



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE FLORESTAS**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

**MAYAN BLANC AMARAL**

**INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS E  
FIXADORAS DE NITROGÊNIO DOS GÊNEROS *HERBASPIRILLUM* E  
*AZOSPIRILLUM* EM PLANTAS DE ARROZ.**

Vera Lúcia DivanBaldani, PhD.

Orientador

**SEROPÉDICA, RJ**

**Novembro-2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE FLORESTAS**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

**MAYAN BLANC AMARAL**

**INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS E  
FIXADORAS DE NITROGÊNIO DOS GÊNEROS *HERBASPIRILLUM* E  
*AZOSPIRILLUM* EM PLANTAS DE ARROZ.**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Florestal, como requisito para a obtenção do título de Engenheiro Florestal, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

**Vera Lúcia Divan Baldani, PhD.**

**Orientador**

**SEROPÉDICA, RJ**

**Novembro-2014**

**INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATOS E  
FIXADORAS DE NITROGÊNIO DOS GÊNEROS *HERBASPIRILLUM* E  
*AZOSPIRILLUM* EM PLANTAS DE ARROZ.**

**MAYAN BLANC AMARAL**

Monografia aprovada em 7 de Novembro de 2014.

Comissão Examinadora:

---

Vera Lúcia Divan Baldani, PhD, Embrapa Agrobiologia.  
(Orientador)

---

Silvia Regina Goi, PhD. UFRRJ  
(membro)

---

Silvana Gomes dos Santos, Doutoranda, UFRRJ.  
(membro)

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais por ter me incentivado a sempre estudar, dedico.

## AGRADECIMENTOS

A essa energia positiva que todos chamam de Deus.

Aos meus pais, os primeiros grandes professores da minha vida.

Aos meus irmãos, Maya e Sidhartha pelo compartilhamento de bons momentos.

A Diego, pelo amor, cumplicidade e amizade durante todos esses anos e apoio na coleta dos experimentos.

A Vera, pela orientação, oportunidade de desenvolver este trabalho e pela iniciação na carreira científica.

A Veronica Reis e Ivo Baldani pela orientação e ensinamentos durante a iniciação científica.

A Embrapa Agrobiologia e aos seus funcionários, a Janaina e a Gabriela Alves por descomplicarem a análise estatística do experimento, Ernani, Alderi, Roberto Carlos, Serginho, Aurélio pelo auxílio na condução do experimento, Selmo, Claudinho, Marildo, Geraldo, em especial ao Lúcio e ao Wilson por tornarem o local de trabalho tão prazeroso e descontraído.

Aos colegas do Laboratório de Gramíneas, Bruna Ortiz, Camila, Letícia, Liliandra, Silvana, Ederson, Fabiano, Leandro, em especial ao Esdras pelas “discussões científicas” que fortaleceram nossa teimosia, amizade e pela ajuda na condução deste experimento, sou muito grata.

Aos colegas da floresta e às amizades formadas durante a época da graduação e levadas para a vida, especialmente, Raquel, Lorryne, Thais Souza, Thássia, Úrsula, Amanda, Thayanne, Herberth, Thais Campos, Fabrícia, Sadi, Leo, Victor, Felipe, Lucas, Renata Sistons, Renata Vaqueiro, Carolzinha e Pedro, Cleivison e família, Bia e Daniel e a Nathália Fortuna, minha irmã carioca.

Aos membros da família Ceres Jr.

Aos companheiros de viagens em congressos, Silvana, Fernanda, Rafaela, Sumaya, Danilo, Andrea, Priscila, Bruna e Camila.

Ao IFBA e à UFRRJ pelo ensino gratuito e de qualidade.

Ao Cnpq pela bolsa concedida para a realização do trabalho.

A Todos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui, muito obrigada!

“Se procurar bem, você acaba encontrando não a explicação (duvidosa) da vida,  
mas a poesia (inexplicável) da vida”. Carlos Drummond de Andrade.

## RESUMO

A aplicação indiscriminada de adubos nitrogenados e fosfatados, visando o aumento de produtividade das culturas, tem elevado os custos de produção e contribuído para a degradação ambiental. Uma das possíveis alternativas para amenizar este problema é a utilização de tecnologias sustentáveis e econômicas, como o uso de biofertilizantes para a promoção de crescimento vegetal. Na tentativa de contribuir para a sustentabilidade agrícola, objetivou-se nesse trabalho selecionar bactérias diazotróficas e solubilizadoras de fosfatos bem como, avaliar o papel destas no desenvolvimento de plantas de arroz. Para a seleção, realizou-se uma busca de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio e solubilizadoras de fosfatos, isoladas de plantas de arroz, que estivessem depositadas na coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia. Nesta busca, foram selecionadas 3 estirpes para serem testadas em vasos com terra, conduzidos em casa de vegetação, sob condição não-estéril até a completa maturação dos grãos, na Embrapa Agrobiologia, em Seropédica-RJ. O delineamento foi em blocos casualizados com 4 tratamentos de inoculação (*A. brasiliense* Sp245 (BR 11005), *H. seropedicae* ZAE94 (BR 11417), *H. seropedicae* H18 (BR 12062), a mistura das 3 bactérias) e um tratamento sem a inoculação, 3 variedades de arroz (BRSSertaneja, BRSPepita e IR42) e 3 doses de nitrogênio (0 kg de N ha<sup>-1</sup>, 60 kg de N ha<sup>-1</sup> e 120 kg de N ha<sup>-1</sup>), com quatro repetições em arranjo fatorial 5x3x3. A inoculação apresentou incrementos significativos na massa seca dos grãos, número de panículas e altura na variedade IR42 e BRS Sertaneja, no entanto não foram observados incrementos significativos na variedade BRS Pepita.

