os isolados de bactérias obtidos no experimento de campo foram testados quanto à capacidade de beneficiar o crescimento da planta em experimento em casa de

vegetação. Os isolados foram inoculados no genótipo de origem e comparados com um controle com solução de Hoagland & Arnon (1950) completa (com N mineral) e um controle absoluto com a mesma solução que receberam as plantas nas quais os isolados bacterianos foram inoculados, ou seja, uma solução de Hoagland & Arnon (1950) modificada com 10% do nitrogênio contido na solução completa. Essa solução foi modificada a partir de observações feitas durante o experimento e serão explicadas mais adiante nos resultados e discussão. Foram testados 8 isolados de *Herbaspirillum* spp. e 13 isolados de *Azospirillum* spp. obtidos a partir do genótipo C333b, 8 isolados de *Herbaspirillum* spp. e 22 isolados de *Azospirillum* spp. obtidos a partir do genótipo DINA766 e 1 isolado de *Herbaspirillum* spp e 10 isolados de *Azospirillum* spp. obtidos a partir do genótipo BR3123. Foram inoculadas também as estirpes tipo das espécies, obtidas da coleção de microrganismos diazotróficos da EMBRAPA-CNPAGrobiologia. As estirpes utilizadas foram: Z-67 (ATCC 35892) de *Herbaspirillum seropedicae* e SP-59b (ATCC 29707) de *Azospirillum lipoferum*. Essas estirpes foram inoculadas apenas para serem testadas quanto à sua eficiência e não utilizadas como referência, por nunca terem sido testadas anteriormente nesses genótipos de milho.

Para cada tratamento foram feitas 5 repetições. O experimento foi feito utilizando-se vasos de 7L com vermiculita. A vermiculita foi esterilizada por autoclavagem e antes do plantio foi feita a irrigação dos vasos com água destilada esterilizada até que ocorresse a percolação. Isso foi feito com intuito de lavar qualquer resíduo de amônio que pudesse estar presente nesse substrato.

A inoculação das bactérias foi realizada “in vitro” em meio de solução de Hoagland sem N. Para isso o método escolhido foi o descrito por Baldani et al. (2000). As sementes foram desinfetadas superficialmente com hipoclorito de sódio 2,5% na diluição 1:3 por 30 minutos, enxaguadas com água destilada esterilizada e foram pré-germinadas em meio de batata onde foram incubadas por 48 horas a 30° C. As sementes pré-germinadas livres de contaminação foram transferidas para tubos com meio de solução de Hoagland sem N com 0,6% de ágar, os quais já haviam recebido os isolados obtidos no experimento de campo. Após 4 dias as plantas foram transferidas para os

vasos com vermiculita na casa de vegetação. Após 7 dias foi realizada uma segunda inoculação com a aplicação de uma suspensão de bactérias nos vasos.

Sessenta dias após a primeira inoculação as plantas foram colhidas e secas em estufa com circulação de ar a 60°C até massa constante para determinação da produção de matéria seca da parte aérea e posterior teor de N na parte aérea pelo método do micro-Kjeldahl (Bremner, 1965). A partir dessas análises foram calculados o teor de nitrogênio acumulado por planta e o índice de eficiência de utilização do nitrogênio (Siddiqi & Glass, 1981).

III.3 Análise Estatística

Os dados obtidos foram avaliados pelo programa SANEST, fazendo-se análise da variância considerando-se como causas de variação doses de N, genótipos de milho e interação entre ambos. A comparação das médias foi pelo teste de Tukey a 5% para os dados qualitativos, referentes aos genótipos de milho. Para avaliação dos dados quantitativos, referentes às doses de nitrogênio, foram feitas regressões polinomiais. Os dados de contagem de microrganismos diazotróficos, amonificadores e nitrificadores foram transformados para as análises em logaritmos. Os dados de colonização de raízes por fungos micorrizicos arbusculares foram transformados para as análises em arco-seno $\sqrt{x/100}$ (Gomes, 1976). Os dados das demais análises não sofreram transformação.

Foram feitas, também, correlações entre as seguintes variáveis: microrganismos envolvidos na ciclagem do N no solo entre si, todos os microrganismos envolvidos na ciclagem do nitrogênio no solo e teor de amônio e nitrato no solo, microrganismos envolvidos na ciclagem do N do solo e carbono e nitrogênio da biomassa microbiana, teor de amônio e nitrato no solo e carbono e nitrogênio da biomassa microbiana, carbono e nitrogênio da biomassa microbiana, microrganismos envolvidos na ciclagem do N no solo e respiração do solo, carbono e nitrogênio da biomassa e respiração do solo, esporos

de FMA e colonização micorrízica, esporos de FMA e C e N da biomassa microbiana, números de microrganismos diazotróficos endofíticos e colonização micorrízica.

A comparação das médias obtidas no experimento em casa de vegetação foi feita pelo teste unilateral de Dunnett, sendo que os isolados bacterianos foram comparados com a testemunha absoluta. As análises foram feitas separadamente para os três genótipos de milho.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV. 1 Experimento de Campo

IV.1.1 Quantificação de Nitrato e Amônio e de Microrganismos Envolvidos na Ciclagem do N no Solo

Os números que expressam as quantidades de NH_4^+ ($\mu\text{g g}^{-1}$ solo) e microrganismos amonificadores (células g^{-1} solo) encontrados no solo, para todos os tratamentos, estão apresentados no quadro 1. Como a análise de variância não revelou diferenças significativas para a interação de doses e genótipos, os dados não foram submetidos à comparação de médias.

Quadro 1. Quantidade de NH_4^+ e microrganismos amonificadores em amostras de solo sob cultivo de plantas de três genótipos de milho com três doses de uréia aplicada. Médias de 4 repetições.

DOSES DE N kg/ha	GENÓTIPOS		
	BR3123	DINA766	C333B
NH ₄ ⁺ ($\mu\text{g g}^{-1}$ solo):			
0	1,84	1,10	1,47
90	1,25	1,54	1,03
210	1,91	1,10	1,25
c.v. = 55,29%			
Microrganismos Amonificadores (células g^{-1} solo)			
0	$2,5 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$
90	$4,5 \times 10^6$	$8,1 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$
210	$6,7 \times 10^6$	$6,1 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$
c.v.* = 5,4%			

*c.v.: coeficiente de variação referente à análise de variância com os dados transformados em log x. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos pelo teste F.

A figura 1 apresenta os valores médios de NH_4^+ no solo sob cultivo de milho e doses de nitrogênio aplicadas. A quantidade de NH_4^+ no solo não diferiu significativamente entre os tratamentos que envolvem genótipos de milho (figura 1-A), as doses de nitrogênio aplicadas no solo (figura 1-B), nem para a interação entre genótipos de milho e doses de N, apresentando-se em média de 1,03 a 1,91 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo.

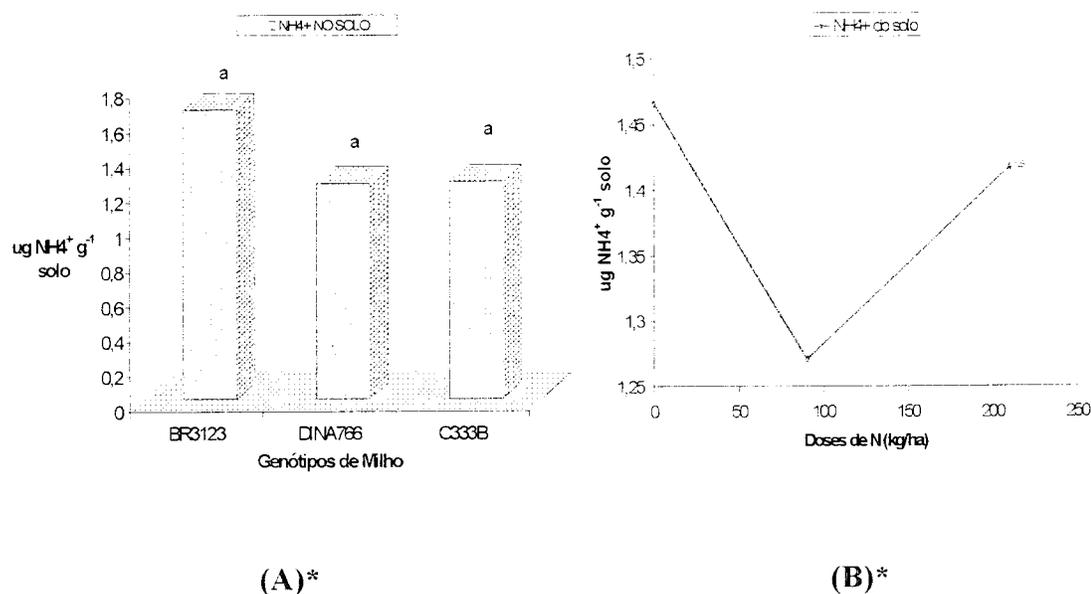


Figura 1 – Quantidade de NH_4^+ em amostras de solo sob cultivo de plantas de três genótipos de milho, independentemente da dose de uréia aplicada (A) e com três doses de uréia aplicada, independentemente do genótipo de milho (B). Médias de 12 parcelas. *(A) Colunas com mesma letra não diferem entre si ao nível de 5 % pelo teste Tukey; (B) NS – regressão não significativa ao nível de 5%.

A figura 2 apresenta os valores médios do número de microrganismos amonificadores no solo sob cultivo de plantas de três genótipos de milho e três doses de nitrogênio aplicadas. O número de microrganismos amonificadores (figura 2-A) também não variou significativamente entre os tratamentos e apresentou-se em média na ordem de 10^6 células g^{-1} de solo (quadro 1). Assim, a uréia adicionada deve ter sido ativa

e rapidamente transformada em NH_4^+ , o qual, por sua vez, estava também sendo transformado a NO_3^- . Na época da amostragem a amonificação da uréia já deveria ter ocorrido há tempo suficiente para que o número de microrganismos amonificadores já tivesse retornado a um valor de equilíbrio, semelhante para todos os tratamentos. De acordo com Jarvis et al. (1996) a uréia é hidrolisada rapidamente após ser aplicada.

A última cobertura com o adubo nitrogenado havia sido feita 15 dias antes da amostragem, mas as coberturas anteriores devem ter estimulado de tal forma a microbiota amonificadora, pela presença quase contínua de uréia, que essa última cobertura foi ainda mais prontamente mineralizada.

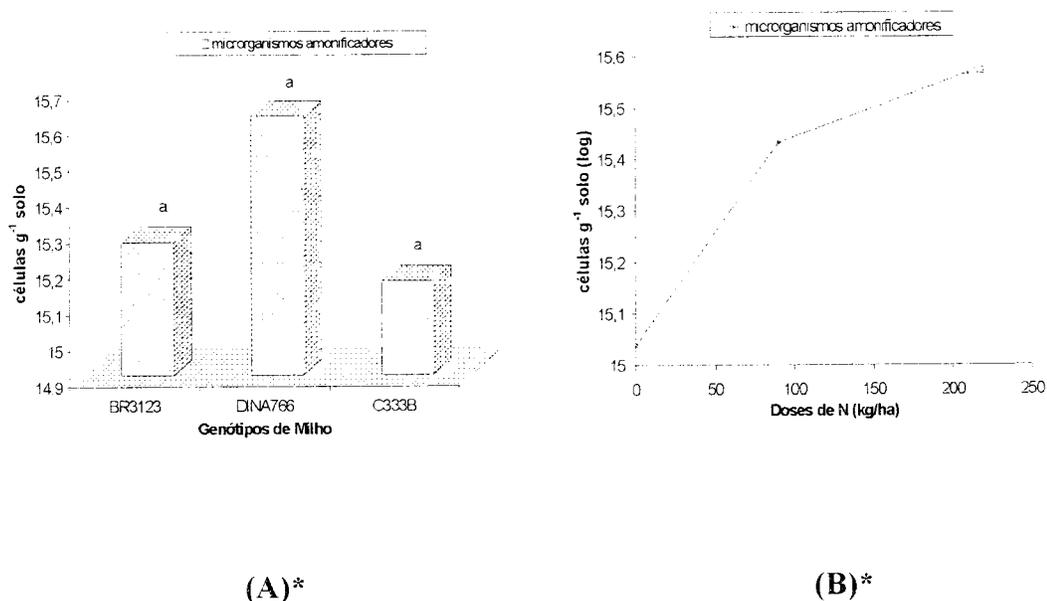


Figura 2 –Números de microrganismos amonificadores em amostras de solo sob cultivo de plantas de três genótipos de milho, independentemente da dose de uréia aplicada (A) e três doses de uréia aplicada, independentemente dos genótipos de milho (B). Médias transformadas em $\log x$ de 12 parcelas. *(A) Colunas com mesma letra não diferem entre si ao nível de 5 % pelo teste Tukey; (B) NS – regressão não significativa ao nível de 5%.

Reddy et al. (1990) quantificaram $^{15}\text{NH}_3$, $^{15}\text{N}_2$, ^{15}N orgânico e $^{15}\text{NH}_4$ em solos com cultura de arroz após a aplicação de uréia. O amônio apareceu primeiramente no solo alagado e, assim como neste trabalho, os autores verificaram que ele foi transformado em até duas semanas após a aplicação. No entanto, a velocidade da mineralização do nitrogênio depende também das condições em que acontece. Os resultados de Lovell & Hatch (1998) foram bem diferentes dos encontrados neste trabalho, sendo que esses autores somente observaram um decréscimo significativo da amonificação na quarta semana após a adição de nitrogênio; todavia, trabalharam com solo de clima temperado e em condições muito diferentes das deste trabalho, em temperaturas muito mais baixas, nas quais a microbiota deve ter baixa atividade. Ma et al. (1999) encontraram diferentes concentrações de uréia, amônio e nitrato, de acordo com as profundidades de solo estudadas. No caso deste trabalho, analisou-se somente uma profundidade. Pode ser que exista variação não considerada para este trabalho.

O teor de nitrato e o número de microrganismos nitrificadores no solo estão apresentados no quadro 2. Semelhantemente ao que já foi explicado para o quadro 1, esses dados também não foram submetidos a testes de comparação de médias, pois a análise de variância não mostrou diferenças significativas.

