



# XX Congreso Latinoamericano y XVI Congreso Peruano de la Ciencia del Suelo

“EDUCAR para PRESERVAR el suelo y conservar la vida en La Tierra”

Cusco – Perú, del 9 al 15 de Noviembre del 2014  
Centro de Convenciones de la Municipalidad del Cusco

## ATIVIDADE DAS FOSFATASES ÁCIDA E ALCALINA NA RIZOSFERA DE GENÓTIPO DE MILHO INOCULADO COM *AZOSPIRILLUM SP.*

Fonseca, L. M. F<sup>1\*</sup>; Reis, D.P.<sup>1</sup>; Duarte, E. S.<sup>2</sup>; Oliveira, M. C. R.<sup>2</sup>; Oliveira, C. A.<sup>3</sup>; Marriel, I. E.<sup>3</sup>;

<sup>1</sup>Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ); <sup>2</sup>Universidad de Ciencias Empresariales y Sociales, <sup>3</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

\*contato do autor: Email: [liviaferraz@rocketmail.com](mailto:liviaferraz@rocketmail.com) Rua Isaura Rezende, 71 apartamento 301, Centro, Ubá- Minas Gerais, Brasil, CEP: 36500-000

### RESUMO

As bactérias do gênero *Azospirillum sp.* vem sendo utilizadas como inoculantes na cultura do milho com o intuito de reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados. Além de fixar o N atmosférico quando estão associadas com gramíneas, essas bactérias podem atuar na solubilização do fosfato inorgânico. A quantificação da atividade enzimática do solo somada à biomassa microbiana pode contribuir para um melhor entendimento em relação aos efeitos das práticas de manejo e uso no solo. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a dinâmica da atividade das fosfatases ácida e alcalina na rizosfera de genótipo de milho inoculado com *Azospirillum sp.* O experimento foi realizado na Embrapa Milho e Sorgo, situada em Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil. Os tratamentos se constituíram de seis estirpes de bactérias do gênero *Azospirillum sp.* (E1, E2, E3, E4, E5 e E6) e um controle negativo (E0) em sementes de milho sob quatro níveis de N ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) em cobertura, totalizando 28 tratamentos. O milho foi semeado em delineamento de blocos ao acaso, em parcelas subdivididas, tendo as doses de N na parcela e os inoculantes na subparcela, com 4 repetições. A atividade das fosfatases ácida e alcalina foi determinada em laboratório utilizando-se o método da colorimetria. A atividade tanto da fosfatase ácida quanto da alcalina foram influenciadas significativamente ( $p < 0.05$ ) pela interação de doses de N com inoculantes. A interação de doses de N com inoculantes causam impacto na ciclagem do fósforo na rizosfera de plantas de milho.

### PALAVRAS CHAVE

Zea mays L; Fósforo; atividade enzimática

### INTRODUÇÃO

No Brasil, a cultura do milho ocupa grande destaque no cenário nacional, respondendo por 37% da produção nacional de grãos (MAPA, 2014). E, nos últimos anos, esta cultura tem experimentado relevantes mudanças tecnológicas, proporcionando significativos ganhos de produtividade. Dentre as novas tecnologias, é preciso dar mais atenção para a melhoria e qualidade e manejo do solo (EMBRAPA, 2012). A atividade biológica do solo baseia-se em uma cadeia de reações bioquímicas, catalisadas por enzimas que participam dos ciclos biogeoquímicos globais disponibilizando nutrientes dentro das cadeias tróficas. A quantificação da atividade enzimática do solo somada à biomassa microbiana pode contribuir para melhor entendimento em relação aos efeitos das práticas de manejo e uso no solo (Matsuoka et al., 2003). As enzimas são essenciais no ciclo das plantas, sendo que as fosfatases ácida e alcalina estão correlacionadas ao ciclo do fósforo (P), transformando o P orgânico em P solúvel pela hidrólise de ésteres de fosfatos, liberando fosfato solúvel. Dessa maneira, as fosfatases são secretadas pelas raízes das plantas e pelos micro-organismos presentes no solo (Nahas et al., 1994).

As bactérias do gênero *Azospirillum* são classificadas como diazotróficas (capazes de fixar o N atmosférico), se encontram em associações com gramíneas, constituindo um dos grupos mais estudados, com várias pesquisas relacionadas a ecologia, fisiologia e genética (Baldani et al., 1997; Bashan; Holguin, 1997). São capazes de promover um maior crescimento e desenvolvimento do sistema radicular, promovendo então melhor absorção de água e nutrientes, o que pode ocasionar incrementos nos aspectos agrônômicos da planta. Sabe-se que além de fixar o N atmosférico quando estão associadas com gramíneas, essas bactérias podem atuar na solubilização do fosfato inorgânico (Verma et. al, 2001).