**Palavras-chave:** biofertilizante; *Oryza sativa*; Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal; FBN;

## ABSTRACT

The indiscriminate application of nitrogen and phosphate fertilizers, in order to increase crops productivities, has been increased the cost of production and contributed to environmental degradation. One of the possible alternatives to ease up this problem is the use of sustainable and cost-effective technologies such as the use of bio-fertilizers to promote plant growth. In an attempt to contribute to agricultural sustainability, this work aimed to select phosphate solubilizing diazotrophic bacteria strains and to evaluate their role in rice plants development. For selection, we search for phosphate solubilizing diazotrophic strains isolated from rice plants, which were deposited in the culture collection of Embrapa Agrobiologia. In this search, we selected three of these strains to be tested under non-sterile greenhouse condition until the complete maturation of grains at Embrapa Agrobiologia in Seropédica - RJ. The experimental design was randomized blocks with five inoculation treatments (without inoculation, *A. brasiliense* SP245 (BR 11005), *H. seropedicae* ZAE94 (BR 11417), *H.seropedicae*H18 (BR 12062) and the mixture of the three bacteria), three rice varieties (BRS Sertaneja, BRS Pepita and IR42) and three doses of nitrogen (0 kg N ha<sup>-1</sup>, 60 kg of N ha<sup>-1</sup> and 120 kg N ha<sup>-1</sup>), with four replications in 5x3x3 factorial arrangement. The inoculation showed the highest increments for height, grain dry weight and panicles of the BRS Sertaneja and IR 42 varieties, however, there was no difference on the BRS Pepita variety.

**Keywords:** biofertilizers; *Oryza sativa*; Plant Growth Promoting Bacteria; BNF;



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Sementes de Arroz inoculadas com inoculante turfoso.....	18
<b>Figura 2.</b> Vista parcial da Casa de vegetação onde foi conduzido o experimento de inoculação em plantas de arroz.....	21
<b>Figura 3.</b> Vista parcial do experimento de inoculação em arroz, com delineamento em blocos casualizados e conduzidos em casa de vegetação aos 45 dias após o plantio.....	22
<b>Figura 4.</b> Análise de regressão da variável acúmulo da massa seca de grãos, em função das doses de nitrogênio (0, 60 e 120 kg ha <sup>-1</sup> ), nas variedades IR 42, BRS Pepita e BRS Sertaneja, inoculada com as estirpes SP 245, H18, ZAE94, a Mistura e um tratamento Sem Inoculação, destas sob condições de casa de vegetação. Média de 4 repetições.....	30

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Análise química de terra do horizonte A do Argissolo Vermelho Amarelo, Série Itaguaí, utilizada no experimento.....	19
<b>Tabela 2.</b> Contagem do número de bactérias fixadoras de nitrogênio pelo método do NMP, do inoculante produzido em substrato turfoso. As bactérias foram crescidas em meios de cultivo JNFb (Z94 e H18) e NFb (Sp245), semi-sólido e semi-específico para as bactérias do gênero <i>Herbaspirillum</i> e <i>Azospirillum</i> a mistura delas respectivamente. Dados médios de 3 repetições.....	22
<b>Tabela 3.</b> Contagem do número de bactérias diazotróficas presentes no solo utilizado como substrato em experimento em casa de vegetação, pelo método do Número Mais Provável, em meios de cultivo JNFb e NFb, semi-seletivos para bactérias do gênero <i>Herbaspirillum</i> e <i>Azospirillum</i> , respectivamente. Dados Médios de 3 repetições.....	23
<b>Tabela 4.</b> Efeito da Inoculação de 3 bactérias diazotróficas, a mistura destas e um tratamento sem inoculação em diferentes doses de Nitrogênio sobre as variáveis panículas, massa seca dos grãos em 3 Variedades de Arroz de Terras Altas. Média de 4 repetições.....	25
<b>Tabela 5.</b> Efeito da Inoculação de 3 bactérias diazotróficas, a mistura destas e um tratamento sem inoculação em diferentes doses de Nitrogênio sobre as variáveis altura e teor de Nitrogênio acumulado em 3 Variedades de Arroz de Terras Altas. Média de 4 repetições.....	27
<b>Tabela 6.</b> Efeito da Inoculação de 3 bactérias diazotróficas, a mistura destas e um tratamento sem inoculação em diferentes doses de Nitrogênio sobre as variáveis perfilhamento por planta e massa seca da raiz em 3 Variedades de Arroz de Terras Altas. Média de 4 repetições.....	28

