

**BACTÉRIAS TOTAIS E DIAZOTRÓFICAS NO SOLO,
RIZOPLANO E ENDORIZOSFERA DE PLANTAS SOB
DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO DO SOLO¹***TOTAL AND DIAZOTROPHIC BACTERIA IN THE SOIL,
RIZOPLANE AND ENDORIZOPHERE OF PLANTS UNDER
DIFFERENT SOIL MANAGEMENT SYSTEMS*

**Ernane Ervino Pfuller², Danni Maisa da Silva³, Marcos Rubens Fries (*in memoriam*)⁴,
Zaida Inês Antonioli⁵, Ben-Hur Costa de Campos⁶, Maria Del Pilar Galeano Samaniego⁷,
Hardi Rene Bartz⁸, Karuany Dorneles da Rosa⁹ e Andressa Gonzalves Spohr¹⁰**

RESUMO

A comunidade microbiana total e de diazotróficas foi avaliada em áreas com sistema de plantio direto (SPD) e sistema de plantio convencional (SPC) em Cruz Alta - RS. As avaliações da população diazotrófica foram realizadas em quatro diferentes profundidades de solo, no rizoplano e endorizosfera das culturas das rotações: trigo/soja (R1) e trigo/soja, aveia preta/soja, ervilhaca+aveia preta/milho (R2). As coletas foram feitas nos dois sistemas e nas duas rotações e em duas épocas (inverno e verão). Os sistemas de plantio não influenciaram a população de bactérias diazotróficas do solo. A comunidade de diazotróficas foi influenciada pelo ambiente rizosférico, com predominância de diazotróficas no rizoplano em relação à endorizosfera nas rotações estudadas, exceto para a cultura do trigo. As rotações de culturas influenciaram as populações de bactérias totais na cultura do milho, com maior população no SPD, no rizoplano e endorizosfera.

Palavras-chave: Microbiologia do solo; bactérias fixadoras de nitrogênio; FBN.

ABSTRACT

The total microbial and diazotrophic community were evaluated in areas with no-tillage system (SPD) and conventional planting system (SPC) in Cruz Alta - RS. Diazotrophic population assessments were carried out in four different soil depths, in the rhizoplane and endorizosphere of the rotations crops: wheat / soybean (R1) and wheat / soybean, black oat / soybean, vetch + black oat / corn (R2). The collections were made in both systems and in two rotations and in two seasons (winter and summer). Planting systems do not influence the population of diazotrophic bacteria in the soil. The diazotrophic population was influenced by the rhizospheric environment, with a predominance of non-rhizoplane diazotrophics in relation to the endorizosphere in the

1 Trabalho elaborado como parte de Dissertação de Mestrado em Agronomia (UFMS), do primeiro autor.

2 E-mail: pfuller.ernane@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6020-6404>

3 E-mail: danni-silva@uergs.edu.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3600-0462>

4 E-mail: danni-silva@uergs.edu.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3600-0462>

5 E-mail: zantonioli@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2036-8710>

6 E-mail: ben-hur.campos@ibiruba.ifrs.edu.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8271-4127>

7 E-mail: pilar.galeano68@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0621-8639>

8 E-mail: hardi-bartz@ufsm.br. ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-4254-5942>

9 E-mail: karuany-rosa@uergs.edu.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3822-0618>

10 E-mail: andressa-spohr@uergs.edu.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5606-6162>

studied rotations, except for the wheat crop. As crop rotations occur as sources of total crops in corn, with a larger population without SPD, without rhizoplane and endorizosphere.

Keywords: Soil microbiology; nitrogen fixing bacteria; FBN.

INTRODUÇÃO

Os microrganismos presentes no solo afetam as características físico-químico-biológico do ambiente, contribuindo para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Estes se localizam, normalmente, em maior abundância na região da rizosfera, próxima das raízes das plantas em razão da alta quantidade de exsudados e compostos orgânicos, que contribuem para o aumento da atividade microbiana no local (MATTOS, 2020).

Logo os compostos liberados, tais como açúcares, aminoácidos e vitaminas são utilizados para o crescimento microbiano sendo este um habitat onde os microrganismos interagem de diferentes formas para absorção dos nutrientes essenciais, ressaltando-se que o solo integra um diversificado reservatório de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (SIERRA, 2020).

A utilização de bactérias associativas que efetuam as atividades bioquímicas e realizam o crescimento vegetal, tem sido empregada com êxito na formulação de inoculantes para a agricultura. Para defender o conjunto de bactérias presentes no solo, é necessário um planejamento de um tipo de semeadura que seja adequada, com rotação de culturas, tal como ocorre no sistema de plantio direto, onde uma multidão de bactérias será afetada em razão das diferentes práticas agrícolas, como mudança no uso do solo, adubação e entre outros aspectos (FIDELIS, 2017). Neste sentido, destaca-se a importância de algumas práticas de manejo tais como o consórcio entre gramíneas e leguminosas que, a exemplo do que foi determinado por Solanki *et al.* (2020), na avaliação do consórcio de cana-de-açúcar com o amendoim e com a cultura da soja, o sistema de cultivo consorciado ajuda a regular a estrutura microbiana e suas funções, bem como aumenta a abundância relativa de algumas bactérias diazotróficas, especialmente no estágio de perfilhamento da cultura da cana-de-açúcar, devido ao incremento de carbono orgânico no solo resultante do uso do consórcio.

Os microrganismos do rizoplane são responsáveis pela composição microbiana, em razão de produzirem compostos químicos e interagirem com outros microrganismos e a superfície da raiz (0-2 mm), com a finalidade de controlar pragas e doenças nas cultivares e melhorar o crescimento vegetativo e a produtividade. Além disso, há a interação planta-microrganismo endofítico que se posiciona no interior da espécie, gerando uma associação simbiótica sem causar doenças e promove benefícios à planta e ao meio ambiente, tais como efeitos benéficos para o hospedeiro, comporta-se como agente de controle biológico, elabora uma matriz de produtos naturais e entre outros, no qual é chamado de microrganismo endofítico (SOUZA, 2017). É de extrema importância analisar as estruturas das comunidades microbianas para compreender o nível de influência do

meio ambiente aos microrganismos, por meio da heterogeneidade temporal que acarreta em alteração de temperatura, pH e outras condições ambientais. Entretanto em um solo natural preservado, apresentando alta biodiversidade tem maior possibilidade de os microrganismos suprimirem as variações ecossistêmicas (ANDREOTE *et al.*, 2018).