Quadro 2 – Quantidade de NO_3^- e microrganismos nitrificadores em amostras de solo sob cultivo de plantas de três genótipos de milho com três doses de uréia aplicada. Médias de 4 repetições.

DOSES DE N kg/ha	GENÓTIPOS		
	BR3123	DINA766	C333B
	NO_3^- ($\mu\text{g g}^{-1}$ solo)		
0	2,05	1,61	1,61
90	1,62	2,27	1,76
210	2,64	2,93	2,12
c.v. = 34.83%			

(Continua)

Quadro 2. Continuação

Microorganismos Nitritadores (células g ⁻¹ solo)			
0	15 x 10 ³	14 x 10 ³	3,8 x 10 ³
90	8,3 x 10 ³	6,9 x 10 ³	5,3 x 10 ³
210	8,1 x 10 ³	3,6 x 10 ³	2,4 x 10 ³
c.v.* = 8,5%			
Microorganismos Nitratadores (células g ⁻¹ solo)			
0	3,8 x 10 ⁶	3,3 x 10 ⁶	3,6 x 10 ⁶
90	2,0 x 10 ⁶	2,8 x 10 ⁶	1,7 x 10 ⁶
210	2,2 x 10 ⁶	2,6 x 10 ⁶	2,5 x 10 ⁶
c.v.* = 5,5%			

*c.v.: coeficiente de variação referente à análise de variância com os dados transformados em log x. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos pelo teste F.

A quantidade de NO₃⁻ no solo não diferiu entre os genótipos (figura 3-A), mas apresentou-se estatisticamente significativa para os tratamentos com doses crescentes de nitrogênio (figura 3-B). O ajuste obtido foi linear ascendente, ou seja, nos tratamentos onde houve maior aplicação de fertilizante nitrogenado, houve um aumento da quantidade de nitrato existente, dando mais uma indicação de que as transformações de uréia processaram-se rapidamente após sua adição ao solo. A ausência de diferença entre os valores de NO₃⁻ em amostras de solo provenientes dos genótipos de milho é esperada, a não ser que houvesse uma ativa e marcante diferença na absorção desse íon por um dos genótipos em relação aos outros.

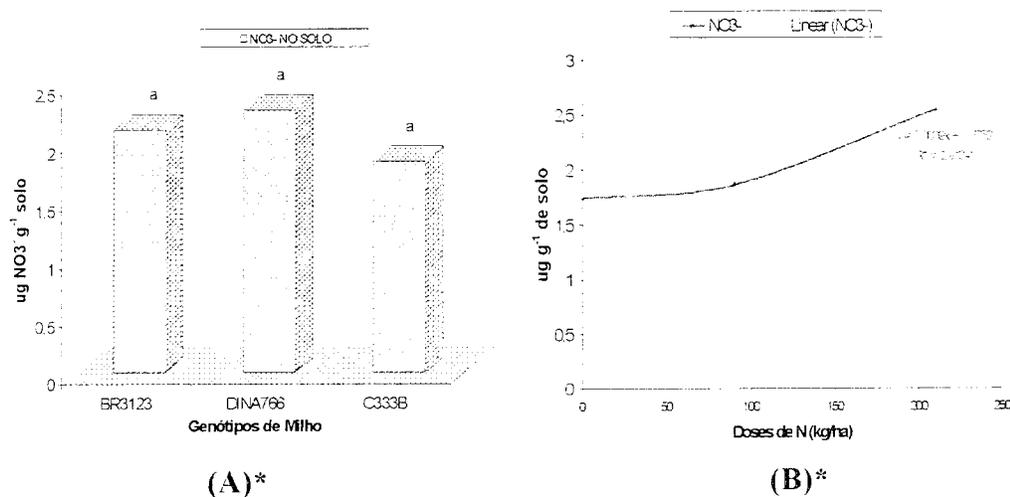


Figura 3 – Teor de NO_3^- em amostras de solo sob cultivo de plantas de três genótipos de milho, independentemente da dose de uréia aplicada (A) e com três doses de uréia aplicada, independentemente do genótipo de milho (B). Médias de 12 parcelas. *(A) Colunas com mesma letra não diferem entre si ao nível de 5 % pelo teste Tukey; (B) regressão significativa ao nível de 5%.

O número de microrganismos nitrificadores diferiu significativamente entre os tratamentos, tanto para os genótipos (figura 4-A) quanto para as doses de N (figura 4-B).

O solo cultivado com o genótipo C333B apresentou um número significativamente menor de nitrificadores em relação ao genótipo BR3123, quando foram comparadas as médias totais, sem levar em consideração as doses de N. No entanto, quando se compararam os genótipos dentro de cada dose de nitrogênio, essa diferença não foi evidenciada.

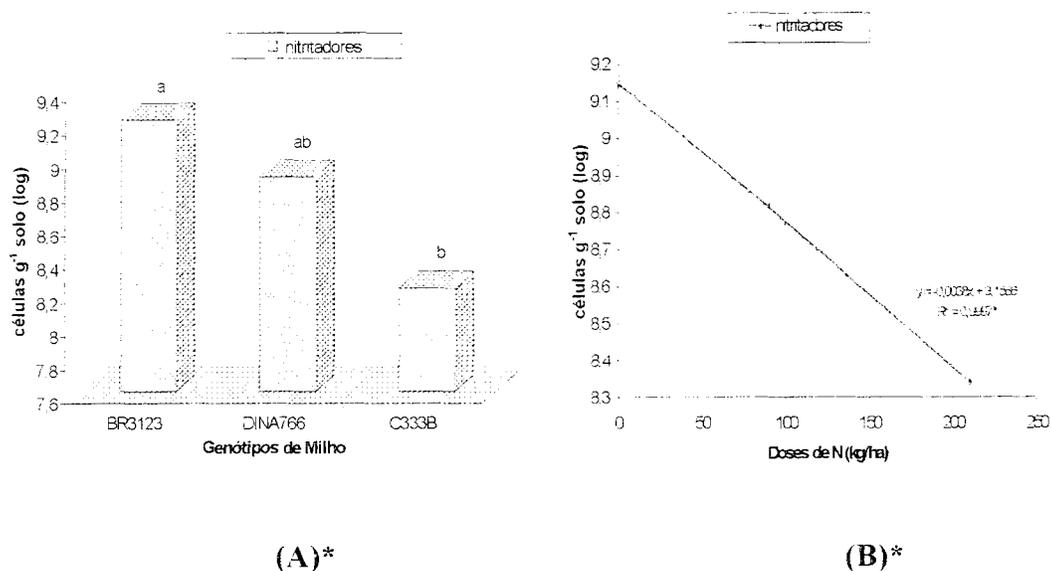


Figura 4 –Número de microrganismos nitritadores no solo dos tratamentos com três genótipos de milho, independentemente da dose de uréia aplicada (A) e três doses de N, independentemente do genótipo de milho (B). Médias transformadas em log x de 12 parcelas. * (A) Colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey; (B) regressão significativa ao nível de 5%.

Pela figura 4, observa-se que há uma relação significativamente linear e negativa entre as doses de N aplicadas e o número de microrganismos nitritadores.

Ainda que inesperado, pelo fato dessa transformação ocorrer muito rapidamente no solo, isso levanta a hipótese de que, nas amostras com maiores doses de N, o estímulo à microbiota envolvida nessas transformações tenha sido tão grande que, à época da amostragem, todo o processo já tivesse ocorrido e as populações de microrganismos nitritadores já tivessem voltado aos níveis de antes do estímulo. Assim, nas amostras sem aplicação de nitrogênio as populações de nitritadores aparecem em número maior porque, na ausência de estímulo, o processo de nitrificação ainda estaria ocorrendo, em taxas menores, mais próximas daquelas de solos sem adição de nitrogênio.

O número de microrganismos nitritadores não variou significativamente para os tratamentos e foi em média da ordem de 10^6 (figura 5).

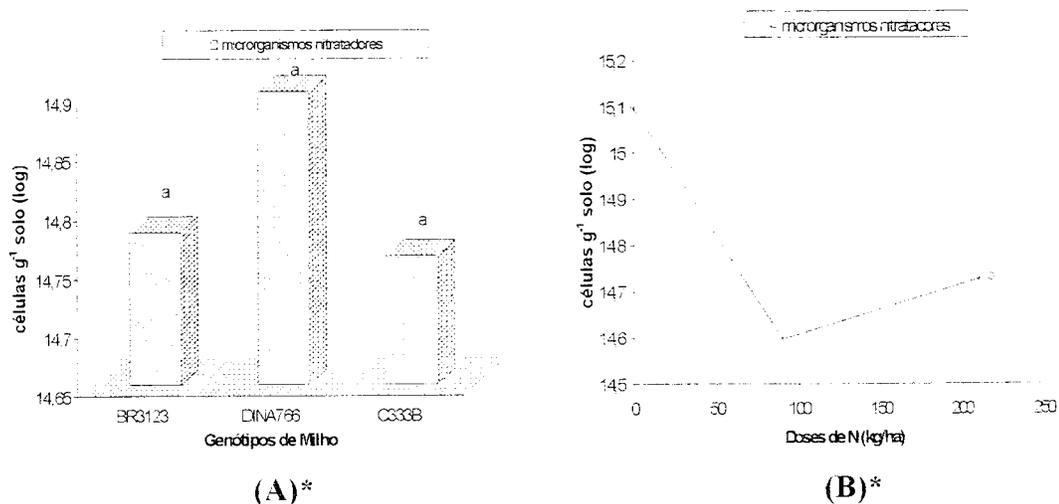


Figura 5- Número de microrganismos nitratores dos tratamentos com três genótipos de milho, independentemente da dose de uréia aplicada (A) e três doses de N, independentemente do genótipo de milho (B). Médias transformadas em log x de 12 parcelas. * (A) Colunas seguidas de mesmas letras não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey; (B) NS - regressão não significativa ao nível de 5%.

Esse fato é coerente com a ausência de diferenças significativas entre os teores de NO_3^- nos solos sob plantas de vários genótipos. Todavia, não se encontrou uma explicação para a regressão não significativa entre microrganismos nitratores e doses de N, quando essa análise foi significativa para nitratores.

A nitrificação é fortemente influenciada por adições minerais de N, sendo que baixas quantidades de NH_4^+ no solo sugerem que haja competição pela sua utilização entre as plantas e os microrganismos nitrificadores, sendo reduzida a atividade desses últimos (Jarvis et al., 1996).

IV.1.2 Avaliação da Atividade Microbiana por Respirometria

Os valores que expressam a quantidade de CO₂ ($\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) obtidos pela análise de respirometria são apresentados no quadro 3, onde se observa que não houve diferenças significativas entre doses de N ou genótipos de milho (figuras 6-A e 6-B).

Quadro 3 – Quantidade de CO₂ liberado de amostras de solos submetidos a tratamentos com três doses de nitrogênio e três genótipos de milho. Médias originais de 4 repetições.

DOSES DE N kg/ha	GENÓTIPOS DE MILHO		
	BR3123	DINA766	C333B
	$\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$		
0	37,12	40,61	41,01
90	38,94	38,75	38,93
210	39,51	37,58	38,20

Coeficiente de variação = 16,35%; não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos pelo teste F.

A liberação de CO₂ quantifica somente a parte da biomassa microbiana do solo que realiza a respiração aeróbia. Durante o processo respiratório, que usa o O₂ como receptor final de elétrons, todo o carbono da molécula do substrato é oxidado até CO₂ (Neves, 1992). A respiração dos microrganismos do solo medida pela respirometria não diferiu estatisticamente entre as amostras sob os diferentes genótipos de milho e nem entre as amostras que receberam as diferentes doses de nitrogênio.

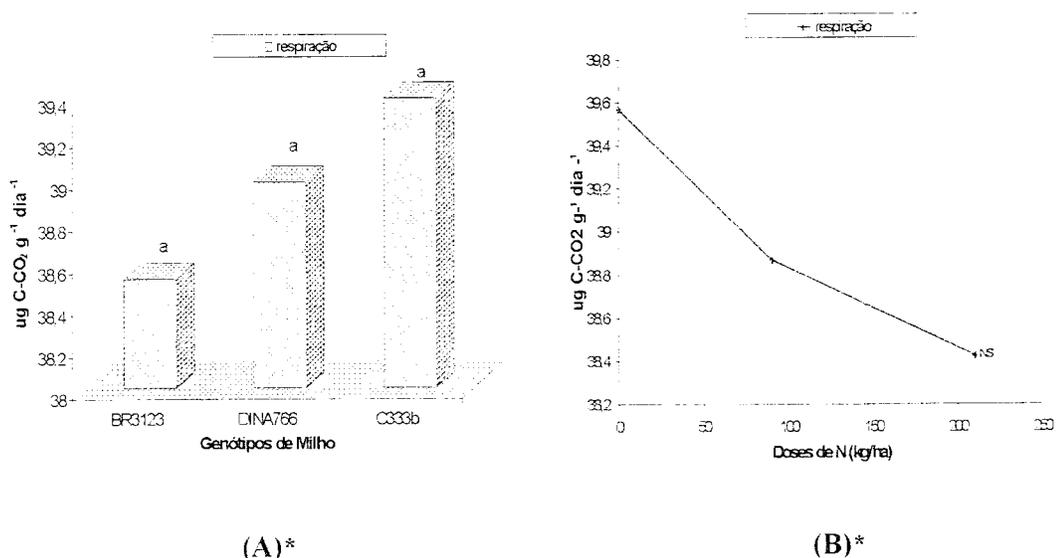


Figura 6 – (A) Quantidade de CO₂ liberado de amostras de solo sob três genótipos de milho, independentemente da dose de uréia aplicada e (B) com três doses de nitrogênio, independentemente do genótipo de milho. *(A) Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% e (B) NS – regressão não significativa o nível de 5%

O solo constitui-se de inúmeros microssítios, caracterizados não apenas pelas condições edafoclimáticas, mas também por fatores peculiares como presença de partículas de matéria orgânica, raiz, microporo saturado de água etc., sendo que essas características podem variar muito em locais que distem entre si de não mais que alguns milímetros (Cardoso, 1992). Cada fator que possa ser causador de uma modificação qualquer no solo pode favorecer ou eliminar populações de microrganismos, muitas vezes remanejando o estado de equilíbrio dinâmico entre elas. No entanto, esse equilíbrio pode se restabelecer, sendo que os diferentes sítios serão ocupados com as populações mais aptas, pela seleção natural. (Cardoso, 1992). Assim, as diferentes doses de nitrogênio aplicadas no solo, bem como os exsudatos de raízes de diferentes genótipos de milho podem ter influenciado, de maneira positiva ou negativa, o crescimento de diferentes comunidades nos diferentes tratamentos. Entretanto, essas diferenças não foram significativas pelo fato de as comunidades microbianas estarem

fisiologicamente adaptadas às diferentes condições. Como a liberação de CO₂ não identifica nem distingue diferentes grupos microbianos em atividade, não há como saber, pela análise dessa variável, quão diferentes comunidades podem estar respirando nessas amostras de solo.