O objetivo do trabalho foi avaliar a dinâmica da atividade das fosfatases ácida e alcalina na rizosfera de genótipo de milho inoculado com *Azospirillum sp.*

## **METODOLOGIA**

O experimento foi realizado na Embrapa Milho e Sorgo, situada em Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil. A área do plantio está localizada na latitude 19°27,318'S e longitude 44°10,978'W, com altitude de 744 m, em uma área de 9.072 m<sup>2</sup>. O solo do local é um solo de cerrado, textura argilosa, classificado como Latossolo Vermelho Distrófico, com baixa disponibilidade de N. As análises enzimáticas foram realizadas no laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Milho e Sorgo.

Os tratamentos se constituíram de seis estirpes de bactérias do gênero *Azospirillum sp.* (E1, E2, E3, E4, E5 e E6) (dados não publicados) e um controle negativo (E0) em sementes de milho sob quatro níveis de N (kg ha<sup>-1</sup>) em cobertura: N0 = 0; N1 = 40; N2 = 100 e N3 = 160, totalizando 28 tratamentos. O milho foi semeado em delineamento de blocos ao acaso, em parcelas subdivididas, tendo as doses de N na parcela e os inoculantes na subparcela, constituídas de 4 linhas de 5 metros cada uma, com o espaçamento de 0,7 metros entre linhas e 4 repetições. A adubação utilizada no plantio foi de 200 kg.ha<sup>-1</sup> do formulado NPK 8-28-16. Os demais tratamentos culturais foram realizados de acordo com as recomendações para a cultura do milho.

O preparo do inoculante foi realizado seguindo a metodologia proposta por Oliveira et al. (2012).

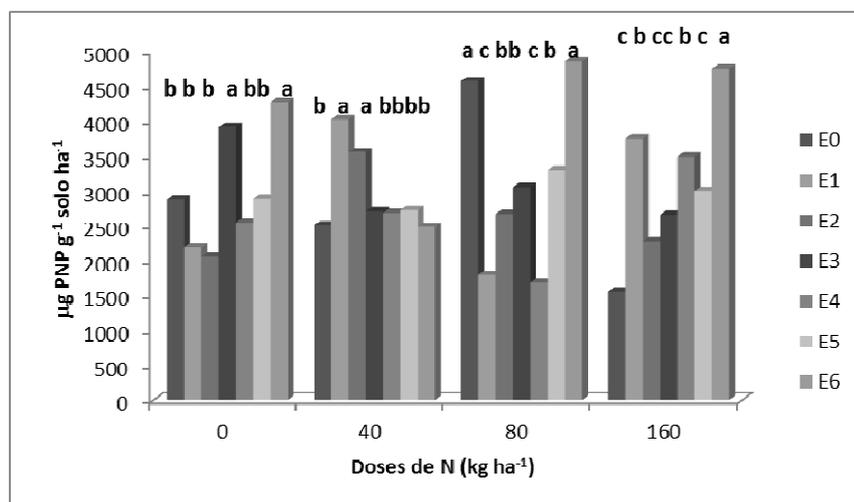
A atividade das fosfatases ácida e alcalina foi determinada de acordo com o método preconizado por Tabatadai et al. (1994). O método fundamenta-se na análise da concentração de p-nitrofenol resultante da hidrólise enzimática de p-nitrofenil fosfato. Em 0,15 g de solo foram adicionados tampão pH 6,5 e 11,0 para análise da fosfatase ácida e alcalina, respectivamente. Para ambas as enzimas foram adicionadas 0,12 mL de p-nitrofenil fosfato 0,05 M com vigorosa homogeneização e posteriormente foram incubadas pelo período de 60 minutos, em temperatura constante de

37°C. Logo após, adicionou-se 0,5 mL da solução de reagentes para colorimétrica. Em seguida, centrifugou-se as amostras a 8000 rpm por 5 minutos e então a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 400 nm. A concentração de p-nitrofenol presente em cada amostra foi determinada com base na curva padrão (0; 2; 5; 7; 5; 10 µg p-nitrofenol h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> solo). Os resultados obtidos da atividade das enzimas foram expressos em µg p-nitrofenol h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> solo.

Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA) a 5% pelo teste F e quando significativo, utilizou-se o de Scott-Knott através do programa estatístico SISVAR (Sistema de Análise de Variância) (Ferreira 2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

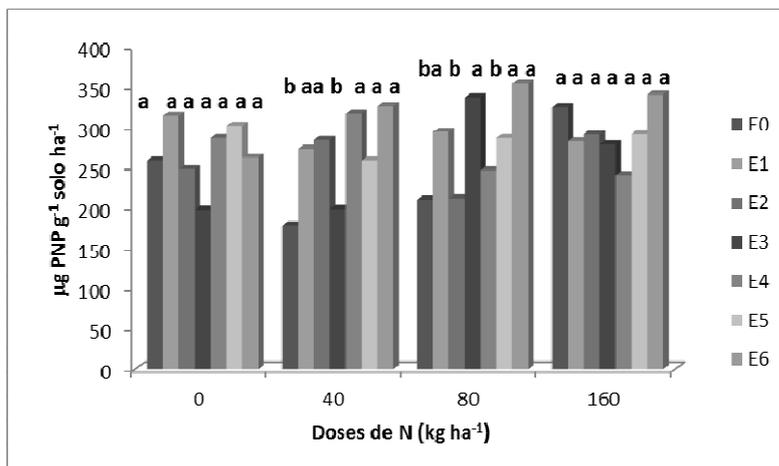
Tanto para a atividade da fosfatase ácida quanto para a alcalina, houve diferença significativa ( $p < 0.05$ ) na interação de doses de N com inoculantes. Para a fosfatase ácida, todos os níveis de N interagiram significativamente com a inoculação (**Figura 1**), com médias variando entre 1558.283 µg PNP g<sup>-1</sup> solo ha<sup>-1</sup> no E0 na dose de 160 kg.ha<sup>-1</sup> e 4854.183 µg PNP g<sup>-1</sup> solo ha<sup>-1</sup> no E6 para a dose de 80 kg.ha<sup>-1</sup>. Para os tratamentos que não receberam a adubação nitrogenada em cobertura, as estirpes que propiciaram as melhores médias foram a E3 e a E6, diferindo estatisticamente das demais. Na dose de 40 kg ha<sup>-1</sup>, os tratamentos também se dividiram em dois grupos, sendo que as estirpes E1 e E2 resultaram em melhores médias. No nível N3 (80 kg ha<sup>-1</sup>), os tratamentos se dividiram em 3 grupos, contudo, as melhores médias foram a E6 e E0, que é justamente o controle, sem a inoculação. Para a dose de 160 kg ha<sup>-1</sup>, também houve a formação de três grupos distintos, sendo que o melhor resultado foi propiciado pela estirpe E6. Resultados divergentes a esses foram encontrados por Moraes (2012), onde trabalhando com inoculação e doses de N em milho, a atividade enzimática sofreu influência apenas da dose de N aplicada em cobertura. Essa interação positiva pode ter acarretado em maior ciclagem de nutrientes no solo, disponibilizando maior teor de P orgânico (Badalucco, Nannpiere, 2007). Estudos mostram que a atividade da microbiota do solo também pode ser influenciada pela fertilização do mesmo, portando a interação do *Azospirillum* com a dose de N pode ter provocado maior produção dessa enzima pela microbiota. Estudos mostram que o aumento na dose de N pode provocar aumentos de até 56% na atividade da fosfatase ácida (Saiva-Cork et. al, 2002). Patil (2005) verificou resposta positiva da inoculação com *Azospirillum* e doses de N para a atividade desta enzima, através da capacidade que isolados desse gênero têm em solubilizar o fosfato. Tal habilidade já havia sido demonstrada por outros autores com estirpes de *A halapraeferens*. Calazans et. al, 2008 observaram que o uso da inoculação promoveu um decréscimo na atividade de ambas fosfatases.



\*médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5%

**Figura 1-** Atividade enzimática da Fosfatase Ácida ( $\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo ha}^{-1}$ ) em amostras de solo rizosférico de plantas de milho cultivadas em solo de cerrado na presença de seis inoculantes (E0, E1, E2, E3, E4, E5 e E6) e um controle (E0) (sem inoculação) sob quatro níveis de N em cobertura (0, 40, 80 e 160  $\text{kg ha}^{-1}$ ). Valores médios de quatro repetições.

A atividade da fosfatase alcalina (**figura 2**) comportou-se de forma semelhante à da ácida, porém com a interação sendo significativa ( $p < 0.05$ ) apenas nas doses de 40 e 80  $\text{kg ha}^{-1}$ , e com valores variando entre 178,71  $\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo ha}^{-1}$  para E0 na dose de 40  $\text{kg ha}^{-1}$  e 354,53  $\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo ha}^{-1}$  para E6 na dose de 80  $\text{kg ha}^{-1}$ . Na dose de 40  $\text{kg ha}^{-1}$ , as estirpes que propiciaram as melhores médias foram E1, E2, E4, E5 e E6, sendo que somente a estirpe E3 se juntou estatisticamente ao controle E0, podendo inferir que o uso a grande maioria das estirpes surtiu um efeito positivo para a atividade desta enzima. Na dose de 80  $\text{kg ha}^{-1}$ , as estirpes que obtiveram melhores médias foram E1, E3, E5 e E6, e as estirpes E2 e E4 se agruparam com o controle E0 no grupo das menores médias. Isso pode mais uma vez afirmar a estreita relação de especificidade que existe entre estirpe utilizada e doses de fertilizante. Calazans et. al (2008) verificaram que a atividade enzimática da fosfatase alcalina diminuiu com o uso do inoculante.