O solo abrange dois modelos de vida aos microrganismos, o primeiro é rizosférico que possui alta quantidade de nutrientes para atividade microbiana, por outro lado o não rizosférico exhibe os microrganismos em dormência ou mortos por falta de nutrientes fundamentais ao metabolismo microbiano (WEYH, 2018). De acordo com Cattelan & Vidor (1990) destaca-se a zona rizosférica como uma região que apresenta populações microbianas até cem vezes superiores em relação à zona não-rizosférica, sendo que o efeito rizosférico varia de acordo com a espécie vegetal. Em pesquisa realizada por Dietrich *et al.* (2024), os resultados demonstraram que, em geral, a prática da fertilização representa o efeito mais significativo sobre a comunidade de diazotróficos e a estrutura geral da comunidade microbiana, entretanto, com a proximidade da raiz, ocorre um aumento do “efeito planta”.

Segundo Bolton *et al.* (1993), os microrganismos rizosféricos tem grande importância no desenvolvimento vegetal em razão de atuarem em diversos aspectos, como associações assimbióticas de fixação de N_2 no biocontrole e de patógenos de plantas, também na produção de substâncias promotoras de crescimento ou combatendo as doenças. Logo, expõe diversos gêneros de bactérias de forma direta ou indireta, com determinadas funções para aumentar a produtividade de grãos, biomassa vegetal, acréscimo na emergência de sementes e o rendimento da colheita (REZENDE *et al.*, 2021).

Dentre os principais grupos de bactérias presentes no ambiente edáfico tem-se as bactérias diazotróficas que contribuem, entre suas diversas funções, para o desenvolvimento vegetal, sendo capazes também de proporcionar o crescimento radicular e possibilitar uma grande mudança nos próprios tecidos vegetais (MATOSO, 2020). Em sistemas de cultivo baseados no cultivo de cereais, as leguminosas que realizam simbiose com bactérias do grupo dos rizóbios contribuem de forma significativa para o processo de Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN), entretanto, os diazotróficos encontrados em associações não simbióticas com plantas ou presentes como fixadores de N_2 de vida livre são onipresentes e também fornecem uma fonte adicional de N fixo, fundamental para os sistemas de produção (LADHA *et al.*, 2022).

Embora os diazotróficos do solo sejam significativamente importantes no ciclo global de nitrogênio (N), contribuindo para a disponibilidade deste elemento às plantas em diferentes agroecossistemas, pouco se sabe atualmente sobre as respostas das comunidades diazotróficas em diferentes sistemas de cultivo, especialmente, em longo prazo (HU *et al.*, 2020).

Considerando-se o contexto apresentado, este trabalho teve como hipótese: “O sistema de plantio e as rotações de culturas influenciam a população microbiana do solo, rizoplano e endorizosfera”. Sendo assim, o trabalho teve como objetivo conhecer a influência dos sistemas de plantio e das rotações de culturas sobre a comunidade microbiana total e diazotrófica do solo, rizosfera e endorizosfera.

MATERIAL E MÉTODOS

A comunidade microbiana total e diazotrófica foi avaliada em amostras de solo caracterizado, segundo Santos *et al.* (2018), como Latossolo Vermelho Distrófico típico provenientes de um experimento de campo da Fundacep/Cruz Alta - RS. O experimento foi conduzido em culturas anuais cultivadas sem irrigação, nos sistemas de plantio direto e convencional consolidados, visto que, apresentavam 14 anos de condução.

As rotações de culturas estudadas foram: R1 - trigo/soja caracterizada pelo cultivo de trigo no inverno e soja no verão durante o 1º, 2º e 3º anos de forma consecutiva e R2 - trigo/soja, aveia preta/soja, ervilhaca+aveia preta/milho, caracterizada pelo cultivo de trigo no inverno e soja no verão durante o 1º ano de cultivo; aveia preta no inverno e soja no verão do 2º ano e, ervilhaca+aveia preta durante o inverno e milho na safra de verão, durante o 3º ano de implantação do experimento. Toda a área experimental permanecia em sistema de pousio no período entressafras das culturas do trigo e soja/milho, bem como entre o manejo (dessecamento) das plantas de cobertura do solo implantadas no período do inverno (aveia preta e ervilhaca+aveia preta) até a implantação da cultura principal da safra de verão (soja ou milho).

A comunidade diazotrófica foi avaliada em quatro diferentes profundidades do solo (0 -5, 5 - 10, 10 - 15 e 15 - 20 cm), no rizoplane e na raiz de culturas; já a comunidade de bactérias totais foi determinada no rizoplane e endorizosfera. As coletas foram feitas nos dois sistemas e nas duas rotações em duas épocas, perfazendo seis tratamentos. A primeira coleta (E1) ocorreu no período da floração das culturas de cobertura de solo de inverno: aveia+ervilhaca comum (*Avena strigosa* Schieb e *Vicia sativa* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L.). A segunda coleta (E2) foi realizada no verão, quando a cultura do milho (*Zea mays* L.), numa das rotações, se encontrava em estágio inicial de desenvolvimento.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com parcelas subdivididas e três repetições. As amostras de solo foram obtidas a partir da coleta de três subamostras de solo coletadas em cada sub-parcela, que após misturadas e homogeneizadas constituíram uma amostra composta. Essas amostras foram colocadas em sacos plásticos, identificadas e armazenadas em caixas de isopor contendo gelo, para manter a temperatura baixa, até a chegada no laboratório. Já, as amostras de rizoplane e endorizosfera foram obtidas a partir da coleta de três plantas de cada sub-parcela (40 x 13,33m), e analisadas com três repetições de laboratório. As plantas foram coletadas com o auxílio de espátula e colocadas, separadamente, em frascos de vidro previamente esterilizados em autoclave, identificados e armazenados em caixas de isopor contendo gelo. Os instrumentos de amostragem foram desinfetados com álcool a 95% e flambados quando da troca de tratamentos (ANDRADE & HAMAKAWA, 1994).