IV.1.3. Quantificação do Carbono, Nitrogênio e relação entre o C e N da Biomassa Microbiana do Solo

Os valores de carbono da biomassa microbiana do solo encontrados para todos os tratamentos estão expressos no quadro 4. Pela análise da quantificação do carbono da biomassa obtiveram-se diferenças significativas para os diferentes genótipos de milho, doses de nitrogênio e a interação entre os dois.

No solo onde foi cultivado o genótipo BR3123 a quantidade de carbono da biomassa foi significativamente maior que os demais genótipos na dose maior de nitrogênio aplicada, ou seja, de 210 kg N ha⁻¹ (quadro 4). Como se sabe, o milho, assim como outras espécies vegetais, libera uma grande quantidade de exsudatos para o solo: Guckert et al. (1975) relataram que, em cada período de vegetação do milho, são liberados para o solo 1250m³ de exsudatos radiculares por hectare. Considerando-se que cada genótipo pode exsudar substâncias totalmente diferentes, podendo favorecer ou não os diferentes grupos microbianos que ocorrem em sua rizosfera, é possível explicar essa diferença nos valores de carbono da biomassa. Por esse mesmo motivo é possível explicar a diferença encontrada quando se consideraram os genótipos dentro da maior dose de N. Na presença de nitrogênio, mas só quando aplicado na dose de 210 kg N ha⁻¹, as plantas do genótipo BR3123 favoreceram o desenvolvimento da biomassa microbiana em comparação com os valores originados na rizosfera das plantas dos outros genótipos. A presença de nitrogênio, *per se*, e associada à planta, que pode ter alterado seu padrão de exsudação nessas condições, favoreceu, de maneira estatisticamente significativa, a biomassa microbiana do solo sob sua influência. Outra forma de expressar esse efeito é a

análise de regressão linear significativa mostrando a relação positiva ($r^2= 0,9164$; $y=1,1147x+134,38$) entre os valores de C da biomassa e as doses de N, também no genótipo BR3123 (figura 7).

Quadro 4 – Carbono da biomassa microbiana solo em amostras de solo com três doses de nitrogênio e três genótipos de milho. Médias originais de quatro repetições.

DOSES DE N kg/ha	GENÓTIPOS DE MILHO		
	BR3123	DINA766	C333B
	$\mu\text{gC g}^{-1}$		
0	157,70 a	122,13 a	194,38 a
90	193,89 a	196,14 a	200,43 a
210	385,95 a	171,80 b	187,35 b

coeficiente de variação = 38,49%. Valores de mesma letra, na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

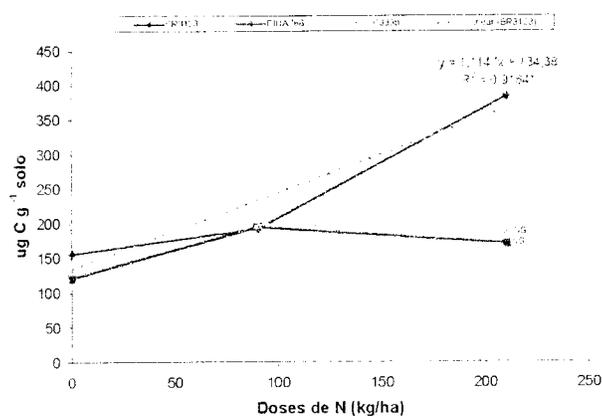


Figura 7. Carbono da biomassa microbiana em amostras de solo com aplicação de três doses de N e sob o cultivo de três genótipos de milho. (* - regressão linear significativa a 5%).

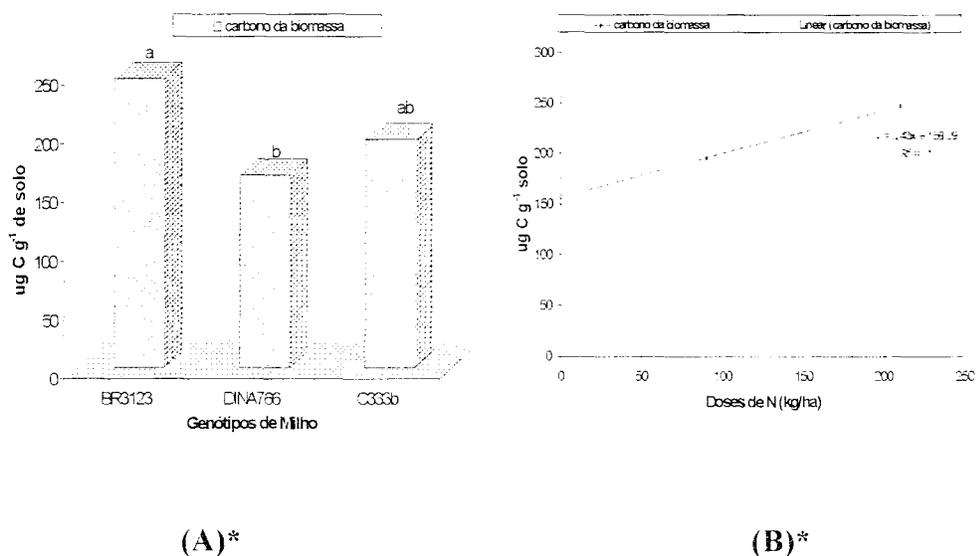


Figura 8- Carbono da biomassa microbiana em amostras de solo sob os três genótipos de milho, independentemente da dose de uréia aplicada (A) e com três doses de nitrogênio, independentemente do genótipo de milho (B). *(A) Colunas com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% e (B) * Regressão linear significativa ao nível de 5%

Na figura 8-B observa-se a reta ilustrativa da regressão linear ascendente significativa entre as doses de N aplicadas e os valores de carbono da biomassa microbiana. Aí confirma-se o efeito positivo do nitrogênio sobre o desenvolvimento da biomassa microbiana independentemente do genótipo de milho usado. Realmente, o nitrogênio é nutriente requerido em grandes quantidades tanto por plantas quanto por microrganismos e não é de surpreender que sua aplicação tenha favorecido o crescimento microbiano.

Os dados de nitrogênio da biomassa microbiana do solo não se apresentaram significativamente diferentes para os tratamentos e os valores estão apresentados no quadro 5.

Quadro 5- Nitrogênio da biomassa microbiana em amostras de solo com três doses de nitrogênio e três genótipos de milho. Médias de quatro repetições.

DOSES DE N kg/ha	GENÓTIPOS DE MILHO		
	BR3123	DINA766	C333B
	— $\mu\text{g N g}^{-1}$ solo —		
0	58,72	57,26	62,84
90	55,71	61,73	45,57
210	54,43	55,08	53,27

Coefficiente de variação = 17 %. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos pelo teste F.

Da mesma maneira, não houve diferenças significativas quanto à imobilização do nitrogênio para os diferentes genótipos (figura 9-A) e para as doses de N aplicadas (figura 9-B), indicando que não houve limitação da quantidade de nitrogênio para a microbiota presente no solo nos diferentes tratamentos. Esse resultado teve uma correlação significativa (0,69345) com a quantidade de NH_4^+ disponível no solo, indicando que deve ter sido essa a forma de nitrogênio a suprir as necessidades da biomassa nesse elemento.

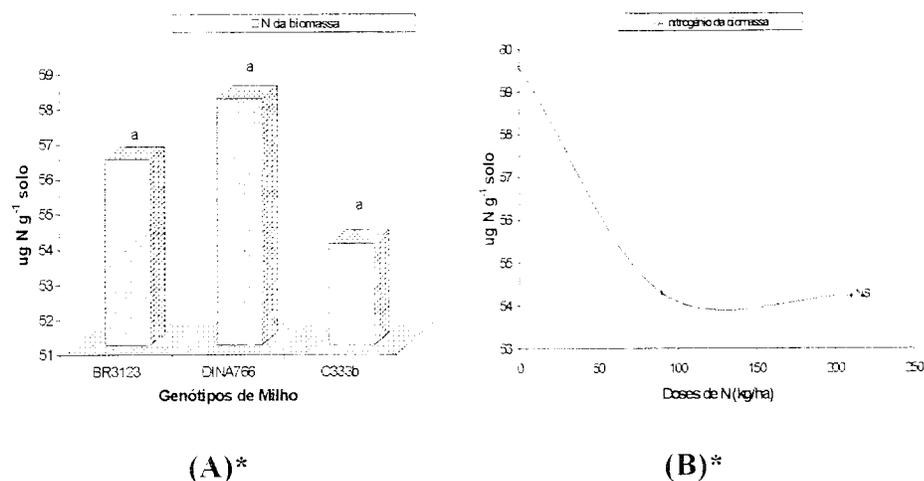


Figura 9 –Nitrogênio da biomassa microbiana em amostras de solo sob os três genótipos de milho, independentemente da dose de uréia aplicada (A) e com três doses de N aplicadas, independentemente do genótipo de milho (B). *(A) Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% e (B) NS- regressão não significativa a 5%.

Os valores que representam a razão entre carbono e nitrogênio da biomassa estão apresentados no quadro 6. Houve uma interação estatisticamente significativa da relação C/N entre os tratamentos com dose de nitrogênio 210 kg/ha e o genótipo BR3123. Observou-se que nas amostras do solo cultivado com o genótipo BR3123 houve uma relação C/N da biomassa microbiana significativamente maior que as com os genótipos DINA766 e C333B quando a dose foi de 210 kg N ha⁻¹ (Figura 10).

O alto valor do coeficiente de variação (50%), fato comum em experimentos envolvendo microrganismos do solo, deve explicar a ausência de diferenças estatísticas significativas quando foram comparadas as médias gerais da relação entre carbono e nitrogênio da biomassa das amostras de solo sob cultivo de genótipos de milho independentemente das doses de nitrogênio aplicadas (figura 11-A). No entanto, a relação entre a razão C/N e as doses de uréia aplicadas foi explicada por uma equação linear representada pela figura 11-B, sendo que houve um aumento da relação C/N proporcional às doses de nitrogênio.

Quadro 6 - Relação C/N da biomassa microbiana em amostras de solo com três doses de nitrogênio e três genótipos de milho. Médias de 4 repetições.

DOSES DE N kg/ha	GENÓTIPOS DE MILHO		
	BR3123	DINA766	C333B
0	2,69 a	2,28 a	3,13 a
90	3,52 a	3,14 a	4,46 a
210	7,88 a	3,22 b	3,54 b

coeficiente de variação = 50%. Valores de mesma letra, na horizontal, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

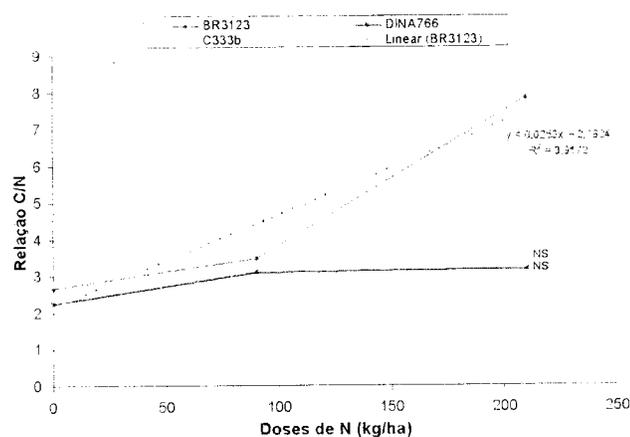


Figura 10. Relação entre carbono e nitrogênio da biomassa microbiana em amostras de solo com aplicação de três doses de N e sob o cultivo de três genótipos de milho. (*-regressão linear significativa a 5%).

Como visto anteriormente, os teores de carbono da biomassa microbiana foram significativamente diferentes entre os tratamentos, o que não ocorreu com os dados do nitrogênio da biomassa. Assim, o fato de a relação C/N ser diferente para os tratamentos que incluem doses de nitrogênio pode ser relacionado com as diferentes populações de microrganismos ativas, no momento da coleta do solo, em cada tratamento, levando-se em consideração que esses números referem-se apenas à biomassa microbiana e não à relação C/N total do solo. Isso significa que indicam a proporção entre carbono e nitrogênio existente no protoplasto microbiano do solo, que deve ser diferente para as diferentes populações ali existentes. Já foi determinado, por exemplo, que o protoplasto de bactérias tem um relação C/N de 4,5, enquanto que para os fungos esse valor é de 37,3 (Van Veen & Paul, 1979). Assim, pelas condições nutricionais em cada tratamento deste trabalho, ocorreria o desenvolvimento de diferentes comunidades microbianas, com diferentes relações C/N.

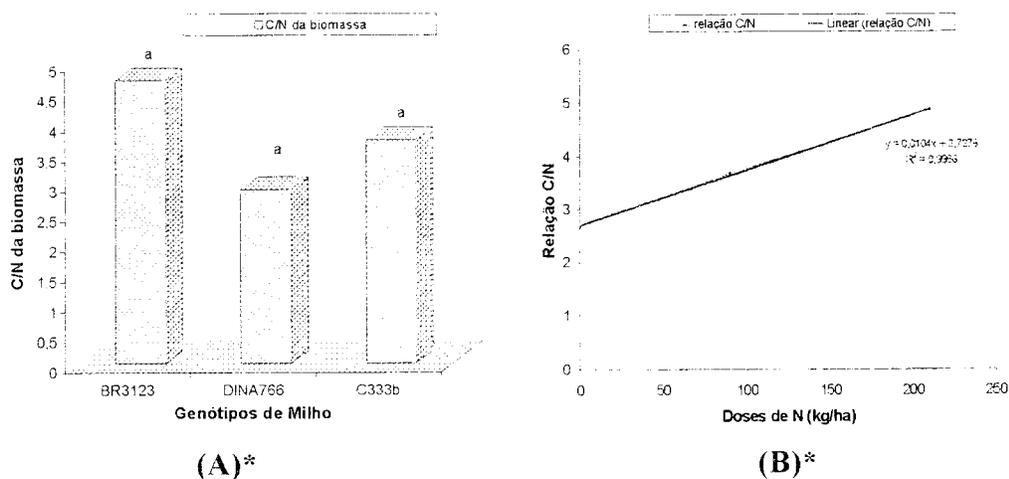


Figura 11 – Relação carbono e nitrogênio da biomassa microbiana do solo sob plantas com os três genótipos de milho, independentemente da dose de uréia aplicada (A) e com três doses de uréia aplicada, independentemente do genótipo de milho (B). *(A) Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% e (B) regressão linear significativa a 5%.