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 Orizicultura .....	3
2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio .....	4
2.4 Solubilização de fosfatos inorgânicos .....	5
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	5
3.1. Estirpes selecionadas .....	5
3.2. Preparo do Inoculante .....	6
3.3 Contagem NMP de Bactérias do solo. ....	7
3.4. Caracterização do substrato e variedades utilizadas. ....	7
3.5. Plantio e Delineamento Experimental .....	9
3.6 Análise Estatística dos Dados .....	9
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	11
4.1 Contagem e verificação da pureza de Bactérias inoculadas em Turfa pelo método do Número Mais Provável (NMP) .....	11
4.2 Contagem de Bactérias Totais e Específicas no Solo.....	11
4.3 Efeito da Inoculação nas variedades de Arroz .....	12
5. CONCLUSÕES .....	20
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20

## 1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oriza sativa* L.) é um dos principais alimentos consumidos e um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana, sendo a base alimentar de grande parte da população mundial. No Brasil, na safra 2013/2014, o arroz foi plantado em 2,4 milhões de hectares, produzindo cerca de 12,22 milhões de toneladas com uma produtividade média de 5,05 toneladas por hectare (CONAB, 2014). O Brasil ocupa atualmente o 9º lugar da produção mundial, sendo o estado do Rio Grande do Sul o maior produtor nacional seguido por Santa Catarina e Mato Grosso do Sul. (CONAB, 2014; MAPA, 2014).

A cultura do arroz possui um requerimento alto de nutrientes e um dos fatores que mais limita a produção de arroz é a baixa disponibilidade destes no solo. Para suprir essa deficiência são utilizados adubos nitrogenados e fosfatados que oneram os custos de produção. Aliado a este fato, quando a aplicação destes adubos é feita de forma incorreta, ocorrem perdas, e conseqüentemente, contaminação ambiental.

O desenvolvimento de uma agricultura sustentável, passa pela diminuição da dependência do uso de fertilizantes sintéticos. Uma importante estratégia está no uso de insumos de baixo custo e que não agridam o meio ambiente. O uso de bactérias promotoras do crescimento Vegetal (BPCV) visa mitigar essa demanda, já que esses microrganismos em habitats naturais colonizam o interior e exterior de órgãos vegetais exercendo funções benéficas como: controle biológico de pragas e doenças, fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfatos, produção de fitohormônios e indiretamente por antagonismos a fungos patogênicos, produção de diversos compostos como, por exemplo: sideróforos, quitinase e antibióticos. (DOWNING et al., 2000; BALDANI et al., 2002; LEE et al., 2004; VIDEIRA, 2008, FIGUEREDO et al., 2010).

O estudo das interações entre planta e microrganismos vem se intensificando nos últimos anos com o intuito de entender os varios fatores envolvidos para a seleção de estirpes de bactérias eficientes na promoção de crescimento das grandes culturas. A utilização de bactérias na formulação de inoculantes ou biofertilizantes vem sendo utilizada e estudada em várias partes do mundo, sendo relatado que estas tecnologias podem reduzir os custos de produção e impacto ambiental e aumentar a produtividade das culturas (ISAWA et al. , 2010; BHATTACHARYYA e JHA, 2012; FERREIRA, 2014). O nitrogênio e o fósforo são os elementos que mais limitam o crescimento das plantas. O nitrogênio é

essencial na constituição de proteínas, ácidos nucléicos, vitaminas, enzimas e hormônios. Uma das principais fontes de nitrogênio no solo é o processo de fixação biológica de  $N_2$  atmosférico, assim com o nitrogênio, o fósforo tem papel indispensável na biosfera, já que faz parte dos ácidos nucléicos, os quais armazenam o código genético. Muitas das substâncias intermediárias da fotossíntese e da respiração celular estão combinadas com fósforo, além disso, este faz parte da moeda energética da vida, o ATP (BRADY et al., 2004). Para prevenir a deficiência deste nutriente é necessária a aplicação de grande quantidade de fósforo devido à fixação deste elemento ao solo, tornando-o pouco solúvel e não prontamente disponível às plantas (RODRIGUEZ, et. al, 2004).