A avaliação da comunidade de microrganismos diazotróficos no solo foi realizada a partir de três diluições decimais em série, utilizando-se 10g de solo úmido que foi colocado em frascos

contendo 95ml de solução salina esterilizada (PBS) e de 20 g de pérolas de vidro. O frasco foi agitado em agitador mecânico horizontal por 30 minutos a $170-200.\text{min}^{-1}$. Para a diluição transferiu-se 1mL da suspensão inicial para um tubo de ensaio (15 x 1,5cm) contendo 9mL de PBS esterilizado (autoclavado). Para realizar as diluições subsequentes, agitou-se o tubo contendo a suspensão diluída em agitador individual de tubo tipo “Vortex”, durante 30 segundos, com posterior transferência da alíquota de 1 ml para outro tubo de ensaio contendo 9mL de PBS esterilizado, seguindo-se com este processo, de forma sucessiva até a diluição 10^{-6} . Inoculou-se 0,1 ml de cada suspensão no centro do meio de cultura Semi-sólido sem presença de N, em tubos de ensaio (13,7 x 1,3cm), aproximadamente 0,5 cm da superfície destes (DÖBEREINER *et al.*, 1995). O material inoculado foi incubado em estufas a 35°C . Após dez dias de incubação foi realizada a contagem dos tubos com crescimento positivo e negativo, sendo considerados os tubos com crescimento positivo aqueles que apresentavam a película característica de crescimento de bactérias diazotróficas na condição microaerofílica. A comunidade de bactérias diazotróficas foi estimada pelo Número Mais Provável (NMP) de acordo com tabela de McCrady, descrita por Döbereiner *et al.* (1995).

A avaliação da população diazotróficas no rizoplano foi realizada a partir de três diluições decimais em série, a partir de 5g de raízes não esterilizadas. As raízes foram cortadas de 2 até 10cm da intersecção da raiz na planta, sendo lavadas com água esterilizada e, posteriormente, secas em papel toalha e pesadas. As 5g de raízes frescas e lavadas foram transferidas para um frasco contendo 45 mL de solução salina esterilizada (PBS) e de 20 g de pérolas de vidro. O frasco foi agitado em agitador mecânico horizontal por 30 minutos a $170-200.\text{min}^{-1}$, realizando-se, na sequência o mesmo processo já descrito para a determinação dos diazotróficos no solo até a obtenção da diluição 10^{-6} , com inoculação em meio semi-sólido, incubação e avaliação do crescimento bacteriano após 10 dias com base no NMP.

A determinação das bactérias diazotróficas na endorizosfera foi realizada a partir de três diluições decimais em série, com 5g de raízes que foram lavadas vigorosamente com água esterilizada e após, mergulhadas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl 5%) por 5 minutos. Depois, as raízes foram lavadas oito vezes com solução salina PBS. Na sequência, foram transferidas para um frasco contendo 45 mL de solução salina esterilizada (PBS) e de 20 g de pérolas de vidro, e agitadas por 20 minutos. Em seguida, foram lavadas por mais quatro vezes em solução salina, sendo então transferidas para um novo frasco com 45 ml de solução PBS e agitadas por 2 minutos, sendo finalmente maceradas em Grall. Desta solução, retirou-se 1 mL para a realização das diluições seriadas seguindo-se o processo já descrito para a determinação das diazotróficas do solo e do rizoplano até a incubação e avaliação do crescimento bacteriano após 10 dias com base no NMP.

Para a comunidade de bactérias totais no rizoplano e endorizosfera, o processo das diluições foi o mesmo descrito para a comunidade de diazotróficas. Ao mesmo tempo que se utilizou 0,1ml de cada diluição serial para inocular em meio semi-sólido (NFb), também 0,1ml destas suspensões

foram inoculadas em placas de Petri, contendo, aproximadamente, 30ml do meio de cultura sólido MR₂A (FRIES & DALMOLIN, 1997). Após a incubação, pelo período de três dias, fez-se a contagem direta das colônias de bactérias formadas no meio de cultura. Considerou-se que cada colônia foi gerada a partir de uma única célula bacteriana, ou de uma Unidade Formadora de Colônia (UFC), atribuindo-se ao número total de colônias presentes na placa de Petri como sendo equivalente ao NMP total de bactérias inicialmente presentes no inóculo utilizado.

A análise estatística para a comunidade de diazotróficos no solo, rizoplano e endorizosfera baseou-se no limite de confiança proposto por Woomer (1994) e para as bactérias totais nas diferentes regiões da raiz das culturas, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com probabilidade de erro de 1%.

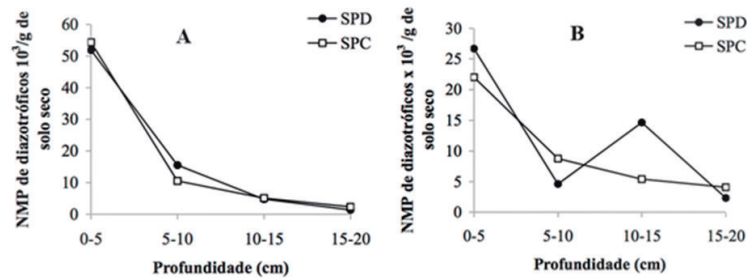
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observando-se os resultados encontrados para o número total de diazotróficos por grama de solo seco (Figura 1), verifica-se que a comunidade decresce com o aumento da profundidade, nos dois sistemas de plantio do solo (SPD e SPC) e para as duas rotações estudadas (trigo/soja - R1 e trigo/soja, aveia preta/soja, ervilhaca+aveia preta/milho - R2).

Observou-se em torno de sete vezes mais bactérias fixadoras assimbióticas de nitrogênio na camada superficial do solo da rotação R1, com a sequência trigo/soja, em relação à última camada estudada (15-20 cm) e cerca de dez vezes mais bactérias fixadoras assimbióticas na camada de 0-5 cm em relação a profundidade de 15- 20 cm na rotação R2, conduzida com trigo/soja; aveia preta/soja; ervilhaca + aveia preta/milho. Em trabalho realizado por Hu *et al.* (2020), analisando o efeito dos sistemas de Cultivo Reduzido (CR), Plantio Direto de longo prazo (PD) e Plantio Convencional (PC), os resultados mostraram que o PC diminuiu a abundância de diazotróficas, quando comparado com os outros dois sistemas (PD e CR), embora tenha aumentado a quantidade de diazotróficas copiotróficas.