IV.1.4 Quantificação de Fungos Micorrízicos Arbusculares

Esporos de Fungos Micorrízicos Arbusculares

Esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) estiveram presentes em todos os tratamentos e os valores estão apresentados no quadro 7. Não houve variação significativa da quantidade de esporos em relação aos genótipos de milho estudados (figura 12-A). No entanto, houve uma variação bastante acentuada em relação às doses de nitrogênio, apresentando-se significativa a 1%. A análise de regressão revelou que quanto maior a dose de nitrogênio menor o número de esporos de fungos micorrízicos no solo (figura 12-B).

Os resultados mostraram que parece não ter havido influência dos genótipos de milho sobre a esporulação de FMAs. Esses dados estão de acordo com um estudo realizado por Pereira (1995), onde a densidade total de esporos no solo, antes e depois do cultivo não foi influenciada pelos genótipos de milho em nenhuma época de avaliação. No entanto, algumas espécies estudadas individualmente por Pereira (1995), como *Glomus etunicatum*, *Glomus macrocarpum* e *Scutellospora heterogama*, mostraram-se influenciadas pelos diferentes genótipos de milho durante o ciclo das plantas. Nesse trabalho não foram classificadas as espécies de FMA presentes.

Quadro 7- Número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares no solo dos tratamentos com três doses de nitrogênio e três genótipos de milho. Médias de 4 repetições.

DOSES DE N kg/ha	GENÓTIPOS DE MILHO		
	BR3123	DINA766	C333B
0	248,00	409,50	512,75
90	314,00	389,50	333,25
210	191,00	101,75	201,25

Coeficiente de variação =50,06%. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos pelo teste F.

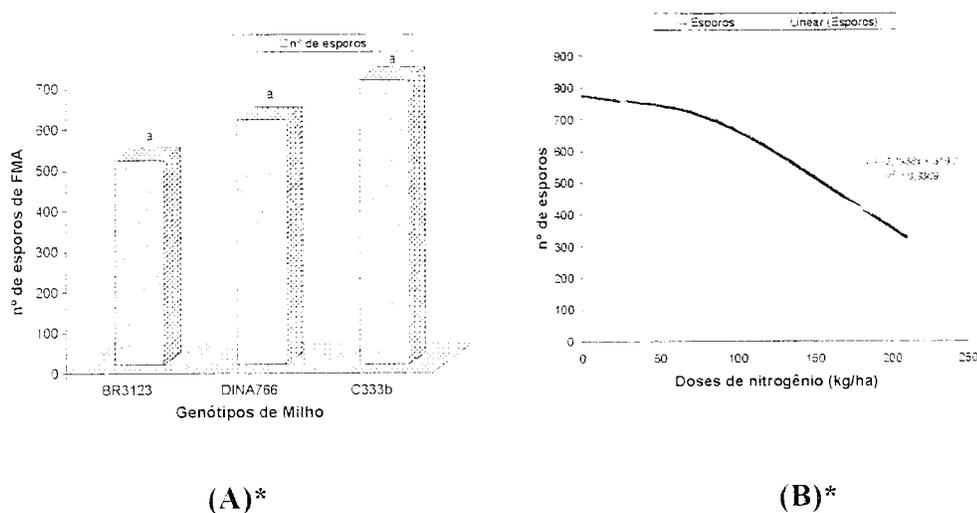


Figura 12- Número de esporos de fungos micorrízicos em amostras de solos sob cultivo dos três genótipos de milho, independentemente da dose de uréia aplicada (A) e três doses de N, independentemente do genótipo de milho (B). *(A) Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% e (B) regressão linear significativa a 5%.

O fato de esses esporos ocorrerem em maior número nas plantas onde foi aplicada menor quantidade de nitrogênio pode estar relacionado com o enfraquecimento da planta causado por uma desnutrição mineral (Clark, 1997) ou até mesmo um desbalanço nutricional. O fungo micorrízico mantém uma associação simbiótica com a planta. Associações entre FMAs e raízes de plantas têm particular importância quando se considera a nutrição de plantas por nutrientes pouco móveis, como o fósforo, além do NH_4^+ como fonte de nitrogênio (Frey & Schüepp, 1993). No entanto, o fungo também necessita de nutrientes fornecidos pela planta. Se ocorre um enfraquecimento da planta por uma desnutrição mineral o fungo também poderá ser comprometido, sendo que pode ocorrer uma maior esporulação do mesmo como fator de sobrevivência.

Colonização de Raízes por Fungos Micorrízicos Arbusculares

Hifas e outras estruturas de FMAs, como esporos e arbúsculos, estiveram presentes nas raízes de milho de todos os tratamentos e os valores encontram-se no quadro 8. Não houve diferença significativa para genótipos de milho (figura 13-A) nem a análise de regressão para as doses de nitrogênio revelou-se significativa (figura 13-B). Observando-se esses resultados, pode-se concluir que os diferentes tratamentos não estavam tendo influência sobre a colonização de FMAs na época da coleta, sendo que a colonização se apresentou alta para todos os tratamentos. Assim conclui-se que o nitrogênio não se apresentou em níveis excessivos que pudessem causar qualquer efeito deletério ao fungo, diferente do que citou Oaks (1992) em seu trabalho. Diferentemente, neste trabalho, pode-se concluir que a presença de estruturas de fungos micorrízicos nas raízes não foi limitada pela nutrição nitrogenada.

Estudos com FMAs e assimilação de nitrogênio em milho, após o período de seca (Subramanian & Charest, 1998), demonstraram que a colonização micorrízica por *Glomus intraradices*, em duas cultivares de milho, promoveu uma melhor condição nutricional de N, possivelmente pelo transporte de N no substrato pelas hifas do fungo. Estudos de Frey & Shuepp (1993) demonstraram essa habilidade de hifas de fungos micorrízicos em transportar nitrogênio inorgânico de distâncias consideráveis para a planta hospedeira. No entanto, a presença do FMA geralmente está mais associada com a baixa disponibilidade de fósforo no solo. Sendo este último um elemento pouco móvel, sua absorção pela planta se torna dependente desses fungos quando sua disponibilidade no solo é escassa. Porém, segundo Sieverding (1991), a presença de fungos micorrízicos nas raízes não indica sua taxa de atividade, tornando-se difícil concluir algo a esse respeito.

Quadro 8 – Porcentagem de comprimento de raiz colonizada por fungos micorrízicos arbusculares em raízes de milho cultivados com três doses de nitrogênio e três genótipos de milho. Médias de quatro repetições.

DOSES DE N (kg/ha)	GENÓTIPOS DE MILHO		
	BR3123	DINA 766	C333B
	%		
0	80,82	76,36	67,91
90	70,83	83,10	75,86
210	83,63	71,59	72,12

Coefficiente de variação=11,86%. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos pelo teste F.

Outro fator importante para essa análise é o fato de a taxa de colonização micorrízica ser variável de acordo com o ciclo da planta e outros fatores ambientais. Pereira (1995) observou diferenças nas taxas de colonização micorrízica para diferentes genótipos de milho em apenas quarenta dias após o plantio, nas análises feitas aos 70 e 105 dias após o plantio não mostraram essas diferenças. No presente trabalho, as amostragens foram feitas 60 dias após o plantio, para as análises de colonização radicular, e 90 dias, para as contagens de esporos.

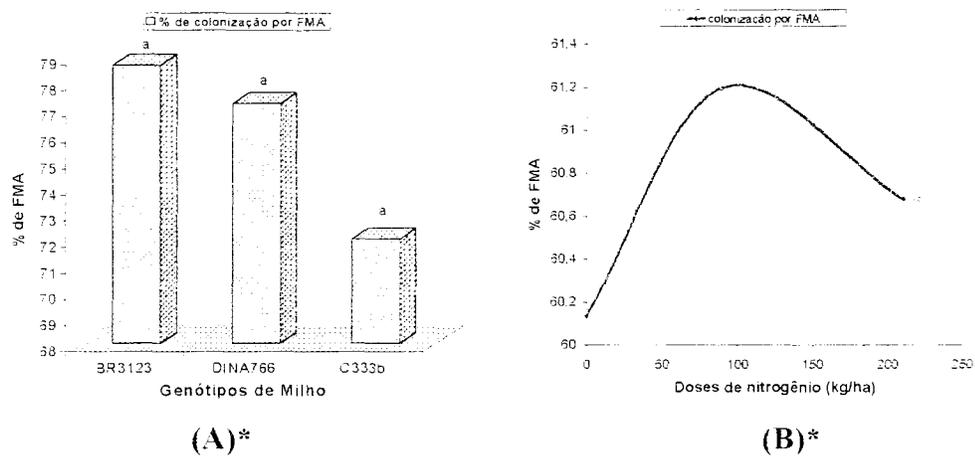


Figura 13 – Porcentagem de comprimento de raiz colonizada por fungos micorrízicos arbusculares em amostras de raízes de plantas de três genótipos de milho, independentemente da dose de N aplicada (A) e com três doses de N, independentemente do genótipo de milho (B). *(A) Valores seguidos de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% e (B) NS- regressão não significativa a 5%.

IV.1.5 Bactérias Diazotróficas Endofíticas

Foi constatada a presença de bactérias diazotróficas endofíticas nos três meios de cultura estudados, NFb, JNFb e LGI-P, semi-específicos para as três bactérias em estudo (*Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp. e *Gluconacetobacter diazotrophicus*, respectivamente) em todos os tratamentos, ou seja, nos três genótipos de milho (DINA766, BR3123 e C333B) e nas três doses de nitrogênio (0, 90 e 210 kg/ha). Os valores estão evidenciados no quadro 9, sendo que as populações de bactérias que cresceram no meio JNFb e NFb estiveram presentes em números da ordem de grandeza entre 10^7 e 10^8 células g^{-1} raiz e as bactérias que cresceram no meio semi-específico para *Gluconacetobacter diazotrophicus* ocorreram entre 10^6 e 10^8 células g^{-1} raiz.

As populações de bactérias que cresceram nos três meios de cultura não apresentaram variações significativas para quantidade de células g^{-1} raiz para nenhum dos tratamentos, ou seja, não se mostraram estatisticamente diferentes entre genótipos de milho (figura 14) e doses de nitrogênio (figura 15) ao nível de 5% de significância, indicando que o nitrogênio, bem como os genótipos de milho não parecem ter afetado as populações consideradas.

Os números de bactérias diazotróficas mostraram-se relativamente altos em relação a outros estudos. Segundo Döbereiner et al. (1995), existem 5 espécies de *Azospirillum* identificadas, sendo as mais estudadas *A. brasilense* e *A. lipoferum*. Essas espécies ocorrem em abundância em milho, trigo, arroz e sorgo, sendo que números na faixa de 10^6 células g^{-1} raízes e solo foram encontrados durante o ciclo vegetativo de milho cultivado em regiões tropicais.

Barraquio et al. (1997) isolaram bactérias diazotróficas endofíticas de diferentes genótipos de arroz, encontrando de 10^5 a 10^8 células g^{-1} raiz, com diferenças significativas entre os genótipos, diferente do que ocorreu com os genótipos de milho neste trabalho.

Quadro 9- Números de bactérias diazotróficas endofíticas em raízes de três genótipos de milho com as três doses de nitrogênio. Médias originais de quatro repetições.

DOSES DE N kg/ha	GENÓTIPOS		
	BR3123	DINA766	C333B
Meio semi-específico para <i>Azospirillum</i> spp. (NFb)			
células g ⁻¹ raiz			
0	12,1 x 10 ⁷	6,80 x 10 ⁷	6,31 x 10 ⁷
90	9,92 x 10 ⁷	7,08 x 10 ⁷	11,7 x 10 ⁷
210	12,5 x 10 ⁷	14,6 x 10 ⁷	6,64 x 10 ⁷
Coeficiente de variação*: 11,7%			
Meio semi-específico para <i>Herbaspirillum</i> spp. (JNFb)			
células g ⁻¹ raiz			
0	13,9 x 10 ⁷	7,56 x 10 ⁷	5,02 x 10 ⁷
90	5,86 x 10 ⁷	5,88 x 10 ⁷	10,8 x 10 ⁷
210	7,77 x 10 ⁷	10,4 x 10 ⁷	9,00 x 10 ⁷
Coeficiente de variação*: 14%			
Meio semi-específico para <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (LGI-P)			
células g ⁻¹ raiz			
0	11,2 x 10 ⁷	9,82 x 10 ⁷	0,832 x 10 ⁷
90	8,96 x 10 ⁷	4,98 x 10 ⁷	2,16 x 10 ⁷
210	4,70 x 10 ⁷	7,26 x 10 ⁷	3,75 x 10 ⁷
Coeficiente de variação*: 18,55%			

*Coeficiente de variação referente à análise de variância com os dados transformados em log x. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos pelo teste F.