Os principais mecanismos mediante os quais as BPCV promovem o crescimento das plantas compreendem a fixação biológica de nitrogênio (FBN) e a solubilização de fósforo inorgânico (SFI) e orgânico (LUCY et al., 2004). De um modo geral, o processo de inoculação de bactérias diazotróficas na cultura do arroz pode substituir em média, a aplicação de 40 kg de  $N\ ha^{-1}$  (BALDANI et al., 2000; FERREIRA et al., 2003;). O que de acordo com FERREIRA e colaboradores (2008) ocasionaria uma economia de aproximadamente R\$ 179,4 milhões por ano, para a região centro-sul do Brasil, além de minimizar os impactos ambientais gerados pela aplicação de quantidades elevadas de fertilizantes nitrogenados, o que poderia ser considerado um serviço ambiental do agroecossistema.

### **Objetivos Gerais**

Selecionar bactérias diazotróficas para aplicação como biofertilizante em arroz.

### **Objetivos Específicos**

- Utilizar os isolados mais eficientes previamente obtidos através da atividade da redução de acetileno, solubilização de fosfatos e produção de AIA como biofertilizante em plantas de arroz.
- Avaliar a inoculação de bactérias diazotróficas previamente selecionadas em três variedades de arroz na presença de diferentes doses de Nitrogênio.
- Testar a eficiência agrônômica das estirpes em Três variedades de arroz em casa de vegetação.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Orizicultura

O arroz (*Oryza sativa L.*) está entre os cereais mais importantes do mundo. A Ásia é responsável por 88,95% do consumo mundial, seguida das Américas (4,94%), África (4,91%), Europa (1,03%) e Oceania (0,16%). Os países em desenvolvimento são responsáveis por 95,2% do consumo mundial e por 95,9% da produção (Embrapa, 2007). No Brasil, na safra 2013/2014, o arroz foi plantado em 2,4 milhões de hectares, produzindo cerca de 12,16 milhões de toneladas com uma produtividade média de 4,9 toneladas por hectare (CONAB, 2014). O Brasil ocupa atualmente o 9º lugar da produção mundial, sendo o estado do Rio Grande do Sul o maior produtor nacional seguido por Santa Catarina e Mato Grosso do Sul. (CONAB, 2014; MAPA, 2014)

A ampla adaptabilidade do arroz, aliada à sua habilidade de produzir nas mais diversas regiões e ao contínuo esforço da pesquisa em todo o mundo, assegura que o seu grão permaneça sendo o mais importante produto de consumo do homem (TERRES et al., 2004).

O plantio no país está classificado em dois sistemas, “de várzea” e “de terras altas”, os quais se subdividem em: a) sistema irrigado por inundação; b) sistema com irrigação não controlada; c) sistema de várzea úmida; d) sistema de sequeiro tradicional e sistema de sequeiro sob irrigação suplementar por aspersão (GUIMARÃES & SANT’ANA, 1999).

O Brasil é o país que apresenta a maior área cultivada com arroz de terras altas. O seu cultivo já foi superior ao irrigado em termos de área plantada. Atualmente, equivale ao irrigado e vem diminuindo safra a safra a área de cultivo. Ainda se verifica queda da produção, uma vez que o arroz irrigado vem num constante crescimento de produtividade, com lançamento de novas variedades mais produtivas e a disseminação do cultivo dos híbridos que alcançam altas produtividades (BRASIL, 2012 citado por Viana, 2012).

A Rizicultura requer uma grande quantidade de nutrientes para sua produção. Um dos fatores que mais limita a produção de arroz é a baixa disponibilidade de nitrogênio (N) nos solos, que é característico de solos altamente intemperizados que apresenta uma baixa eficiência desse nutriente, devido, principalmente, às perdas ocorridas por desnitrificação, volatilização da amônia e lixiviação de nitrato (JEYABAL E KUPPUSWAMY, 2001).

Para suprir essa deficiência torna-se necessário a utilização de fertilizantes de síntese o que onera a produção e contamina o meio ambiente.

Uma alternativa biotecnológica é o uso de microrganismos que são capazes de realizar a fixação biológica de Nitrogênio.

### **2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio**

O nitrogênio é um dos elementos minerais mais importantes para a produção das culturas. Embora, presente em abundância na atmosfera (78%), na forma de  $N_2$ , este elemento não está prontamente disponível para as plantas, uma vez que a ligação tripla e covalente desta molécula não pode ser rompida pelas plantas (HUNGRIA et al., 2000).

Microrganismos, ditos diazotróficos, possuem a enzima nitrogenase que catalisa o processo de redução do nitrogênio atmosférico a  $NH_4^+$ . Essa enzima é extremamente versátil, pois além do  $N_2$ , catalisa a redução de vários outros substratos, tais como o acetileno. Em função disto, a atividade de redução do acetileno ( $C_2H_2$ ) a etileno ( $C_2H_4$ ), tem particular importância no estudo dos sistemas fixadores de  $N_2$  (BODDEY et al,1990; MOREIRA E SIQUEIRA, 2002).

A contribuição da FBN associativa à nutrição vegetal não é tão significativa como as simbioses, entretanto, se for considerada a grande extensão de terras recobertas por gramíneas e cereais, esta se torna importante, em termos globais (MOREIRA et al., 2010).