Comparando-se as rotações estudadas, observa-se que a rotação R2, apresentou uma comunidade microbiana diazotrófica aproximadamente três vezes maior do que a rotação R1 na camada superficial do solo (0-10 cm), provavelmente devido a presença da cultura do milho na fase inicial de desenvolvimento, que, pode ter estimulado o crescimento microbiano pela liberação de exsudatos radiculares ricos em nutrientes, aumentando o efeito rizosférico sobre estes fixadores, em detrimento à rotação R1, que no momento da amostragem, não possuía cultura implantada. Da mesma forma, as culturas anteriores presentes na rotação R2 em comparação com a rotação R1 podem ter fornecido um maior aporte de resíduos vegetais com diferentes composições bioquímicas tendo como consequência aumentos nas populações de bactérias diazotróficas. Estudos realizados por Han *et al.* (2019) inferem que o tipo de cultura e as propriedades de diferentes tipos de solo afetam a diversidade de grupos específicos de bactérias diazotróficas, enquanto que os aspectos associados às propriedades do solo, fatores climáticos e a distância espacial, de forma conjunta, influenciam a comunidade diazotrófica como um todo.

Figura 1 - Número mais provável (NMP) de diazotróficos em diferentes profundidades, nos sistemas de plantio direto (SPD) e convencional (SPC), na rotação R1 (trigo/soja) (A) e na rotação R2 (rotação trigo/soja; aveia/soja; aveia + ervilhaca/milho) (B). Média de três repetições.

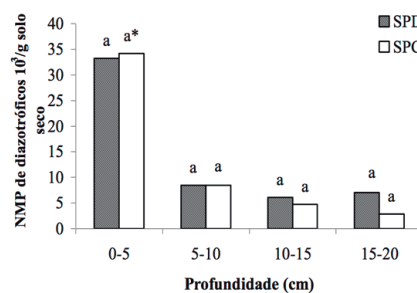


Fonte: Construção dos autores

O uso de plantas de cobertura em rotação de cultivos melhora os aspectos físico-químicos e biológicos do solo, a diversificação de leguminosas contribuem para o sistema, possuem raízes profundas, fixadoras de nitrogênio, o que auxilia na estrutura e conservação do solo, aumento da produtividade e contribui também positivamente sócio-economicamente (NASCIMENTO, 2018). No estudo realizado em um pomar cítrico com cinco anos de manejo com diferentes tipos de cobertura do solo, conduzido por Wu *et al.* (2021), diferenças na estrutura da comunidade microbiana do solo foram encontradas entre parcelas com e sem leguminosas. Os autores também inferem que a biomassa vegetal e a quantidade de fixadores de N são os fortes impulsionadores das propriedades químicas do solo, enquanto que o tipo de cobertura vegetal e as propriedades do solo contribuem significativamente para a estrutura da comunidade microbiana do solo (WU *et al.*, 2021).

Em relação aos dois sistemas de plantio, SPD e SPC, não foram observadas diferenças significativas no número de bactérias aeróbias fixadoras de N₂ de vida livre para as mesmas profundidades (Figura 2).

Figura 2 - Número mais provável (NMP) de diazotróficos, em diferentes profundidades, nos sistemas de plantio direto (SPD) e convencional (SPC). Médias seguidas pela mesma letra, na mesma profundidade, não diferem estatisticamente entre si (Kruskal - Wallis, 1%). Média de seis repetições.



Fonte: Construção dos autores

Em um trabalho realizado por Ferreira *et al.* (2017) no qual foram avaliados dois sistemas de manejo (sistema de semeadura direta - SSD e sistema de plantio convencional - SPC) em arroz de terras altas no município de Santo Antônio de Goiás-GO os autores concluíram que os sistemas de

cultivos alteram os atributos microbiológicos em comparação com as condições da mata nativa, contudo o SSD apresentou menor impacto sobre a biomassa microbiana.

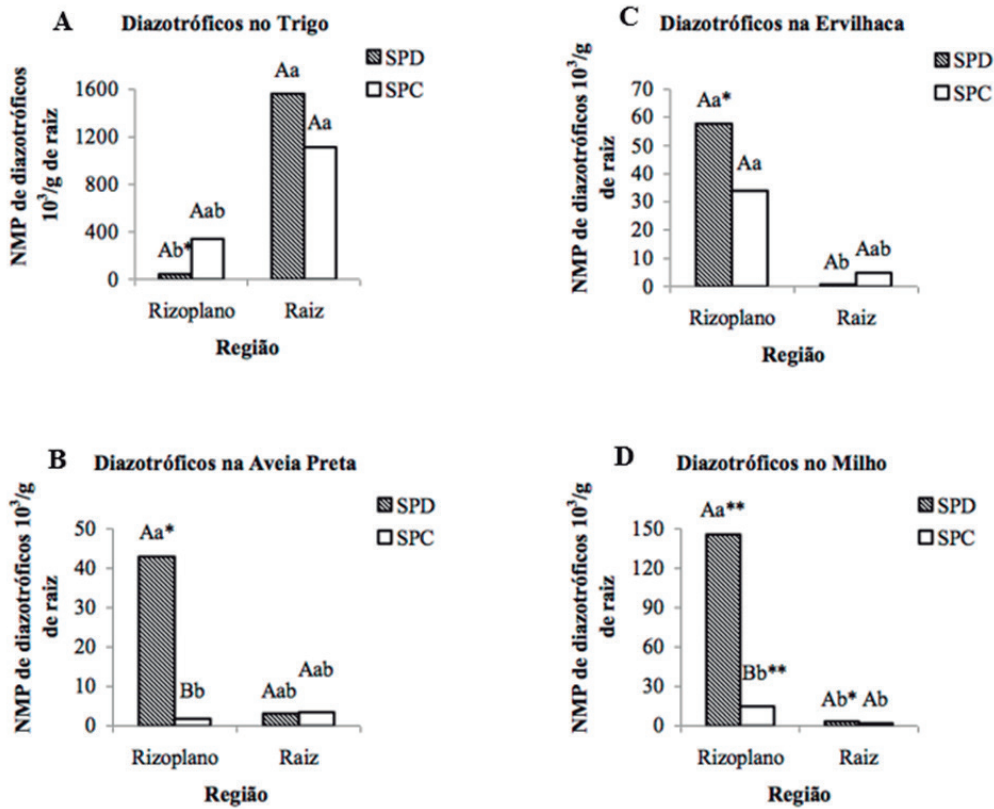
Embora sem diferir estatisticamente (Figura 2), na camada superficial de 0-5 cm a comunidade de diazotróficas foi cerca de quatro vezes maior em relação à comunidade presente nas demais profundidades, o que deve ter ocorrido em razão da maior disponibilidade de nutrientes e pela presença das raízes das culturas que contribuem para a liberação de exsudatos na rizosfera (nutrientes, hormônios, etc.) que promoveram o crescimento das populações diazotróficas (BOLTON *et al.*, 1993).