A possibilidade de diferentes genótipos de plantas poderem responder diferentemente à inoculação de *Azospirillum* também foi relatada em experimentos com

painço (Wani et al., 1984) e trigo em duas doses de nitrogênio (Millet et al., 1984) e em outros cereais (Holl, 1983). Boddey & Döbereiner (1995) citam efeitos significativos de genótipos de milho na resposta do seu crescimento pela inoculação de *Azospirillum* em um trabalho realizado na Argentina por Garcia em 1993. Em um estudo que envolveu a inoculação de *Azospirillum* spp. em 7 genótipos de milho, as respostas foram consistentes em dois experimentos de campo, sendo que alguns genótipos responderam diferentemente à inoculação dos isolados (Garcia de Salomone & Döbereiner, 1996). No entanto, Pereira (1995) não detectou diferenças significativas na porcentagem de ocorrência de bactérias diazotróficas em raízes para diferentes genótipos de milho, à semelhança do que foi observado neste trabalho. Reis Jr et al. (2000b) também não encontraram diferenças significativas entre o número de *Herbaspirillum* spp. e *G. diazotrophicus* encontrados colonizando quatro genótipos de cana-de-açúcar estudados.

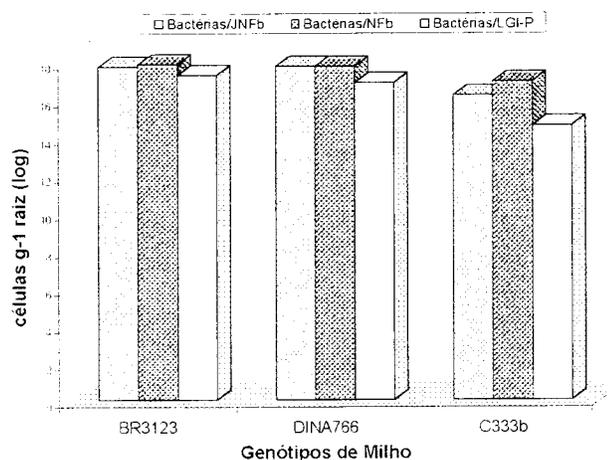


Figura 14 – Log do número de bactérias obtidas nos meios de cultura NFb, JNFb e LGI-P para os três genótipos de milho, independentemente das doses de N aplicadas (médias de quatro repetições, sem diferenças significativas a 5% pelo teste de Tukey)

Alguns trabalhos têm demonstrado que o aumento na dose de N adicionada como adubo pode diminuir a quantidade de microrganismos diazotróficos na raiz (Boddey et al., 1995), sendo, algumas vezes, fator seletivo, como sugerem certos estudos com *G.*

diazotrophicus (Caballero-Mellado et al., 1995). Kirchoff et al. (1997) isolaram bactérias diazotróficas endofíticas de *Pennisetum purpureum*, *Miscantus sinensis*, *Miscantus sacchariflorus* e *Spartina pectinata*, sendo que o número dessas bactérias variou de 10^2 a 10^6 células g^{-1} raiz e as maiores quantidades delas foram encontradas onde não houve aplicação de fertilizantes nitrogenados. Oaks (1992) faz considerações em relação aos efeitos deletérios que níveis excessivos de fertilizantes nitrogenados podem causar aos microrganismos benéficos do solo. Além dos rizóbios e de fungos micorrízicos, o autor cita ainda muitos microrganismos que mantêm interações e associações com plantas e que podem ser inibidos por altas doses de N

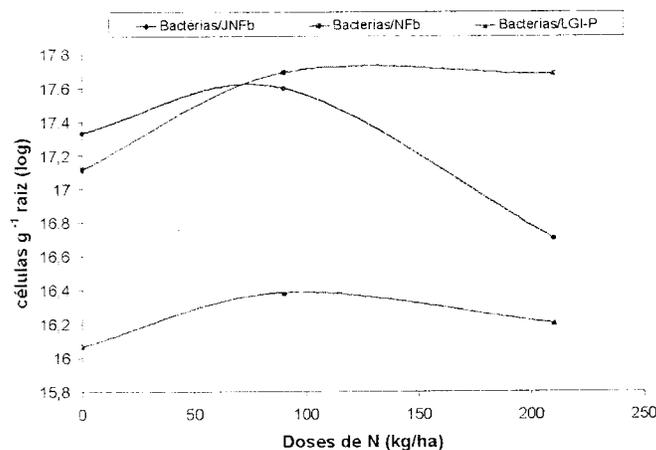


Figura 15 – Relação entre o log do número de bactérias obtidas nos meios de cultura NFb, JNFb e LGI-P e as três doses de N aplicadas no solo, independentemente do genótipo de milho (médias de 12 parcelas, análises de regressão não significativas a 5%).

Bhattarai & Hess (1998) demonstraram que, no crescimento de *Azospirillum* “in vitro”, a atividade da nitrogenase foi deprimida pela presença do nitrato. No entanto, a magnitude da depressão foi menor quando a bactéria estava crescendo em associação com a planta de trigo e o número de raízes aumentou significativamente em plantas em que as bactérias foram inoculadas, independentemente da concentração de nitrato no meio. Em um experimento com cultivares de trigo e várias doses de N, Reyders &

Vlassak (1982) mostraram um aumento na produção, pela inoculação de *Azospirillum*, independentemente da cultivar selecionada ou da dose de fertilizante nitrogenado aplicado, sendo esse aumento muito significativo. Da mesma maneira, Freitas et al. (1982) demonstraram um aumento na quantidade de N total em plantas de milho devido à inoculação com *Azospirillum*, não afetada pela aplicação de N na forma de NH_4NO_3 .

Segundo Pimental et al. (1991), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* foi encontrada causando infecção em cana de açúcar em países onde ocorrem aplicações de altos níveis de fertilizantes nitrogenados, mas isso não ocorreu em plantas testadas no Brasil em áreas de baixa aplicação do adubo. Em um outro estudo envolvendo cana de açúcar e diferentes doses de N, Muthukumarasamy et al. (1999) verificaram que *Herbaspirillum* spp. ocorreram em todas as doses de N amostradas, sendo que o nutriente não se apresentou como um fator limitante na associação da bactéria com a planta. O mesmo não ocorreu com *Gluconacetobacter diazotrophicus*, que só foi isolada onde a adubação nitrogenada foi menor que 275 kg/ha, sendo que os autores só conseguiram realizar a contagem dessas bactérias no caso das plantas não expostas a fertilizantes industrializados, isto é, somente onde foi usado o adubo orgânico para o cultivo. Os números estimados nestes cultivares indianos de cana foram de 10^6 a 10^7 células g^{-1} raiz. O mesmo efeito ocorreu num estudo similar realizado por Reis Jr. et al. (2000a) com essas duas bactérias. Os autores verificaram também variações no número de *Gluconacetobacter diazotrophicus* na mesma cultivar ao longo do tempo e sugeriram que pudessem ser explicadas pelas mudanças de fatores ambientais, como, por exemplo, as chuvas. Fuentes-Ramirez et al. (1993) também encontraram as menores frequências de isolamento de *G. diazotrophicus* em cana de açúcar em níveis mais altos de N (275-300 kg/ha), enquanto que os valores mais altos de isolamento ocorreram em plantas cultivadas com 120 kg de N/ha. Esse mesmo resultado foi encontrado em outro trabalho, onde plantas de cana de açúcar que receberam inóculos de uma linhagem de *G. diazotrophicus* e foram submetidas a doses de fertilizante nitrogenado (Fuentes-Ramirez et al., 1999). Muthukumarasamy et al. (1999) sugeriram que isso pode não ser um efeito negativo direto do nitrogênio sobre a presença das bactérias, já que *G. diazotrophicus* continua fixando nitrogênio em meio de cultura com altas concentrações de NO_3^-

(60mM), sendo provável que o estado fisiológico da planta seja alterado pelo N e subseqüentemente a bactéria seja afetada. Os níveis de NO_3^- disponíveis para a planta de cana de açúcar podem aumentar ou diminuir a quantidade de sacarose, dependendo da cultivar (Abellan et al., 1994). Swedrzynska & Sawicka (2001) concluíram que a aplicação de doses de 100 e 200 kg de nitrogênio mineral por hectare, no cultivo de milho, favoreceu a multiplicação de *Azospirillum brasilense* nas plantas.

Como se observa pelo que foi apresentado, nos casos em que o nitrogênio inibiu a presença de bactérias diazotróficas endofíticas, a dose de adubo no solo foi sempre superior a 275 kg N ha⁻¹. Neste trabalho, a dose máxima de N aplicada foi 210 kg ha⁻¹, o que pode ser um dos fatores a explicar a ausência de efeito do nitrogênio sobre o número de bactérias. Essa ausência de efeito foi comprovada pelas análises de regressão apresentadas na figura 15.

O fato de não terem ocorrido diferenças significativas entre o número de bactérias diazotróficas endofíticas para os diferentes tratamentos pode indicar que os tratamentos não foram limitantes para a ocorrência dessas bactérias; no entanto esse fato não indica, necessariamente, que as relações de interação entre as plantas e os microrganismos sejam as mesmas em todos os tratamentos.

Isolamento de Bactérias Diazotróficas Endofíticas

Inicialmente foram obtidos 122 isolados de bactérias diazotróficas no meio JNFb, 146 isolados no meio NFb e 99 isolados no meio LGI-P. Contudo, esses meios de cultura não são totalmente específicos para as bactérias cujo isolamento se pretendia, tendo-se observado enorme variedade de isolados obtidos a partir dos meios de cultura utilizados para a quantificação das bactérias, na primeira etapa deste trabalho.

Essas bactérias foram isoladas pela repicagem em meio semi-sólido (três vezes), crescimento em meio sólido e purificação em meio de batata. Döbereiner et al. (1995), em livro dedicado à metodologia de isolamento, quantificação e avaliação de bactérias

diazotróficas endofíticas, recomendam uma única passagem pelo meio semi-sólido, mas, neste trabalho, optou-se por três passagens para confirmar a pureza das culturas obtidas.

Dentre os 99 isolados do meio LGI-P, apenas 27 apresentaram as características semelhantes a *Gluconacetobacter diazotrophicus* padrão Pal5^T Br11281 (pequenas, úmidas e de cor laranja) em meio LGI-P sólido com extrato de levedura. Quando purificados em meio de batata-P nenhum dos isolados apresentou a cor chocolate, constatando-se a ausência de *Gluconacetobacter diazotrophicus* nas amostras estudadas.

Os isolados bacterianos obtidos nos meios de cultura semi-específicos para *Azospirillum* spp. e *Herbaspirillum* spp. não apresentaram características tão bem definidas, nos meios sólido e batata, como as apresentadas na literatura e a observação ao microscópio óptico tornou-se dificultada pelo fato de *Herbaspirillum* spp. e *Azospirillum* spp. serem muito parecidos. Assim, o procedimento para isolamento foi repetido várias vezes, ainda que não especificamente recomendado por Döbereiner et al. (1995). Em seguida, uma vez que se observou crescimento em todas essas condições, os isolados foram repicados para meio JFNb com três vezes a concentração de azul de bromotimol, em diferentes valores de temperatura e pH. Todas as bactérias foram novamente repicadas em meio JNFb (com exceção das isoladas do meio LGI-P) com três vezes a concentração de bromotimol e foram incubadas por mais tempo que o indicado. A partir de 12 dias de incubação as características de *Herbaspirillum* spp. tornaram-se mais marcantes, com o centro da colônia ficando verde-azulado. Porém, alguns isolados, inclusive o padrão Z-67 (ATCC 35892), não modificaram o pH do meio de cultura conforme está relatado por Döbereiner et al. (1995) e seus centros tornaram-se amarelados. Isso sugere um comportamento inconstante das bactérias em estudo, o que dificulta os trabalhos com esse grupo.

Observaram-se também as características de colônia para identificar *Azospirillum* spp. Nessa etapa, analisando-se apenas características de colônias nesse meio de cultura, outros isolados foram excluídos dos meios JNFb e NFB, restando, no total, 62 isolados.

Foi feita também uma observação ao microscópio óptico dos isolados dos meios JNFb e NFB e a diferenciação de *Azospirillum* spp. e *Herbaspirillum* spp. foi feita pelo uso do contraste de fase, onde os isolados de *Azospirillum* spp. apresentam-se brilhantes

por refletirem a luz devido à presença de grânulos de poli-hidroxi-butirato (PHB) em suas células.

Os isolados obtidos dos meios NFb para *Azospirillum* spp. (nomeados AM) e JNFb para *Herbaspirillum* spp. (nomeados HM) estão relacionados nos quadros 10, 11 e 12, de acordo com os tratamentos de origem.

Como se observa, analisando-se os resultados do isolamento, o número de isolados obtidos, das bactérias estudadas, foi pequeno em relação ao número de bactérias diazotróficas endofíticas quantificadas nos meios semi-sólidos seletivos pelo método do número mais provável. Com isso, pode-se afirmar que os meios de cultura apresentados na literatura como seletivos para algumas bactérias, são na realidade meios semi-específicos para as bactérias estudadas e isso vem a confirmar as considerações feitas por Reis et al. (2000) a respeito do método. Segundo esses autores, esse método apresenta uma série de dificuldades, sendo que, como há poucas informações sobre as fontes de carbono disponíveis, pH, pressão osmótica e outras condições predominantes na rizosfera da planta ou em suas raízes e seus tecidos, a composição desses meios seletivos, usados para o método, é baseada parcialmente em suposições. Apesar disso, o método vem sendo usado por muitos autores para a estimativa da ocorrência dessas bactérias (Baldani et al., 1992; Reis et al., 1994; Machado et al., 1998; Baldani et al., 2000; Reis Jr et al., 2000a,b).

Ainda, quanto às dificuldades para a quantificação de bactérias diazotróficas endofíticas, existem vários trabalhos que comparam diferentes métodos de quantificação e mostram que há diferenças muito discrepantes nos resultados encontrados. Além do NMP, um outro método utilizado para a quantificação dessas bactérias é o ELISA (“enzyme linked immunosorbent assay”), um método imunológico. Esse método estimou sempre uma quantidade maior de bactérias do que a determinada pelo número mais provável, de 2 a 1400 vezes maior no caso de *G. diazotrophicus* e de 2 a 225 vezes maior no caso de espécies de *Herbaspirillum*, num estudo realizado por Silva et al. (1998).

Utilizando-se do método do número mais provável, Stoltzfus et al. (1997) encontraram uma grande quantidade de bactérias diazotróficas endofíticas colonizando o

interior de diversos genótipos de plantas de arroz. No entanto, quando aplicaram o método da redução de acetileno (ARA) e PCR para amplificação de fragmentos específicos do DNA (região *nifD*), concluíram que apenas 10% eram bactérias diazotróficas.