Estas bactérias podem viver livres no solo, associadas a espécies vegetais, tanto na rizosfera quanto endofiticamente, bem como formar simbioses, como ocorre em muitas leguminosas. As bactérias diazotróficas associativas são encontradas em diferentes espécies vegetais, incluindo representantes da família Poaceae, tais como arroz, milho e cana-de-açúcar (BHATTACHARJEE et al., 2008; MOREIRA et al., 2010).

Além de fixar o nitrogênio atmosférico, estas bactérias são descritas por serem capazes de produzir substâncias reguladoras de crescimento vegetal, solubilizar fósforo, atuar como antagonistas a espécies patogênicas, além de poderem influenciar o metabolismo nitrogenado da planta, sendo consideradas também como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas - RPCP (BALDANI & BALDANI, 2005; MOREIRA et al., 2010, HUNGRIA, 2011; JAMES & BALDANI, 2012;). Dentre as substâncias reguladoras de crescimento vegetal pelas RPCP, destaca-se a síntese de ácido indol acético e de outros compostos indólicos (BHATTACHARYYA & JHA, 2012).

Diversos autores têm demonstrado que a aplicação de uma dose de N subótima para a máxima produção tem proporcionado os maiores ganhos em termos de FBN em plantas de arroz (SABINO, 2003; GUIMARÃES, 2006; VIANA, 2012).

## 2.4 Solubilização de fosfatos inorgânicos

Depois do N, o fósforo é o principal macronutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Está presente em níveis de 400 a 1200 mg Kg<sup>-1</sup> de solo (JONES, 2000).

A reduzida disponibilidade de fósforo nos solos tropicais decorre da reatividade das formas solúveis de P com cálcio (Ca), ferro (Fe), magnésio (Mg) e alumínio (Al), formando compostos de baixa solubilidade. Nos solos ácidos, os fosfatos predominantes são os formados pela associação de P com Fe e/ou Al, enquanto nos solos com pH mais elevado predominam as formas associadas ao Ca (GOLDSTEIN, 1986).

No solo, o P está sujeito a diversos processos biogeoquímicos que alteram sua disponibilidade. Entre estes processos, destaca-se a dissolução das formas pouco solúveis de P, tornando-as disponíveis para as plantas (RICHARDSON, 2001).

A inoculação com microrganismos solubilizadores de fosfatos ou o manejo de suas populações tem sido sugerido como forma de diminuir o uso de fertilizantes fosfatados solúveis presentes ou adicionados ao solo e aqueles formados pela aplicação de fontes solúveis. No Brasil, contudo, a inoculação em larga escala com microrganismos solubilizadores de fosfato ainda não é praticada (MARRA, 2012).

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Estirpes selecionadas

A partir da análise dos resultados obtidos por Bonilla (2011) durante a dissertação de mestrado foi possível selecionar o isolado que apresentou maior capacidade nos seguintes testes fisiológicos: capacidade de solubilizar fosfatos inorgânicos, atividade da nitrogenase através da Atividade da Redução de Acetileno (ARA) e produção de Ácido-Indol-Acético (AIA). O isolado selecionado foi caracterizado por Bonilla (2011) como pertencente ao gênero *Azospirillum* spp. apresentou maior capacidade nos testes fisiológicos para ser avaliado em conjunto com 2 estirpes de referência e a mistura destas 3 estirpes em um ensaio em casa de vegetação quanto à promoção de crescimento vegetal.

As estirpes foram obtidas de subamostra enviada pela Coleção de Cultura da Embrapa Agrobiologia (CNPAB, RJ, Brasil). Sendo:

*Azospirillum brasilense* BR11005- Sp245, isolada de raízes estéreis de trigo (Estirpe de Referência) (Baldani et al., 1983).



*Herbaspirillumseropedicae* BR11417 - ZAE94, isolada de arroz (Estirpe de Referência) (Baldani, 1996).

*Herbaspirillum* spBR 12062-H18, isolado de raiz de arroz no estado do Rio de Janeiro. (BRASIL, 2005) (isolado selecionado)

### 3.2. Preparo do Inoculante

As estirpes previamente selecionadas foram crescidas em erlenmayer de 250 ml contendo 30 ml de DYGS (RODRIGUEZ NETO, 1986) com pH corrigido de 6,0 e 6,8 para as bactérias do gênero *Herbaspirillum* e *Azospirillum* respectivamente, sob agitação constante de 150 rpm e temperatura de 30°C, durante 24h para *Herbaspirillum* e 48 h para *Azospirillum*.