Considerando-se as diazotróficas, estas bactérias possuem a capacidade de captar o N_2 não assimilável pelas plantas, presente na atmosfera, mas que passa a ser assimilável pelas plantas, além de amenizar impactos associados às adversidades climáticas e induzir a resistência às doenças (MAGALHÃES, 2020).

Bordin (1995), estudando a ocorrência de bactérias aeróbias de vida livre fixadoras de N_2 , e correlacionando estas populações com pH, NH_4^+ , NO_3^- , carbono orgânico e calagem, não encontrou influência dos sistemas de culturas sobre populações diazotróficas em Latossolo Vermelho Escuro sob sistemas de plantio direto e convencional. O número de bactérias diazotróficas no rizoplano das culturas (trigo, aveia preta, ervilhaca e milho) variou entre 41×10^3 e $1450 \times 10^3 \text{ g}^{-1}$ de raiz, no SPD, e entre $1,8 \times 10^3$ e $341 \times 10^3 \text{ g}^{-1}$ de raiz, no SPC. A comunidade diazotrófica endofítica variou entre $0,8 \times 10^3$ e $1560 \times 10^3 \text{ g}^{-1}$ de raiz, no SPD, e entre $1,7 \times 10^3$ e $1.112 \times 10^3 \text{ g}^{-1}$ de raiz, no SPC, mostrando grande variação populacional entre os tratamentos (Figura 3 A, B, C D e E).

De acordo com Hartman *et al.* (2018), há fatores que afetam o microbioma, estando dentre estes as práticas de cultivo (rotação ou monocultura de cultivo), fertilizantes, sistemas de manejo (plantio direto, convencional). A colonização da rizosfera agrega nas interações com bactérias endofíticas que instituem consideráveis mecanismos de transmissão vertical, onde, sucede-se concomitantemente o reconhecimento e adesão às raízes favorecido pela quimiotaxia, posteriormente ocorre a migração para microambientes das plantas (CARD 2016; REZKI 2018). Em trabalho publicado por Dietrich *et al.* (2024), os autores destacam que tanto a fertilização quanto a espécie da planta cultivada, e seus efeitos interativos, afetaram significativamente a comunidade microbiana em todos os microambientes analisados, tendo sido encontrado no solo, rizosfera e rizoplano, um efeito maior da fertilização sobre a comunidade microbiana, entretanto, na raiz, o efeito das espécies vegetais superou a influência da adubação.

Figura 3 - Número mais provável (NMP x 10³) de diazotróficos por grama de raiz, nos sistemas de plantio direto (SPD) e convencional (SPC), nas culturas do trigo (A), aveia preta (B), ervilhaca (C) e milho (D) em Cruz Alta - RS. *Médias seguidas de mesma letra, em maiúsculas para sistemas de plantio e em minúsculas para regiões de coleta, não diferem significativamente (p = 0,05), baseado no intervalo de confiança e fator de confiança de 4,67 (WOOMER 1994). Média de três repetições. **Valores x104.



Fonte: Construção dos autores.

Em um trabalho realizado por Xuan *et al.* (2012) onde os pesquisadores compararam dois sistemas: monocultura de arroz e rotação de cultura (milho, feijão-mungo e arroz) analisando a diversidade da comunidade de rizobactérias, concluiu-se que a abundância e diversidade de bactérias da rizosfera foi maior no sistema de rotação de cultura em relação à da monocultura, cuja resposta foi associada à diversidade de culturas, presença de raízes, matéria orgânica e exsudados.

Valores similares aos aqui encontrados para a comunidade de diazotróficas endofíticas total foi encontrada por Barraquio *et al.* (1997) em raízes de arroz, que explicam que a flutuação do número de endofíticos fixadores de N₂ varia conforme o estágio de desenvolvimento da planta, ocorrendo a maior comunidade na fase de emborrachamento de grãos nesta gramínea. Segundo Abreu (2019), que avaliou a capacidade de bactérias diazotróficas isoladas de folhas, raízes e rizosfera de eucalipto para solubilização de fosfato, as bactérias endofíticas e rizosféricas interagem de diferentes formas, com finalidade de aumentar a eficiência da adubação nitrogenados e fosfatos solúveis e são fonte para o desenvolvimento de inoculantes.

Considerando-se a comunidade de diazotróficos no rizoplano e na endorizosfera das culturas em diferentes sistemas de cultivo, principalmente no trigo, observa-se que não houve diferença

significativa entre os valores da comunidade de diazotróficos para a região do rizopiano e entre a comunidade diazotrófica endofítica para a cultura do trigo nos sistemas estudados (SPD e SPC) (Figura 3A). Em estudo realizado por Garcia (2019), que observou por 36 anos os microrganismos sob influência do sistema de preparo do solo, presentes na rizosfera das culturas de soja e trigo cultivados sob SPD e SPC em solo Latossolo Vermelho distroférrico, encontrou uma pequena diferença entre o número de bactérias no SPD em relação ao SPC.

Na cultura da aveia preta, a população de diazotróficos do rizopiano foi maior para o SPD, o que não se verificou na endorizosfera (Figura 3B). O mesmo ocorreu em relação à cultura do milho, onde foi obtida uma população de fixadores de nitrogênio significativamente maior na região do rizopiano para o SPD, quando comparada ao SPC (Figura 3D). Em um trabalho realizado por Moura *et al.* (2017), referente a “Taxa de colonização micorrízica sob diferentes sistemas de cultivo no cerrado em cana-de-açúcar” no município de Goianésia-GO, obteve-se resultados sobre atividades de fungos micorrízicos e bactérias diazotróficas no sistema orgânico ocorrendo uma diferença mínima superior no sistema convencional, em razão de utilizar menor quantidade de produtos químicos fitossanitários.

Observando-se a influência do SPD e SPC sobre população de fixadores assimbióticos na cultura da ervilhaca (Figura 3C), pode-se afirmar que os sistemas de cultivo não influenciaram significativamente a população fixadora de nitrogênio no rizopiano ou endorizosfera. Porém no SPD a população de diazotróficos foi maior no rizopiano quando comparado à endorizosfera, o que não ocorreu no SPC.