Quadro 10 – Isolados de bactérias diazotróficas endofíticas obtidos na raiz do genótipo de milho C333b.

Dose de N	<i>Herbaspirillum</i> spp.	<i>Azospirillum</i> spp.
Dose 0 (kg N ha⁻¹)	HM-7A	AM-14
	HM-7B	AM-15
	HM-8	
Dose 90 (kg N ha⁻¹)	HM-9	AM-16A
	HM-10	AM-16B
	HM-11	AM-17A
		AM-17B
Dose 210 (kg N ha⁻¹)	HM-12	AM-18A
		AM-18B
	HM-13	AM-18C
		AM-18D
		AM-18E
		AM-19A
		AM-19B

Quadro 11 - Isolados de bactérias diazotróficas endofíticas obtidos a partir do genótipo de milho DINA766.

Dose de N	<i>Herbaspirillum</i> spp.	<i>Azospirillum</i> spp.
Dose 0 (kg N ha⁻¹)	HM-2	AM-6A
	HM-3	AM-6B
		AM-6C
		AM-6D
Dose 90 (kg N ha⁻¹)	HM-4A	AM-7A
	HM-4B	AM-7B
	HM-5	AM-8
		AM-9A
		AM-9B
		AM-10A
		AM-10B
		AM-10C
		AM-10D
		AM-10E
Dose 210 (kg N ha⁻¹)	HM-6A	AM-11
	HM-6B	AM-12A
	HM-6C	AM-12B
		AM-12C
		AM-12D
		AM-13A
	AM-13B	
	AM-13C	

Quadro 12 - Isolados de bactérias diazotróficas endofíticas obtidos a partir do genótipo de milho BR3123.

Dose de N	<i>Herbaspirillum spp.</i>	<i>Azospirillum spp.</i>
Dose 0 (kg N ha⁻¹)	HM-1	AM-1A
		AM-1B
		AM-1C
		AM-1D
		AM-1E
		AM-2
Dose 90 (kg N ha⁻¹)		AM-3
Dose 210 (kg N ha⁻¹)		AM-4
		AM-5A
		AM-5B

IV.2 Experimentos em casa de Vegetação

O experimento com o genótipo DINA766 foi o primeiro a ser instalado em casa de vegetação e das observações visuais durante os primeiros 30 dias após sua instalação foram defenidas algumas mudanças para os experimentos seguintes. Poucas diferenças foram observadas entre as testemunhas absolutas e as plantas que receberam as bactérias, embora o controle positivo, que era irrigado com solução de Hoagland completa, começasse a se diferenciar do restante. Diante dessas observações, decidiu-se trocar a solução de Hoagland modificada, com 1/10 do N da solução completa, por uma solução sem nitrogênio, para a irrigação das plantas onde foram inoculados os isolados de bactérias e testemunhas absolutas.

No experimento com o genótipo C333b a solução de Hoagland foi substituída pela solução sem nitrogênio após 15 dias na casa de vegetação e nas plantas do genótipo BR3123 a solução sem nitrogênio foi aplicada desde o início.

Os valores obtidos para as análises das testemunhas com adição de nitrogênio foram significativamente muito maiores em relação as testemunhas absolutas e aos demais tratamentos. As diferenças entre as testemunhas absolutas e os tratamentos só foram evidenciados quando foi feita a comparação de médias pelo teste unilateral de Dunnett, sem que fossem incluídos os valores das testemunhas com adição de nitrogênio mineral. Essas análises estão apresentadas a seguir:

Experimento com o Genótipo DINA766

O quadro 13 apresenta os valores obtidos nas análises de matéria seca da parte aérea, teor de nitrogênio, nitrogênio acumulado e índice de eficiência de utilização de

nitrogênio (IEUN) para as plantas de milho do genótipo DINA766. Esses valores foram analisados pelo teste unilateral de Dunnett, sendo que as plantas que receberam os isolados de bactérias foram comparados com a testemunha absoluta.

Nas análises de matéria seca da parte aérea verificou-se que houve diferenças estatisticamente significativas entre três isolados bacterianos e a testemunha absoluta, sendo que a última apresentou uma massa de matéria seca maior do que as plantas que receberam os inóculos de bactérias. Esses isolados foram AM-12C, AM-12D (ambos de *Azospirillum* spp.) e HM-5 (de *Herbaspirillum* spp.). A inoculação do isolado AM-12C resultou em teor de nitrogênio na parte aérea significativamente maior que a testemunha. Esse resultado mostra que pode ter ocorrido um efeito de concentração, ou seja, o teor de nitrogênio se apresentou maior pelo fato de as plantas serem menores, ao contrário do que ocorreu no experimento com o genótipo BR3123 (ver pg 68), onde o teor de nitrogênio se apresentou menor pelo fato de as plantas terem maior massa de matéria seca. Os outros isolados (AM-12D e HM-5) não se mostraram diferentes da testemunha absoluta para a análise da quantidade de nitrogênio da parte aérea. Para esses três isolados o índice de eficiência de utilização de nitrogênio apresentou-se menor que o da testemunha absoluta, o que vem a confirmar o fato de que o nitrogênio da parte aérea não foi bem aproveitado pelas plantas que apresentaram pequeno crescimento em relação às testemunhas absolutas. Isso ocorreu mesmo para as plantas que receberam o isolado AM-12C e que apresentaram uma quantidade de nitrogênio maior do que a testemunha absoluta.

Ocorreram, porém, outros dois isolados inoculados em plantas desse genótipo que se mostraram significativamente diferentes da testemunha absoluta com teor maior de nitrogênio na parte aérea. Esses isolados foram os AM-12A e AM-8, ambos isolados de *Azospirillum* spp. As plantas que receberam o isolado AM-8 apresentaram um baixo índice de utilização de nitrogênio em relação à testemunha, apesar de a massa de matéria seca não ter sido significativamente diferente da testemunha. Isso mostra que também pode ter ocorrido apenas um efeito de concentração de nitrogênio, não indicando nenhum benefício propiciado à planta pelo isolado bacteriano.

Quadro 13. Massa da matéria seca da parte aérea, teor de nitrogênio da parte aérea, nitrogênio acumulado e IEUN (índice de eficiência de utilização do nitrogênio) para as plantas do genótipo DINA766. Médias de 5 repetições.

ISOLADO	MATÉRIA SECA	NITROGÊNIO	N acumulado	IEU nitrogênio ⁽¹⁾
	g	gN/kg ms	g/planta	g ² /g/planta
Testemunha	3,80	4,69	0,017774	815,95
AM-6A	3,72	4,70	0,017452	802,22
AM-6B	3,25	5,16	0,016158	677,99
AM-6C	3,37	5,36	0,017680	649,22
AM-6D	3,05	5,25	0,015893	587,57*
AM-7A	3,59	5,01	0,017970	718,14
AM-7B	3,46	4,90	0,016917	710,87
AM-8	3,11	5,64*	0,017805	553,02*
AM-9A	3,42	5,29	0,017418	694,11
AM-9B	3,26	5,20	0,016850	633,68
AM-10A	3,54	5,17	0,017931	711,94
AM-10B	3,51	5,13	0,017925	686,36
AM-10C	3,94	4,95	0,019482	799,26
AM-10D	3,13	5,52	0,016961	582,12*
AM-10E	3,71	4,80	0,016529	776,78
AM-11	3,50	5,12	0,017752	694,19
AM-12A	3,54	5,67*	0,020333	623,97
AM-12B	3,45	5,06	0,017830	682,88
AM-12C	2,86*	5,59*	0,015686	526,55*
AM-12D	2,88*	5,33	0,015198	545,05*
AM-13A	3,60	5,29	0,018848	691,36
AM-13B	3,47	4,97	0,017350	702,82
AM-13C	3,49	4,94	0,023210*	711,45
HM-2	3,55	5,05	0,017990	673,05
HM-3	3,58	5,06	0,018101	710,47
HM-4A	3,71	5,17	0,019109	721,76
HM-4B	3,51	5,17	0,018030	688,21
HM-5	2,58*	5,51	0,014133	472,62*
HM-6A	3,52	5,19	0,078083	686,44
HM-6B	3,63	5,11	0,018504	716,05
HM-6C	3,43	5,28	0,018082	654,69
SP-59b	3,83	4,84	0,017126	748,23
Z-67	3,57	4,89	0,020378	794,07
	CV: 15,48%	CV: 10,43%	CV: 19,29%	CV: 21,26%
	DMS 5%: 0,824	DMS 5%: 0,8115	DMS 5%: 0,00530	DMS 5%: 223,67

* - Significativamente maior que a testemunha pelo teste unilateral de Dunnett ao nível de 5%

♦ - Significativamente menor que a testemunha pelo teste unilateral de Dunnett ao nível de 5%

⁽¹⁾ Calculado segundo Siddiqi & Glass (1981)

Já as plantas que receberam o isolado AM-12A apresentaram um teor de nitrogênio da parte aérea mais alto do que o da testemunha, diferente da massa de matéria seca e índice de utilização de nitrogênio que não foram estatisticamente diferentes da mesma. Pode ser que esse isolado tenha contribuído para o ganho de nitrogênio dessas plantas pela fixação biológica de nitrogênio, embora não tenha sido suficiente para que o crescimento das mesmas se destacasse em relação às testemunhas e pudesse isentá-las dos sintomas de deficiência desse nutriente, observados visualmente.

O isolado AM-13C apresentou um teor de nitrogênio acumulado por planta significativamente maior que da testemunha absoluta e, embora as outras variáveis não tenham se diferenciado da testemunha absoluta, esse fator pode ser indicador de fixação biológica de nitrogênio.

As plantas que receberam os isolados AM-6D e AM-10D de *Azospirillum* spp. também apresentaram um baixo índice de eficiência de utilização do nitrogênio em relação à testemunha absoluta. Mesmo que a massa de matéria seca e teor de nitrogênio não tenham sido significativamente diferentes da testemunha, esse resultado mostrou que a quantidade de nitrogênio não foi bem aproveitada para o desenvolvimento das plantas.

Experimento com o Genótipo C333b

Os valores obtidos nas análises de matéria seca da parte aérea e teor de nitrogênio, N acumulado e o índice de eficiência de utilização do nitrogênio – IEUN para as plantas de milho do genótipo C333b estão apresentados no quadro 14.

Como se observa no quadro 14, não houve diferenças estatisticamente significativas entre as plantas que receberam inóculos dos isolados de bactérias e a testemunha absoluta. Esse resultado demonstra que nas condições em que foi desenvolvido o experimento, esses isolados não proporcionaram benefícios às plantas desse genótipo de milho. Com esse coeficiente de variação relativamente baixo (13,9%)

para experimentos com microrganismos de solo, a ausência de diferenças estatísticas entre os tratamentos não deixa dúvidas sobre o fato de que os isolados realmente não exerceram qualquer efeito sobre o acúmulo de matéria seca ou nitrogênio na planta.

Quadro 14. Massa de matéria seca da parte aérea, teor de nitrogênio da parte aérea, nitrogênio acumulado e índice de eficiência de utilização de nitrogênio para as plantas do genótipo C333b. Médias originais de 5 repetições.

ISOLADO	MATÉRIA SECA	NITROGÊNIO	N acumulado	IEU Nitrogênio ⁽¹⁾
	g	g N/kg ms	g/planta	g ² /g/planta
Testemunha	4,33	3,91	0,016904	1113,88
AM-14	4,32	4,00	0,017252	1084,84
AM-15	4,34	3,81	0,016568	1137,70
AM-16A	4,74	3,68	0,017461	1287,09
AM-16B	4,46	4,16	0,018442	1080,76
AM-17A	4,29	4,01	0,017174	1075,05
AM-17B	3,99	3,94	0,015706	1017,75
AM-18A	4,28	3,82	0,016305	1127,31
AM-18B	4,25	4,03	0,017062	1060,18
AM-18C	3,10	3,90	0,015548	1028,88
AM-18D	4,27	3,96	0,016807	1087,96
AM-18E	4,04	3,82	0,015369	1064,36
AM-19A	3,95	4,14	0,016031	985,07
AM-19B	3,84	4,01	0,015334	964,28
HM-7A	4,43	3,63	0,016097	1220,49
HM-7B	4,28	4,14	0,017635	1069,44
HM-8	4,08	3,77	0,015216	1100,15
HM-9	4,05	3,86	0,015548	1059,00
HM-10	4,40	3,66	0,016099	1201,49
HM-11	4,24	3,71	0,015715	1111,45
HM-12	3,78	3,94	0,014834	964,56
HM-13	4,08	3,82	0,015604	1069,22
SP-59b	3,90	3,99	0,015479	982,21
Z-67	4,39	4,01	0,017564	1096,52
	CV:13,94% DMS 5%: 0.852	CV: 7,26% DMS 5%: 0.44	CV:11,87% DMS 5%: 0.00302	CV:17,05% DMS 5%: 278.45

Não houve diferenças significativas entre os isolados e a testemunha absoluta pelo teste unilateral de Dunnett ao nível de 5%

⁽¹⁾ Calculado segundo Siddiqi & Glass (1981)

Experimento com o Genótipo BR3123

Os valores obtidos nas análises de matéria seca da parte aérea, teor de nitrogênio, nitrogênio acumulado e o índice de eficiência de utilização do nitrogênio (IEUN) para as plantas de milho do genótipo BR3123 estão apresentados no quadro 15.

Quadro 15. Massa de matéria seca da parte aérea, nitrogênio da parte aérea, nitrogênio acumulado e Índice de Eficiência de Utilização do Nitrogênio para as plantas do genótipo BR3123. Médias de 5 repetições.