A suspensão bacteriana foi inoculada, com o auxílio de uma seringa esterilizada, em sacos de polipropileno contendo turfa previamente seca, moída e a acidez corrigida para pH 7.0 com CaCO<sub>3</sub>, de acordo com os resultados da análise química da turfa que apresentou: pH em H<sub>2</sub>O de 3,4, teor de Al 8,5 (cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>), Ca 7,1 (cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>), Mg 6,9 (cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>), P 22 (mg/dm<sup>3</sup>), K 47 (mg/dm<sup>3</sup>) e Matéria Orgânica (MO) de 72 (g . kg<sup>-1</sup>)

O inoculante foi preparado na proporção 15 ml de cultura bacteriana para 35g de turfa. Para o preparo do inoculante da mistura das estirpes 5 ml de cada suspensão bacteriana foi inoculada ao saco de polipropileno contendo turfa. Para o tratamento sem inoculação foi realizado a inoculação de 15 ml de água estéril ao saco de polipropileno contendo turfa. Após a inoculação, a turfa contendo a bactéria foi mantida durante 24 horas a uma temperatura de 30°C para maturação. Foi realizada a contagem do inoculante através do método do Número Mais Provável (NMP) antes da inoculação das sementes (DÖBEREINER et al, 1995).

Para a inoculação das sementes, pesou-se a turfa numa proporção de 10 g de turfa kg de semente<sup>-1</sup> e adicionou-se uma solução de água e açúcar (10%) na proporção de 6 ml kg de semente<sup>-1</sup> para que houvesse melhor aderência entre a semente e a turfa. As sementes foram secas ao ar livre antes do plantio (Figura 1).



**Figura 1.** Sementes de Arroz com inoculante turfoso.

### **3.3 Contagem NMP de Bactérias do solo.**

A contagem do número de células totais e diazotróficas presentes no solo antes do plantio foi realizada em placas com meio batata e em meio semi-sólido JNFb e NFb respectivamente.

Pesou-se 10 g de solo que foi homogeneizado com 90 ml de solução salina, e em seguida foram feitas diluições seriadas de  $10^{-2}$  a  $10^{-7}$  e uma alíquota de 0,1 ml de cada diluição foi plaqueada em duplicata em placas contendo Meio Batata com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas em estufa por 5 dias, sob temperatura de 30°C.

Para a contagem dos microrganismos no meio semi-sólido utilizou-se meio semi-específico JNFb para *Herbaspirillum sp.* E NFb para *Azospirillum sp.*, utilizou-se as mesmas diluições seriadas realizadas para a contagem total. Neste caso foi inoculada uma alíquota de 0,1 ml das diluições, em triplicatas, em meio semi-sólido, para posterior contagem através do método do Número Mais Provável (Döbereiner, 1995).

### **3.4. Caracterização do substrato e variedades utilizadas.**

#### **Substrato**

Foi utilizado como substrato para vasos os 20 cm do horizonte A de um Argissolo vermelho-amarelo, série Itaguaí coletado no campo experimental da Embrapa Agrobiologia. Após a análise da terra (Tabela 1), foi realizada a recomendação de adubação com base no Manual de Recomendação para o Estado do Rio de Janeiro para a cultura do arroz de terras altas. Não foi realizada a calagem, já que não havia níveis tóxicos de Al no solo e o pH estava próximo ao ideal para a cultura. Os vasos de polietileno com capacidade para 6 kg foram cheios com 5 kg de terra.

**Tabela 1.** Análise química do horizonte A de um Argissolo Vermelho Amarelo, Série Itaguaí, utilizado no experimento.

pH em H <sub>2</sub> O	Al	Ca	Mg	P	K	M.O.	N
	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>			mg dm <sup>-3</sup>		%	
5,43	0,14	2,06	1,10	0,33	41,0	1,96	0,34

### **Variedades**

Foram utilizadas 3 variedades de Arroz, a BRS Sertaneja e a BRS Pepita recomendadas pela Embrapa Arroz e Feijão e a Variedade IR 42, oriunda do banco de sementes de experimentos realizados na Embrapa Agrobiologia. A utilização dessas variedades teve o intuito de comparar a eficiência da inoculação das variedades melhoradas pela Embrapa Arroz e Feijão, BRS Pepita e BRS Sertaneja com uma variedade de referência na inoculação, a IR 42. Todas as variedades utilizadas são recomendadas para a semeadura em terras altas.

### **BRS Sertaneja**

Originada de um cruzamento múltiplo que envolveu a combinação de diferentes linhagens e variedades, com o objetivo principal de combinar maior resistência à brusone, rusticidade, potencial produtivo e qualidade de grãos.

Possui plantas vigorosas, de porte médio, moderadamente perfilhador e com boa resistência ao acamamento. Apresenta duração de ciclo precoce. É uma Variedade de ampla adaptação nos Estados que foram avaliada: Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Rondônia, Pará, Roraima, Maranhão, Piauí e Tocantins. Apresenta também moderada resistência a seca e às doenças, como, mancha-parda, escaladura e mancha-dos-grãos, sendo, contudo, susceptível a brusone.