Comunidades microbianas similares foram obtidas para a endorizosfera comparando-se os dois sistemas de plantio aqui estudados. O sistema de plantio afetou significativamente a comunidade de diazotróficas quando se compara o rizopiano e a endorizosfera no SPD, mas não é significativo para o SPC. Pode-se observar ainda que a comunidade diazotrófica teve comportamento bem distinto em relação às culturas do milho, aveia e ervilhaca em relação ao trigo, observando-se uma maior população no rizopiano do milho enquanto que na cultura do trigo ocorre uma maior comunidade na região das raízes das plantas (Figura 3A, B, C e D).

De acordo com o Corsini (2018), no trabalho “Crescimento e produtividade do milho inoculado com *Azospirillum brasilense* cultivado em diferentes preparos de solo e coberturas vegetais”, observou-se que as coberturas vegetais proporcionam biomassa, com excelente habitat para comunidade de bactérias diazotróficas, sendo que a espécie de cobertura do solo *Crotalaria spectabilis* se destacou entre outras, no cultivo de milho. Segundo Reinhold-Hurek & Hurek (1997), num estudo do gênero *Azoarcus* e suas interações com a grama *Kallar grass* (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), os autores concluíram que as espécies de diazotróficos possuem especificidade de associação com determinadas plantas e regiões das raízes, sendo esta associação determinada pela concentração de oxigênio no interior das raízes ou na rizosfera das mesmas.

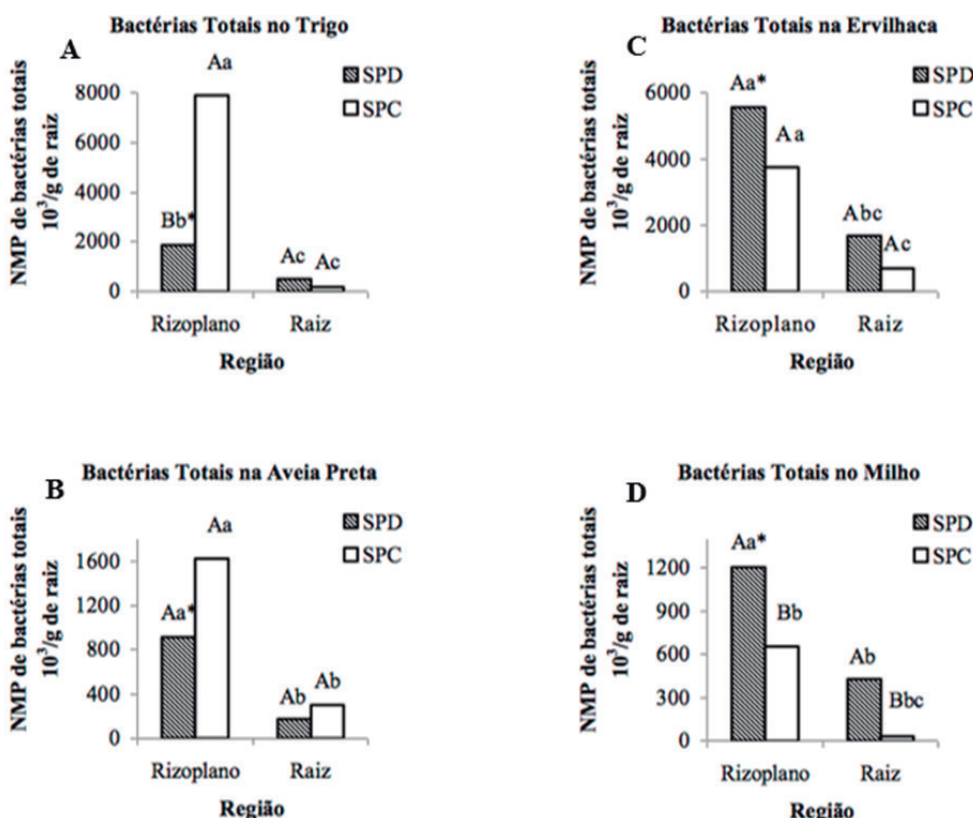
Espécies de *Azospirillum* localizam-se geralmente na região do rizopiano das raízes sendo menos resistentes às variações de concentração de oxigênio comparando-se a outras espécies de

diazotróficos (REINHOLD-HUREK & HUREK, 1997). Segundo os mesmos autores, a eficiência da colonização do interior das raízes requer que as mesmas tenham tecido aerenquimático, mas a concentração de oxigênio não pode ser superior a 2% de oxigênio na região do rizoplano, pois afetaria a fixação de N₂ de isolados nesta região, que não possuem mecanismos de controle de concentrações de oxigênio, sabidamente tóxicos ao sistema nitrogenase (REINHOLD-HUREK & HUREK, 1997).

A comunidade de bactérias totais no rizoplano das culturas (trigo, aveia preta, ervilhaca e milho) variou entre 0,9 x 10⁶ g⁻¹ de raiz e 5,6 x 10⁶ g⁻¹ de raiz, no SPD, e entre 0,6 x 10⁶ g⁻¹ de raiz e 7,9 x 10⁶ g⁻¹ de raiz, no SPC (Figura 4 A e B, C e D). A comunidade de bactérias totais endofítica variou entre 0,2 x 10⁶ g⁻¹ de raiz e 1,7 x 10⁶ g⁻¹ de raiz, no SPD, e entre 0,04 x 10⁶ g⁻¹ de raiz e 0,7 x 10⁶ g⁻¹ de raiz, no SPC (Figura 4). Em parte, a comunidade de bactérias totais do rizoplano na cultura do trigo foi maior no SPC em relação ao SPD (Figura 4A).

Figura 4 - Número mais provável (NMP) de bactérias totais por grama de raiz, nos sistemas de plantio direto (SPD) e convencional (SPC), nas culturas do trigo (A), aveia preta (B), ervilhaca (C) e milho (D), em Cruz Alta - RS.

*Médias seguidas de mesma letra, em maiúsculas para sistemas de plantio e em minúsculas para regiões de coleta, não diferem significativamente (p = 0,05), baseado no intervalo de confiança e fator de confiança de 4,67 (WOOMER 1994). Média de três repetições. **Valores x10⁴.



Fonte: Construção dos autores.

Para a endorizosfera, não houve influência do sistema de plantio sobre a comunidade de bactérias totais. Comparando-se a influência dos sistemas de plantio sobre a comunidade destes microrganismos nas diferentes regiões das raízes da cultura, observa-se que ela é maior no rizoplano em

relação à endorizosfera. O rizoplano é o local de maior interação entre plantas e micro-organismos onde a diversidade e quantidade é influenciada pelas práticas de cultivo (BLAUTH *et al.*, 2018; HARTMAN *et al.*, 2018).