ISOLADO	MATÉRIA SECA	NITROGÊNIO	N acumulado	IEU Nitrogênio ⁽¹⁾
	g	g N/kg ms	g/planta	g ² /g/planta
Testemunha	2,01	4,33	0,008653	466,54
AM-1A	2,10	4,26	0,008834	503,77
AM-1B	2,05	4,14	0,020944*	498,27
AM-1C	2,37	3,91	0,009270	608,80
AM-1D	2,10	3,79	0,007994	555,26
AM-1E	2,37	3,91	0,009218	610,66
AM-2	2,15	3,92	0,008306	563,17
AM-3	1,88	4,69	0,008334	429,73
AM-4	2,25	4,16	0,009377	541,05
AM-5A	2,38	4,01	0,009473	567,54
AM-5B	2,23	3,90	0,008675	453,10
HM-1	2,71*	3,56*	0,009720	784,44*
SP-59b	2,27	4,17	0,009469	553,97
Z-67	2,55	3,71	0,009494	689,46*
	C V: 16,03% DMS 5%:0,565	CV: 10,56% DMS 5%:0,66953	CV:74,74% DMS 5%: 0,01156	CV:23,43% DMS 5%:205,99

* - significativamente maior que a testemunha pelo teste unilateral de Dunnett ao nível de 5%

* - significativamente menor que a testemunha pelo teste unilateral de Dunnett ao nível de 5%

⁽¹⁾ Calculado segundo Siddiqi & Glass (1981)

Como se observa no quadro 15, apenas um isolado apresentou-se estatisticamente diferente da testemunha absoluta a 5% de significância para a massa de matéria seca e nitrogênio da parte aérea. Esse isolado, HM-1, foi caracterizado como sendo do gênero *Herbaspirillum* spp. pelas análises morfológicas macro e microscópicas. O teor de

nitrogênio presente na matéria seca apresentou-se inversamente proporcional à massa de matéria seca da parte aérea da planta para esse isolado, ou seja, as plantas que receberam o inóculo de HM-1 cresceram mais, mas, no entanto, o teor de nitrogênio na parte aérea dessas plantas foi menor do que na testemunha absoluta. Isso demonstra um possível efeito de diluição, levando-se a acreditar na hipótese de que o isolado obtido pode ter contribuído de alguma forma para o maior crescimento das plantas, não necessariamente pela fixação biológica do nitrogênio. Esse fato pode ser confirmado quando se observam os dados referentes ao IEUN: plantas que receberam esse inóculo de HM-1 apresentaram um alto índice de eficiência de utilização do nutriente; portanto, ainda que o teor de nitrogênio da parte aérea seja menor que o da testemunha, a matéria seca da planta foi maior, indicando que esse crescimento não tenha sido limitado pelo nitrogênio absorvido mas, pelo contrário, tenha sido estimulado por algum outro fator.

O isolado Z-67 de *Herbaspirillum seropedicae* também apresentou maior índice de eficiência de utilização de nitrogênio em relação à testemunha absoluta, embora as outras variáveis não tenham sido estatisticamente diferentes da testemunha. Isso faz supor o envolvimento de algum outro fator, ligado à utilização do nitrogênio, mas não à sua fixação.

Karpati et al. (2000) investigaram o efeito da associação de bactérias diazotróficas no crescimento de genótipos de plantas de trigo e arroz. À semelhança do que ocorreu neste trabalho, os autores verificaram que o isolado de *Herbaspirillum seropedicae* foi eficiente apenas em um genótipo de arroz, sendo capaz de aumentar a matéria seca da parte aérea das plantas em 15%. Neste trabalho o isolado HM-1 (de *Herbaspirillum* spp.) foi capaz de aumentar a matéria seca em 34,8 % de plantas do genótipo BR3123 de milho, que representa um ganho considerável. Por outro lado, o isolado AM-13C (de *Azospirillum* spp.) do genótipo DINA766 não promoveu maior crescimento das plantas em relação a testemunha absoluta, mas aumentou significativamente o teor de nitrogênio acumulado por planta em 14,4%.

Há relatos também de aumento da produção de grãos por plantas de trigo que receberam inóculo de bactérias diazotróficas: Swdrynska (2000) observou um aumento

de 27% na produção de plantas de trigo pela inoculação de *Azospirillum brasilense* embora não tenha sido observada a fixação de nitrogênio.

Karpati et al. (2000) verificaram também que a inoculação de *A. brasilense* e *H. seropedicae* teve um efeito prejudicial para o crescimento de plantas da cultivar Ringola de arroz. Esse fato também foi observado neste trabalho com a inoculação dos genótipos AM-12C e AM-12D de *Azospirillum* spp. e HM-5 de *Herbaspirillum* no genótipo DINA766 de milho. Como se vê, diazotróficos endofíticos também podem ter efeito patogênico, de forma não definida, sobre as plantas.

Embora poucos, há trabalhos dedicados à interação de plantas de milho e bactérias diazotróficas endofíticas. Riggs et al. (2001) pesquisaram a associação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL15) e o isolado Z152 de *H. seropedicae* e plantas de milho na presença e ausência de fertilizante nitrogenado. Os autores observaram aumentos significativos no crescimento de milho onde foi acrescentado o fertilizante nitrogenado e a inoculação de bactérias diazotróficas que haviam sido isoladas de genótipos de milho eficientes, ou seja, produtivos mesmo na ausência de nitrogênio. No entanto, nenhum isolado foi capaz de reverter os sintomas de deficiência de nitrogênio de plantas não fertilizadas, semelhantemente ao que foi observado neste trabalho.

A eficiência, isto é, a produtividade mesmo em condições de deficiência de nitrogênio, parece selecionar bactérias benéficas, se for considerado que seu benefício seja exercido pela fixação de nitrogênio. Nesse caso, a aplicação de altas doses de fertilizante nitrogenado resultaria na ausência de bactérias fixadoras, conforme observado por Okon & Labandera-Gonzalez (1994) e Riggs et al. (2001). Neste trabalho, no entanto, os isolados benéficos originaram-se dos genótipos BR3123, de baixa eficiência, e DINA766, de média eficiência, ou seja, de plantas selecionadas para produtividade em presença de fertilizante nitrogenado. O genótipo C333b, de alta eficiência, não resultou no isolamento de nenhuma bactéria benéfica. Isso faz supor que o benefício proporcionado pelos isolados obtidos não esteja ligado à fixação de N, o que já foi discutido para o isolado HM-1 e Z-67 no genótipo BR3123.

V. CONCLUSÕES

A aplicação de uréia e o plantio de diferentes genótipos de milho afetaram os valores do carbono e da relação C/N da biomassa microbiana e o número de microrganismos nitrificadores. No entanto, a atividade microbiana medida pela liberação de CO₂ não se mostrou diferente nos tratamentos avaliados.

O genótipo BR3123 interagiu significativamente com a microbiota, principalmente na presença de maior dose de N, favorecendo o aumento dos valores de algumas variáveis analisadas, diferentemente dos outros genótipos, que não apresentaram essa interação.

A colonização do milho por FMA não sofreu influência dos tratamentos, mas a esporulação do fungo foi estimulada na ausência de nitrogênio.

Não houve correlação entre a colonização radicular por fungos micorrízicos arbusculares e a ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas.

A ocorrência de microrganismos diazotróficos endofíticos não foi influenciada pelas doses de nitrogênio e genótipos de milho. Das três bactérias estudadas não foram obtidos isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

O isolado HM-1, do genótipo BR3123, apresentou benefício às plantas aumentando a massa de matéria seca e o AM-13C, do genótipo DINA766, aumentou o nitrogênio acumulado por planta, porém não conseguiram isentar as plantas dos sintomas de deficiência de nitrogênio.

VI. BIBLIOGRAFIA CITADA

- Abellan, I. P.; Armas Urquiza, R.; Valadier, M-H., Champigny, M.L. (1994). Short term effect of nitrate on carbon metabolism of two sugarcane cultivars differing in their biomass production. **Phytochemistry** **36**:819-823.
- Albrecht, S. L.; Okon, Y.; Lonquist, J. & Burris, R. H. (1981). Nitrogen fixation by corn-*Azospirillum* associations in a temperate climate. **Crop Science**, **21**:301 - 306.
- Alexander, M & Clark, E. (1979) Nitrifying bacteria. In: Black, C. A. Methods of soil analysis, 1477p.
- Andrade, D. S.; Miyzawa, M. & Hamakawa, P. J. (1994). Microorganismos amonificadores e nitrificadores. In: Hungria, M. & Araújo, R.S. Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia. Brasília: EMBRAPA-SPI.
- Arshad, M. & Frankenberger Jr, W. T. (1998). Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. **Advances in Agronomy**, **62**:45-151.
- Bagayoko, M.; George, E.; Romheld, V. & Buerkert, A. B. (2000). Effects of mycorrhizae and phosphorus on growth and nutrient uptake of millet, cowpea and sorghum on a West African soil. **Journal of Agricultural Science**, **135**:399-407.
- Baldani, J. I.; Baldani, V. L. D.; Seldin, L. & Döbereiner, J. (1986). Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., esp. nov. a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **36**(1): 86-93.

- Baldani, J. I.; Caruso, L.; Baldani, V.L.D., Goi, S.R. & Döbereiner, J. (1997). Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, **29**(5-6): 911-922.
- Baldani, V.L.D.; Baldani, J.I. & Döbereiner, J. (2000). Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, **30**:485-491.
- Baldani, V.L.D.; Baldani, J. I., Olivares, F.& Döbereiner, J. (1992). Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, **13**:65-73.
- Balota, E. L.; Colozzi-Filho, A.; Andrade, D.S. & Hungria, M. (1998). Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, **22**:641-649.
- Balota, E. L.; Lopes, E. S.; Hungria, M. & Döbereiner, J. (1995). Interactions and physiological effects of diazotrophic bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in cassava plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **30**(11): 1335-1345.
- Balota, E. L.; Lopes, E. S.; Hungria, M. & Döbereiner, J. (1999). Occurrence of diazotrophic bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on the cassava crop. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **34**(7): 1265-1276.
- Barraquio, W. L.; Revilla, L. & Ladha, J. K. (1997). Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant and Soil**, **194**:15-24.
- Bhattarai, T. & Hess, D. (1998). Growth and yield responses of a nepalense spring wheat cultivar to the inoculation with nepalense *Azospirillum* spp. at various levels of N fertilization. **Biology and Fertility of Soils**, **26**: 72-77.
- Boddey, R. M. & Döbereiner, J. (1995). Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. **Fertilizer Research**, **42**: 241-250.

- Boddey, R. M.; Oliveira, O. C.; Urquiaga, S.; Reis, V. M.; Olivares, F. L.; Baldani, V.L.D. & Döbereiner, J. (1995). Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, **174**: 195-209.
- Boddey, R. M.; Urquiaga, S.; Reis, V. & Döbereiner, J. (1991). Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. **Plant and Soil**, **137**: 111-117.
- Bremner, J. M. (1965). Total nitrogen. In: Black, C. A. Methods of soil analysis. Madison: American Society of Agronomy. p.1149-1178.
- Boucher, A.; Dalpe, Y & Charest, C. (1999). Effect of arbuscular mycorrhizal colonization of four species of *Glomus* on physiological responses of maize. **Journal of Plant Nutrition**, **22**(4-5): 783-797.
- Brookes, P. C.; Landman, A.; Pruden, G. & Jenkinson, D. S. (1985). Chloroform fumigation ant the release of soil nitrogen: a rapid direct extration method to measure microbial biomass nitrogen in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, **17**:837-842.
- Caballero-Mellado, J.; Fuentes-Ramirez, L. E.; Reis, V. M.; Martinez-Romero, E. (1995). Genetic struture of *Acetobacter diazotrophicus* populations and identification of a new genetically distant group. **Applied and Environmental Microbiology**, **61**: 3008-3013.
- Cardoso, E. J. B. N. (1992). Ecologia microbiana do solo. In: Cardoso, E. J. B. N.; Saito, S. M. T.; Neves, M. C. P.. Microbiologia do Solo, Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 360p.
- Cavalcanti, V. A. & Döbereiner, J. (1988). A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, **108**:23-31.
- Cerri, C. C.; Andreux, F. & Eduardo, B. P. (1992). O ciclo do Carbono do solo. In: Cardoso, E. J. B. N.; Saito, S. M. T.; Neves, M. C. P.. Microbiologia do Solo, Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 360p.

- Chu, E. Y.; Oliveira, A. M. G.; Rech, T. D.; Tapia- Hernandez, A.; Paula, M. A.; Monteiro, E. M. D. & Döbereiner, J. (1998). Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi and of *Azotobacter paspali* in *Paspalum notatum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **33**(6): 1001-1004.
- Clark, R. B. (1997). Arbuscular mycorrhizal adaptation, spore germination, root colonization, and host plant growth and mineral acquisition at low pH. **Plant and Soil**, **192**:15-22.
- Coelho, A. M. & França, G. E. (1995). Seja o doutor do seu milho: nutrição e adubação. **Arquivo do Agrônomo**, **2**: 1-9.
- Döbereiner, J.; Baldani, V. L. D.; Baldani, J. I. (1995). Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPAB, 60p.
- Duarte, A. P. & Paterniani, M. E. A.G. Z. (1998). Cultivares de milho no Estado de São Paulo: resultados das avaliações regionais IAC/CATI/EMPRESAS. **Documentos do IAC**, **62**, 81p.
- Duarte, A. P. & Paterniani, M. E. A.G. Z. (2000). Fatores bióticos e abióticos em cultivares de milho e estratificação ambiental: avaliação IAC/ CATI/ EMPRESAS – 1999/2000. Série de Pesquisa Apta, Boletim científico, 05, 150p.
- Franke-Snyder, M.; Douds, D. D.; Galvez, L.; Phillips, J. G.; Wagoner, P.; Drinkwater, L. & Morton, J. B. (2001). Diversity of communities of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi present in conventional versus low-input agricultural sites in eastern Pennsylvania, USA. **Applied Soil Ecology**, **16**(1):35-48.
- Freitas, J. L. M.; Rocha, R. E. M.; Pereira, P. A. & Döbereiner, J. (1982). Matéria orgânica e inoculação com *Azospirillum* na incorporação do N pelo milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **17**(10): 1423-1432.
- Frey, B. & Shüepp, H. (1993). Acquisition of nitrogen by external hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Zea mays* L. **New Phytologist**, **124**: 221-230.