Suas panículas são longas e com elevado número de espiguetas, produzindo grãos longos e finos, com alto e estável rendimento de inteiros, no beneficiamento. Após a cocção, os grãos se mostram soltos, enxutos e macios, como prefere a quase totalidade da população brasileira. (BRESEGELLO et al, 2007)

## **BRS Pepita**

É uma variedade de ampla adaptação aos ambientes de cultivo de arroz de terras altas no Brasil, com indicação de plantio para o Centro-Oeste (GO, MT), Norte (RO, PA, RR e TO), Meio-Norte (MA e PI), além de Minas Gerais. É originária de um cruzamento simples entre as linhagens CNA 7680 e CNA 7726, visando combinar maior resistência a doenças, rusticidade, potencial produtivo e qualidade de grãos. A BRS Pepita possui um bom nível de resistência a doenças como, a mancha-parda, escaladura-das-folhas e mancha-dos-grãos. Possui ciclo de aproximadamente 102 dias. Os grãos são da classe longo-fino, com boa qualidade de panela e ciclo mediano de maturação (BRESEGELLO et al, 2006).

## **IR 42**

Lançada na década de 70, pelo IRRI (International Rice Research Institute), para pequenos agricultores do sul e sudeste da Ásia, a Variedade espalhou-se pelo mundo e foi plantada em muitos países. No Brasil é referência em estudos de inoculação com bactérias diazotróficas devido ao seu potencial para a Fixação Biológica de Nitrogênio, ciclo longo (130 dias), alta capacidade de perfilhamento e rendimento de grãos. (OLIVEIRA, 1994; KUNDU E LADHA, 1995)

### **3.5. Plantio e Delineamento Experimental**

O plantio foi realizado em vasos com capacidade de 6 kg contendo 5 kg de terra, conduzido em casa de vegetação sob condições não-estéreis, na Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. Foram plantadas 3 sementes por vaso que permaneceram até o final do experimento. O delineamento foi em blocos ao acaso com quatro repetições, em arranjo fatorial 5 x 3 x 3. Com 4 tratamentos de inoculação (H18, Sp 245, ZAE94, mistura das 3 estirpes e 1 tratamento controle sem inoculação, 3 Variedades de arroz (BRS Pepita, BRS Sertaneja e IR 42) e 3 doses de fertilizante nitrogenado (0, 60 e 120 kg ha<sup>-1</sup>) na forma de Sulfato de Amônio, totalizando 180 vasos.

### **3.6 Análise Estatística dos Dados**

Foi testada a normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variância (teste de Cockran e Bartlet) dos dados no programa SAEG 8.0. O programa SISVAR 5.3 foi utilizado para análise de variância e para a comparação das médias utilizou-se o teste de Scott-Knott e o teste de regressão a 5% de probabilidade (FERREIRA, 2011).



**Figura 2.** Vista parcial da Casa de vegetação onde foi conduzido o experimento de inoculação em plantas de arroz.

Como Fonte nitrogenada utilizou-se o Sulfato de Amônio na dose de 60 kg de N ha<sup>-1</sup> e 120 kg de N ha<sup>-1</sup> de solo. Essas doses foram parceladas em 3 aplicações: Aplicado aos 10 dias após o plantio (DAP), no estágio vegetativo aos 60 DAP e no início do estágio reprodutivo aos 120 DAP. Como suplementação de potássio e fósforo, aplicou-se 40 kg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup> e 50 kg de K<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup> na forma de Superfosfato Simples e Cloreto de Potássio, respectivamente. Como fonte de micronutrientes foi aplicado FTE-Br 14 na quantidade de 0,6 kg ha<sup>-1</sup>;



**Figura 3.** Vista parcial do experimento de inoculação em arroz, com delineamento em blocos casualizados e conduzidos em casa de vegetação aos 45 dias após o plantio.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Contagem e verificação da pureza de Bactérias inoculadas em Turfa pelo método do Número Mais Provável (NMP)

O número das células viáveis nos inoculantes produzidos e utilizados, nos meios semi-sólidos foi superior a  $10^8$  células. g de turfa<sup>-1</sup> (Tabela 3), o que atende as recomendações e a legislação vigente do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

**Tabela 02.** Contagem do número de bactérias fixadoras de nitrogênio pelo método do NMP, do inoculante produzido em substrato turfoso com as estirpes Z94 e H18 do gênero *Herbaspirillum* e Sp245 do gênero *Azospirillum* e a mistura delas. Dados médios de 3 repetições.

Inoculante	Log. <sub>(10)</sub> do nº células g de turfa <sup>-1</sup>
SP 245	12,14
ZAE 94	12,04
H18	12,15
Mistura das estirpes em NFb	12,15
Mistura das estirpes em JNFb	12,15

### 4.2 Contagem de Bactérias Totais e Específicas no Solo.

Quando analisado o número de bactérias totais no solo, no meio batata, este apresentou  $1,3 \times 10^7$  colônias g de solo<sup>-1</sup>. E dentre as bactérias totais do solo, foram quantificadas, utilizando meios semi-sólidos e semi-específicos, bactérias do gênero *Azospirillum* e *Herbaspirillum* (Tabela 4). A presença dessas bactérias pode ser garantia de sobrevivência para as bactérias presentes no inoculante, já que o solo não impede o seu desenvolvimento. Contudo, a presença, mesmo em baixo número, dessas bactérias pode ter promovido o crescimento vegetal nos tratamentos não inoculados.