Na cultura da aveia preta, não foi detectada diferença significativa entre a comunidade de bactérias totais, para as regiões do rizoplano e da endorizosfera, nos dois sistemas de plantio estudados (Figura 4B). Comparando-se os sistemas de plantio sobre as populações deste grupo de microrganismos nas diferentes regiões da raiz, observa-se que ela é maior no rizoplano em relação à endorizosfera. A microbiota do solo é pobre de compostos orgânicos energéticos para a nutrição das plantas, devido ao caráter oligotrófico (GARCIA, 2019). Os microrganismos são influenciados diferentemente na rizosfera de acordo com a espécie vegetal implantada; a influência na rizosfera das gramíneas é maior devido ao abundante sistema radicular que é frequentemente renovado (GARCIA, 2019). O mesmo comportamento foi observado para as comunidades na cultura da ervilhaca (Figura 4C). Já na cultura do milho verifica-se que a comunidade bacteriana é maior na região do rizoplano e endorizosfera no SPD em relação ao SPC (Figura 4D).

De acordo com Oliveira Júnior *et al.* (2017) os quais avaliaram o efeito do sistema plantio sobre a produtividade de milho no Amazonas, os resultados demonstraram que o rendimento de grãos foi superior no manejo com sistema plantio direto em relação ao preparo convencional do solo. O SPD favorece a maior produtividade visto que não há revolvimento das camadas superficiais do solo, agregando assim na formação da palhada, e características físicas, químicas e biológicas do solo, favorecendo quantitativamente microrganismos de importância agrícola como as diazotróficas (SÁ, 2001; HUNGRIA, 1999).

Por fim, pode-se inferir que a hipótese deste trabalho, apresentada na introdução, foi parcialmente confirmada já que, embora a comunidade de bactérias totais tenha sido afetada pelos sistemas de plantio, o mesmo não ocorreu com a comunidade de bactérias diazotróficas que não foi influenciada por estes sistemas. Entretanto, os sistemas de rotação de culturas, por sua vez, influenciaram a população microbiana do rizoplano e da endorizosfera.

Além disso, novos estudos ainda precisam ser realizados considerando-se a temática abordada neste trabalho. Essa demanda é reforçada pelo apontamento apresentado em Ladha *et al.* (2022) ao expor que a demanda por N deve pelo menos duplicar até 2050 para satisfazer as melhorias contínuas na produtividade das principais culturas alimentares como o trigo, o arroz e o milho, que sustentam a dieta básica da maior parte da população mundial.

Neste sentido, o uso da FBN, seja através de diazotróficas simbióticas ou associativas possui um grande potencial de contribuição para a produção agropecuária mundial, com baixo impacto ambiental. Para isso, seria de fundamental importância a realização de estudos futuros da comunidade microbiana total e diazotrófica, bem como de suas interações com as características físico-química-ambientais, em diferentes combinações de plantas de cobertura do solo, consorciadas ou não,

utilizando-se diferentes espécies de leguminosas e gramíneas, assim como a análise destas comunidades bacterianas em diferentes espécies de interesse agrícola, tanto de ciclo curto, como hortaliças, quanto em culturas de ciclo mais longo, como as citadas acima (soja, milho, trigo, arroz, dentre outras), bem como culturas perenes (frutíferas e florestais). Além disso, estudos futuros que tratem do uso dos microrganismos como promotores do crescimento vegetal e seu potencial na biofortificação dos diferentes sistemas de cultivo, em consonância com o trabalho apresentado por Jalal *et al.* (2024), bem como do uso da FBN associada com fertilizantes alternativos, como o pó de rocha, conforme proposta apresentada por Canepelle *et al.* (2024), seriam de grande relevância.

CONCLUSÃO

A comunidade de bactérias diazotróficas não foi influenciada pelos sistemas de plantio direto (SPD) e convencional (SPC). Contudo, os sistemas de rotação de culturas utilizados influenciaram a população de bactérias diazotróficas, tendo sido verificadas maiores comunidades na rotação R2, composta pelas culturas trigo/soja; aveia/soja; aveia + ervilhaca/milho

A comunidade de fixadores assimbióticos de nitrogênio foi influenciada pelo ambiente rizosférico, ocorrendo predominância de diazotróficos na região do rizoplano em relação a região da endorizosfera nas culturas estudadas, exceto para a cultura do trigo, onde a comunidade diazotrófica foi maior na região da endorizosfera em relação ao rizoplano.

Os sistemas de plantio (SPD e SPC) não influenciaram as populações diazotróficas da endorizosfera das culturas. No entanto, os sistemas de plantio influenciaram a comunidade de bactérias totais na cultura do milho, ocorrendo maiores comunidade no SPD para o rizoplano e endorizosfera da cultura.

AGREDECIMENTOS

Ao Professor Marcos Rubens Fries (*in memoriam*), orientador do primeiro autor, por todos os ensinamentos repassados e pelas contribuições neste trabalho; ao Professor João Eduardo Pereira pelo auxílio na análise estatística; à Fundacep/Cruz Alta pela cedência da área experimental para a realização deste estudo.

REFERÊNCIAS

ABREU, C. M. 2019. **Multifuncionalidades de bactérias diazotróficas endofíticas e rizosféricas de genótipos de eucalipto**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Diamantina: UFVJM. 106 p.

AGREDO, Y. A. 1985. **Influência de dois sistemas de cultivo, calagem e resteva sobre bactérias determinantes do ciclo do nitrogênio em um Latossolo Vermelho Escuro**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Santa Maria: UFSM. 50 p.

ANDRADE DS & HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Embrapa - SPI. Brasília - DF. p 63-94, 1994.

ANDREOTE *et al.* Diversidade microbiana: causas e consequências - como acessá-las. In: AZEVEDO, J. A.; PAMPHILE, J. A.; QUECINE, M. C.; LACAVA, P. T. (orgs); **Biotecnologia microbiana ambiental**. Prefácio Sergio Olavo Pinto da Costa. Maringá: Eduem, p. 62-78, 2018.

BARRAQUIO, W. L *et al.* Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant and Soil** 194: 15-24, 1997.