- Fuentes-Ramirez, L. E.; Caballero-Mellado, J.; Sepúlveda, J.; & Martínez-Romero, E. (1999). Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. **FEMS Microbiology and Ecology**, **29**:117-128.
- Fuentes-Ramirez, L. E.; Jimenez-Salgado, T.; Abarca-Ocampo, R. & Caballero-Mellado, J. (1993). *Acetobacter diazotrophicus* an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. **Plant and Soil**, **154**:145-150.
- Garcia de Salomone, I. & Döbereiner, J. (1996). Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biology and Fertility of Soils**, **21**:193-196.
- Gerdermann, J.W. & Nicolson, T.H. (1963). Espores of micorrhizal endogone species extrated from soil by wet-siening and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, **46**:235-244.
- Gillis, M.; Kersters, K; Hoste, B.; Janssens, D.; Kroppenstedt, R. M.; Stephan, M. P.; Teixeira, K.R.S.; Döbereiner, J. & De Ley, J. (1989). *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov, a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **39**(3):361-364.
- Giovannetti, M. & Mosse, B. (1980). An evolution of tecniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, **84**: 489-500.
- Gomes, F. P. (1976). Curso de estatística experimental. 6ed- Livraria Nobel S.A., Piracicaba.
- Grisi, B. M. (1984). Metodologia na determinação de biomassa microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, **8**: 167-172.
- Gryndler, M. & Hrselova, H. (1998). Effect of diazotrophic bacteria isolated from a mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi on colonization of maize roots by *Glomus fistulosum*. **Biologia Plantarum**, **41**(4): 617-621.

- Guckert, A.; Breisch, H & Reisinger, O. (1975). Interface soil-racine. I. Étude ou microscope eletronique des relations mucigel-argile-microorganisms. **Soil Biology and Biochemistry**, 7:241-250.
- Halvorson, H. O. & Ziegler, N. R. (1932). Application of statistics to problems in bacteriology. I. A means of determining bacterial population by the dilution method. **Journal of Bacteriology**, XXV: 101-102.
- Hoagland, D. R. & Arnon, D. I. (1950). The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experimental Station Circular. Universidade da California.
- Holl, F. B. (1983). Plant Genetics: Manipulation of the host. **Canadian Journal of Microbiology**, 29:945-953.
- Isopi, R.; Fabbri, P.; Gallo, M. & Puppi, G. (1995). Dual inoculation of *Sorghum bicolor* (L) Moench esp. bicolor with Vesicular Arbuscular Mycorrhizas and *Acetobacter diazotrophicus*. **Symbiosis**, 18: 43-55.
- James, E. K.; Olivares, F. L.; Baldani, J. I. & Döbereiner, J. (1997). *Herbaspirillum*, an endophytic diazotrophic colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* (L) Moench. **Journal of Experimental Botany**, 48(308): 785-797.
- Jarvis, S. C.; Stockdale, E. A.; Shepherd, M. A. & Powlson, D. A. (1996) Nitrogen mineralization in temperate agricultural soils: processes and measurement. **Advances in Agronomy**, 57: 187-235.
- Jenkinson, D. S. (1988). Determination of microbial biomass carbon and nitrogen in soils. In: Wilson, J. R. Advances in Nitrogen Cycling Agricultural Systems. Wallingford: CAB international, p. 368-386.
- Karpati, E.; Rethati, B.; Dallmann, K.; Simon, I. K.; Balint, A.; Szajani, B. & Orosz, L. (2000). Study of wheat and rice cultivars in association with nitrogen-fixing bacteria. **Novenytermeles**, 49(3) 233-244.

- Kirchhof, G.; Baldani, J. I.; Reis, V. M. & Hartmann, A. (1998). Molecular assay to identify *Acetobacter diazotrophicus* and detect its occurrence in plant tissues. **Canadian Journal of Microbiology**, **44**: 12-19.
- Kirchhof, G.; Reis, V. M.; Baldani, J.I.; Eckert, B.; Döbereiner, J. & Hartmann, A. (1997). Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. **Plant and Soil** **194**: 45-55.
- Liu, A.; Hamel, C.; Hamilton, R.I. & Smith, D. L. (2000). Mycorrhizae formation and nutrient uptake of new corn (*Zea mays* L.) hybrids with extreme canopy and leaf architecture as influenced by soil N and P levels. **Plant and Soil**, **221**(2): 157-166.
- Lovell, R. D. & Hatch, D. J. (1998). Stimulation of microbial activity following spring applications of nitrogen. **Biology and Fertility of Soils**, **26**: 28-30.
- Lupwayi, N. Z.; Rice, W. A. & Clayton, G. W. (1998). Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation. **Soil Biology and Biochemistry**, **30**: 1733-1741.
- Ma, L.; Lindau, C. W.; Hongprayoon, C.; Burhan, N.; Jang, B.C.; Patrick, W. H. & Selim, H. M. (1999) Modeling urea, ammonium and nitrate transport and transformations in flooded soil columns. **Soil Science**, **164**(2):123-132.
- Machado, A. T.; Sodek, L.; Döbereiner, J. & Reis, V. M. (1998). Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho nitroflint. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **33**(6):961-970.
- Malavolta, E. & Dantas, J. (1987). Nutrição e Adubação do Milho. In: Paterniani, E. & Viégas, G. P. Melhoramento e Produção de Milho. Fundação Cargill, v. II, 539-593.
- Martins, M. A. & Cruz, A. F. (1998). The role of the external mycelial network of arbuscular mycorrhizal fungi: III. A study of nitrogen transfer between plants interconnected by a common mycelium. **Revista de Microbiologia**, **29**(4): 289-294.

- Millet, E.; Avivi, Y. & Feldman, M. (1984). Yield response of various wheat genotypes to inoculation with *Azospirillum brasiliense*. **Plant and Soil**, **80**: 261-266.
- Muthukumarasamy, R. Revathi, G. & Lakshminarasimhan (1999). Influence of N fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility of Soils**, **29**:157-164.
- Neves, M. C. P. (1992). Como os microrganismos do solo obtêm energia e nutrientes. In: Cardoso, E. J. B. N.; Saito, S. M. T.; Neves, M. C. P.. Microbiologia do Solo, Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 360p.
- Nuernberg, N. J.; Vidor, C. & Stammel, J. G. (1984). Efeito de sucessões de culturas e tipos de adubação na densidade populacional e atividade microbiana. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, **8**: 197-203.
- Oaks, A. (1992). A re-evaluation of nitrogen assimilation in roots. **Bioscience**, **42**(2): 103-111.
- Okon, Y. & Kapulnik, Y. (1986). Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. **Plant and Soil**, **90**: 3-6.
- Okon, Y & Labandera-Gonzalez, C. A. (1994). Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, **26**:1591-1601.
- Olivares, F. L.; James, E.K.; Baldani, J. I. & Döbereiner, J. (1997). Infection of motled stripe disease-suceptible and resistant sugar cane variets by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, **135**: 723-737.
- Paré, T.; Gregorich, E. G. & Nelson, S. D. (2000). Mineralization of nitrogen from crop residues and N recovery by maize inoculated with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, **218**: 11-20.

- Pascovsky, R. S. (1989^a). Influence of inoculation with *Azospirillum brasiliense* and *Glomus fasciculatum* on sorghum nutrition. In: Shinner, F. A. Nitrogen fixation with non-legumes. Kluwer Academic Publishers, 235-239.
- Pascovsky, R. S. (1989b). Metabolic differences in *Zea - Glomus - Azospirillum* symbiosis. **Soil Biology and Biochemistry**, **21**(7): 953-960.
- Paula, M. A.; Reis, V. M.; Döbereiner, J. (1991). Interaction of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of roots and tops of sweet potato (*Ipomoea batatas*) sugar cane (*Saccharum* sp) and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biology and Fertility of Soils**, **11**: 111-115.
- Paula, M. A.; Urquiaga, S.; Siqueira, J.O.; Döbereiner, J. (1992). Synergistic effects of VAM fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato (*Ipomoea batatas*). **Biology and Fertility of Soils**, **14**: 61-66.
- Pereira, J. A. R. (1995). Bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares em diferentes genótipos de milho (*Zea mays* L). Tese de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Brasil.
- Phillips, J. M. & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of British Mycological Society**, **55**: 158-161.
- Pimental, J. P.; Olivares, F.; Pitard, R. M.; Urquiaga, S.; Akiba, F. & Döbereiner, J. (1991). Dinitrogen-fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, **137**: 61-65.
- Pramer, D. & Schmidt, E. L. (1964). Experimental Soil Microbiology. Burgess Publishing Company, Minneapolis.
- Raij, B. Van & Cantarella, H. (1997). Recomendação de Calagem e Adubação para o Estado de São Paulo. Campinas, IAC, 31p. Boletim Técnico 100.

- Reddy, R. R.; D'angelo, E.; Lindau, C. & Patrick Jr., W. H. (1990). Urea losses in flooded soils with established oxidized and reduced soil layers. **Biology and Fertility of Soils**, **9**: 283-287.
- Reis, V.M.; Baldani, J. I.; Baldani, V. L. D. & Döbereiner, J. (2000). Biological Dinitrogen Fixation in Gramineae and Palm Trees. **Critical Reviews in Plant Science**, **19**(3):227-247.
- Reis, V. M.; Olivares, F. L. & Döbereiner, J. (1994). Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, **10**:101-104.
- Reis, V. M.; Paula, M. A. & Döbereiner, J. (1999). Occurrence of arbuscular mycorrhizae and bacterium *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **34**(10): 1933-1941.
- Reis Jr, F. B.; Reis, V. M.; Urquiaga, S. & Döbereiner, J. (2000a). Influence of nitrogen fertilization on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). **Plant and Soil**, **219**:153-159.
- Reis Jr, F. B.; Silva, L. G.; Reis, V.M. & Döbereiner, J. (2000b). Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana de açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **35**(5):985-994
- Reynders, L. & Vlassak, K. (1982). Use of *Azospirillum brasiliense* as biofertilizer in intensive wheat cropping. **Plant and Soil**, **66**: 217-273.
- Riggs, P. J.; Chelius, M. K.; Iniguez, A. L.; Kaeppler, S. M. & Triplett, E. W. (2001). Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, **28**(9): 829-836.
- Rogers, J. B.; Laidlaw, A. S. & Cristie, P. (2001). The role of arbuscular mycorrhizal fungi in the transfer of nutrients between white clover and perennial ryegrass. **Chemosphere**, **42**(2) 153-159.

- Siddiqi, M. Y. & Glass, A. D. M. (1981). Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. **Journal of Plant Nutrition**, **4**:289-312.
- Sieverding, E. (1991). Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems. Eschborn,GTZ,371p.
- Silva, L. G.; Reis, V. M. & Boddey, R. M. (1998). Utilização do método de ELIZA indireto na quantificação de bactérias diazotróficas *Herbaspirillum seropedicae* e *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar var. SP. In: Reunião Brasileira sobre Micorrizas, Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo, Reunião Brasileira de Biologia do Solo. Caxambú. Out,1998. p.647.
- Stoltzfus, J. R.; Malarvizhi, P.P.; Ladha, J. K. & de Bruijn, F. J. (1997) Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential supplying rice with biologically fixed nitrogen. **Plant and Soil**, **194**:25-36.
- Subramanian, K. S. & Charest, C. (1998). Arbuscular mycorrhizae and nitrogen assimilation in maize after drought and recovery. **Physiologia Plantarum**, **102**: 285-296.
- Subramanian, K. S. & Charest, C. (1999). Aquisition of N by external hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus and its impact on physiological responses in maize under drought-stressed and well-watered condition. **Mycorrhiza**, **9**(2):69-75.
- Swedrzynska, D. (2000). Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on development and yielding of winter wheat and oat under different cultivation conditions. **Polish Journal of Environmental Studies**, **9**(5): 423-428.
- Swedrzynska, D. & Sawicka, A. (2001). Effect of inoculation on population numbers of *Azospirillum* bacteria under winter wheat, oat and maize. **Polish Journal of Environmental Studies**, **10**(1):21-25.
- Tosello, G. A. (1987). Milhos Especiais e seu valor nutritivo In: Paterniani, E. & Viégas, G. P. Melhoramento e Produção de Milho V. I . 2ed-Campinas: Fundação Cargill.

- Triplett, E. W. (1996). Diazotrophic endophytes: progress and prospects for nitrogen fixation in monocots. **Plant and Soil**, **186**: 29-38.
- Ureta, A.; Alvarez, B.; Ramón, A.; Vera, M. A. & Martinez-Drets (1995). Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. **Plant and Soil**, **172**: 271-277.
- Vance, E. D.; Brookes, P. C. & Jenkinson, D. S. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, **19**(6): 703-707.
- Van Veen, J. A. & Paul, E. A. (1979). Conversion of biovolume measurements of soil organisms, grow under various moisture tensions, to biomass and their nutrient content. **Applied and Environmental Microbiology**, **37**:686-692.
- Vasconcellos, C. A.; Campolina, D. C. A.; Santos, F. G.; Pitta, G. V. E. & Marriel, I. E. (1999). Resposta da soja e da biomassa de carbono do solo aos resíduos de cinco genótipos do sorgo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, **23**: 69-77.
- Venzke Filho, S. P. (1999). Microbiologia e sua atividade em uma cronossequência sob plantio direto. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- Victoria, R. L.; Piccolo, M. C. & Vargas, A. A. T. (1992) O ciclo do nitrogênio. In:Cardoso, E.J.B.N.; Tsai, S. M. & Neves, M.C.P. Microbiologia do Solo, Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 360p.
- Viégas, G. P. & Peeten, H. (1987). Sistemas de Produção. In: Paterniani, E. & Viégas, G. P. Melhoramento e Produção do Milho. Fundação Cargill, v II, 453-538.
- Voroney, R. P.; Winter, J. P. & Beyaert, R. P. (1993). Soil biomass C and N. In: Carter, M. R. Soil Sampling and Methods of Analysis. Lewis Pub. CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 277-286.

- Wani, S. P.; Chandrapalaiah, S. & Dart, P. J. (1985). Response of pearl millet cultivars to inoculation with nitrogen-fixing bacteria. **Experimental Agriculture**, **21**: 175-182.
- Wardle, D. A. (1994). Metodologia para a quantificação da biomassa de microrganismos do solo. In: Hungria, M. & Araújo, R. S. Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia. Brasília; EMBRAPA - SPI.
- Yamada, T. (1995). Adubação nitrogenada do milho: como melhorar a eficiência? **Informações Agronômicas**, **71**: 1-3.
- Yamada, T. (1996). Adubação nitrogenada do milho: quanto, como, e quando aplicar? **Informações Agronômicas**, **74**: 1-5.
- Yamada, Y. (1997). The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to generic level. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, **61**: 1244-1251.