\*médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5%

**Figura 2-** Atividade enzimática da Fosfatase Alcalina ( $\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{ solo ha}^{-1}$ ) em amostras de solo rizosférico de plantas de milho cultivadas em solo de cerrado na presença de seis inoculantes (E0, E1, E2, E3, E4, E5 e E6) e um controle (E0) (sem inoculação) sob quatro níveis de N em cobertura (0, 40, 80 e 160  $\text{kg ha}^{-1}$ ). Valores médios de quatro repetições.

De maneira geral, a atividade da fosfatase é influenciada pela disponibilidade de P no meio. No presente estudo, a quantidade de P aplicada foi a mesma para todos os tratamentos, o que alterou foi a relação N/P, o que pode também ter influenciado a atividade enzimática.

## CONCLUSÕES

A atividade enzimática das fosfatases mostraram-se sensíveis à inoculação com estirpes de *Azospirillum sp.*.

A interação de doses de N com inoculantes causam impacto na ciclagem do fósforo na rizosfera de plantas de milho.

## BIBLIOGRAFIA

- Bashan, Y.; Holguin, G ; De-Bashan, L.E. 2004 *Azospirillum*-plant relations physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, 50:521-577.
- Calazans, G. M.; Marriel, I. E.; Resende, A. V.; Batista, R. O.; Hickmann, C.; Cruz, J. C. 2013 Dinâmica da Atividade das Fosfatases Ácida e Alcalina em Sistema de Compostagem de Resíduos Agrícolas Associados a Rochas. Resumos. **Congresso Nacional de Ciências do Solo**, Florianópolis.
- Chotte, J. Et Al 2002 Changes In Bacterial Communities And *Azospirillum* Diversity In Soil Fractions Of A Tropical Soil Under 3 Or 19 Years Of Natural Fallow. **Soil Biology And Biochemistry**. Elmsford, 34,:1083-1092.
- Ferreira, D. F. 2011 Sisvar: A Computer Statistical Analysis System. **Ciência E Agrotecnologia**, 35:1039–1042.
- Nahas, E. 2002 Microrganismos Do Solo Produtores De Fosfatases Em Diferentes Sistemas Agrícolas. **Revista De Ciências Agrônômicas**, Campinas, 61:267-275.
- Nannipieri, P.; Giagnoni, L.; Landi, L.; Renella, G. 2011. Role Of Phosphatase Enzymes In Soil. In: Phosphorus In Action. **Soil Biology**, V. 100: 215-243.
- Nannipieri, P.; Pedrazzini, F.; Arcara, P.G.; Piovaneli, C. 1979 Changes In Amino Acids, Enzyme Activities, And Biomass During Soil Microbial Growth. **Soil Science**, 127:26-34.
- Oliveira, C. A.; Gomes, E. A.; Mattos, B. B.; Texeira, J. M. A.; Cristelli, E. A.; Dias F. E. S.; Baracho, A. O.; Marriel, I. E.;2012 Utilizacao De Bioinoculantes Para O Cultivo Do Milheto (*Pennisetum Glaucum*) Com Fontes Naturais De Fosfatos . Em: Fertbio. Maceió.
- Patil, V. P. 2005 **Mineral Phosphate Solubilization And Molecular Diversity Of *Azospirillum***. 2005. 66f. Dissertação (Mestrado Em Agricultura) – University Of Agricultural Sciences, Dharwad.
- Silva, P. G.; Viana, A. A. De O. N.; Marriel, I. E.; Santos, V. L. Dos; Silva, D. De F. 2013 Quantificação Da Microbiota E Atividade Da Fosfatase Ácida E Alcalina Do Solo Em Diferentes Sistemas De Manejo Com O Uso De Dejetos Suínos Como Fertilizante. In: Congresso Brasileiro De Ciência Do Solo, 34., 2013. **Anais Ciência Do Solo: Para Quê E Para Quem**. Viçosa, Mg: Sociedade Brasileira De Ciência Do Solo. Cd-Rom.
- Tabatabai, M. A. Soil Enzymes. 1994 In: Weaver, R. W.; Angle, S.; Bottomley, P. J. Et. Al., (Ed.) **Methods Of Soil Analysis**. Part 2: Microbiological And Biochemical Properties, Soil Science Society Of America, Madison, 775 - 833.