BLAETH, G.P. *et al.* 2018. **Estudo da efetividade dos jardins filtrantes no tratamento de efluentes sanitários**. Universidade São Francisco, Disponível em: <https://tratamentodeagua.com.br/wp-content/uploads/2020/04/efetividade-jardins-filtrantes-tratamento-efluentes.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2021.

BOLTON, H. JR. *et al.* Microbial ecology of the rhizosphere. In: METTING, F. B. JR. **Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management**. Editora Marcel Dekker, Inc. p. 27-63, 1993.

BORDIN, S. S. 1995. **Estudo de bactérias aeróbias de vida livre, fixadoras de N₂, em solo sob sistemas de plantio direto e convencional**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria: UFSM, 64 p.

CANEPELLE, E. *et al.* Diazotrophic bacteria, yield and grain quality of wheat inoculated with *Azospirillum brasilense* and fertilized with basalt powder. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 14, n. 01, p. 20-27, 2024.

CARD, S. *et al.* Deciphering endophyte behaviour: the link between endophyte biology and efficacious biological control agents. **FEMS Microbiology Ecology** 92: 1-19, 2016.

CATTELAN, A. J.; VIDOR, C. Sistemas de culturas e a população microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 14: 125-132, 1990.

CORSINI, D. C. D. C. 2018. **Coberturas vegetais e modos de inoculação com *Azospirillum brasilense* em milho sobre três sistemas de preparo de solo.** Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Engenharia - UNESP - Campus de Ilha Solteira. Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, São Paulo, 139p.

DÖBEREINER, J. *et al.* **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas.** Brasília, Embrapa - SPI: Itaguaí, RJ: Embrapa - CNPAB, 60p, 1995.

FERREIRA, *et al.* População e atividade microbiana do solo em sistema agroecológico de produção. **Revista Ciência Agronômica** 48: 22-31, 2017.

FIDELIS, K. R. 2017. **Diversidade funcional de bactérias diazotróficas isoladas do trigo tratado com biofertilizante e diferentes concentrações de fertilizante nitrogenado.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 111p. 2017.

FRIES, M. R. & DALMOLIN, R. S. D. **Atualização em recomendação de adubação e calagem: ênfase em plantio direto.** Editora Palotti, Universidade Federal de Santa Maria. 131p., 1997.

GARCIA, L. D. A. 2019. **Especiação de fósforo e atributos microbiológicos da rizosfera de soja e trigo em função do preparo do solo.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2019.

HARTMAN, K. *et al.* Cropping practices manipulate abundance patterns of root and soil microbiome members paving the way to smart farming. **Microbiome.** BioMed Central Ltd. p. 6-14, 2018.

HU, X. *et al.* Ridge tillage improves soil properties, sustains diazotrophic communities, and enhances extensively cooperative interactions among diazotrophs in a clay loam soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1333, 2020.

HUNGRIA, M. Características biológicas em solos manejados sob plantio direto. **Reunión de la Red Latinoamericana de Agricultura Conservacionista**, v. 5, 1999.

JALAL, A. *et al.* Interaction of Mineral Nutrients and Plant Growth-Promoting Microbes for Biofortification of Different Cropping Systems. **Journal of Plant Growth Regulation**, p. 1-17, 2024.

LADHA, J. K. *et al.* Biological nitrogen fixation and prospects for ecological intensification in cereal-based cropping systems. **Field Crops Research**, v. 283, p. 108541, 2022.

MAGALHÃES, H. **Agricultura nas mãos de microrganismos benéficos**. EMBRAPA. Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação. 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/51405622/agricultura-nas-maos-de-microrganismos-beneficos>. Acesso em: 10 mar. 2021.

MATOSO, E. S. **Potencial da mistura de cinco bactérias diazotróficas no desenvolvimento e produção de cana-de-açúcar**. Embrapa Clima Temperado-Tese/dissertação (ALICE), 2020.

MATTOS, J. V. 2020. **Efeito de bioestimulante via solo na nutrição e no rendimento de grãos de soja e trigo**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.

MOURA, J. B. *et al.* Taxa de colonização micorrízica sob diferentes sistemas de cultivo no cerrado em cana-de-açúcar. **Diálogos & Ciência** v. 2, n. 40 (17), p. 60-66, 2017.

OLIVEIRA JÚNIOR, I. *et al.* Seleção de cultivares de milho quanto à produtividade, estabilidade e adaptabilidade no Amazonas. **Pesquisa agropecuária brasileira** 52: 455-463, 2017.

REINHOLD-HUREK B & HUREK T. *Azoarcus* spp. and their interactions with grass roots. **Plant and Soil** 194: 57-64, 1997.

REZENDE, C. C. *et al.* Microrganismos multifuncionais: uso na agricultura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, e50810212725, 2021.

REZKI, S. *et al.* Assembly of seed-associated microbial communities within and across successive plant generations. **Plant and Soil** 422: 67-79, 2018.

SÁ, J. C. M. 2001. **Dinâmica da matéria orgânica do solo em sistemas de manejo convencional e plantio direto**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11140/tde-20200111-152646/publico/SaJoaoCarlosMoraes.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2021.

SANTOS, H. G. *et al.* **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasília, DF: Embrapa Solos, 2018. 355p.

SIERRA, L. G. T. 2020. **Comunidades de bactérias endofíticas e epifíticas associadas à cana-de-açúcar e prospecção de promotores de crescimento em plantas**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Campus de Jaboticabal. Universidade Estadual paulista, Jaboticabal, 136p.

SOUZA, C. R. S. 2017. **Microorganismos benéficos cultiváveis associados a Ananas spp. em diferentes ambientes.** 2017. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 88p.

XUAN, D. T. *et al.* Different crop rotation systems as drivers of change in soil bacterial community structure and yield of rice, *Oryza sativa*. **Biology and Fertility of Soils.** 48: 217-225, 2012.

WEYH, V. M. 2018. **Caracterização funcional de isolados bacterianos de solo rizosférico e não rizosférico na cultura do girassol.** TCC (Curso de Bacharelado em Agronomia - Bacharel em Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul), UFFS, Cerro Largo, 51p.

WOOMER, P. L. Most probable number counts. In: WEAVER *et al.* **Methods of soil analysis.** Soil Science Society of America Journal, U.S.A - SSSA Book series, n.5, p.59, 1994.

WU, Y. *et al.* Responses of soil microbial traits to ground cover in citrus orchards in central China. **Microorganisms**, v. 9, n. 12, p. 2507, 2021.