**Tabela 3.** Contagem do número de bactérias diazotróficas presentes no solo utilizado como substrato em experimento em casa de vegetação, pelo método do Número Mais Provável, em

meios de cultivo JNFb e NFb, semi-seletivos para bactérias do gênero *Herbaspirillum* e *Azospirillum*, respectivamente. Dados médios de 3 repetições.

Meios de Cultivo	Log <sub>(10)</sub> do N° de células ml <sup>-1</sup>
NFb	3,40
JNFb	2,95

### 4.3 Efeito da Inoculação nas variedades de Arroz

A interação Inoculação x Dose de Nitrogênio x Variedade apresentou resultados significativos a 5% de probabilidade de erro, para as variáveis analisadas (massa seca dos grãos, altura aos 90 dias após o plantio e o número de panículas).

#### **Variedade BRS Sertaneja:**

Os tratamentos inoculados com 120 kg ha<sup>-1</sup> de Nitrogênio promoveram incrementos significativos de até 111% na variável número de panículas quando comparada ao tratamento sem inoculação na mesma dose. No entanto, os tratamentos inoculados não diferiram entre si (Tabela 6).

Para a variável massa seca dos grãos o tratamento inoculado com a mistura das estirpes e o tratamento não inoculado apresentaram maiores valores na dose 0 kg de N ha<sup>-1</sup> (Tabela 6).

Em 2010, Guimarães e colaboradores obtiveram resultados semelhantes aos encontrados no experimento quando foi avaliado o efeito da inoculação com bactérias diazotróficas em Arroz cultivado em terras altas. Os autores observaram que houve aumento na massa seca da parte aérea na presença de inoculação, porém, não encontraram diferenças significativas entre as estirpes avaliadas e o tratamento controle apesar de encontrarem ganhos de 3% em relação a estes.

O efeito positivo da inoculação na variável altura foi observado nas doses 60 quando inoculado com as estirpes SP 245 e a mistura das estirpes ocasionando um aumento de 12% e

de 9% respectivamente e em 120 kg de N ha<sup>-1</sup> quando inoculado com a estirpe ZAE 94 promovendo um crescimento 16% superior ao tratamento sem inoculação (Tabela 4).

#### **Variedade IR 42:**

A inoculação da estirpe H18 de *Herbaspirillum* spp. promoveu aumento na massa seca dos grãos com 120 kg de Nitrogênio ha<sup>-1</sup> em relação a outras estirpes, no entanto não diferiu do tratamento sem inoculação, na mesma dose de N apesar de promover um aumento de 8% em relação a este (Tabela 5).

Na variável Altura aos 90 dias após o plantio a mistura das estirpes na dose 0 kg de Nitrogênio ha<sup>-1</sup> foi superior aos demais tratamentos de inoculação, no entanto não diferiu do tratamento sem inoculação. A estirpe SP 245 apresentou os menores valores para a altura na variedade IR 42 independente da dose de Nitrogênio aplicada (Tabela 6).

A análise da regressão de um modo geral apresentou interação positiva entre as doses de Nitrogênio dentro da combinação entre variedade e inoculação na massa seca dos grãos.

O ajuste do modelo linear foi adequado para a estirpe H18 e SP 24 nesta variedade, a equação ajustada demonstra um ganho de 0,039 g planta<sup>-1</sup> e 0,025 g planta<sup>-1</sup>, respectivamente na massa seca dos grãos a cada aumento de 1 kg na dose de Nitrogênio aplicado (Figura 4).

#### **Variedade BRS Pepita:**

Os tratamentos não diferiram estatisticamente nas variáveis analisadas nas condições testadas.

Além de características intrínsecas das bactérias, alguns autores têm mostrado que interações entre bactéria-genótipo, genótipo-ambiente, dentre outras, também interferem diretamente na eficiência da promoção de crescimento das plantas hospedeiras (OLIVEIRA, 1994; REIS et al, 2000; KENNEDY, 2001).

O perfilhamento, massa seca da parte aérea e da raiz e teor Nitrogênio ha<sup>-1</sup> na planta não apresentaram diferenças entre os tratamentos utilizados independente da variedade utilizada. Este fato provavelmente ocorreu devido ao alto coeficiente de variação observado no experimento (Tabela 5, Tabela 4, Tabela 6).



**Tabela 4.** Efeito da Inoculação de 3 bactérias diazotróficas, a mistura destas e um tratamento sem inoculação em diferentes doses de Nitrogênio nas variáveis teor de Nitrogênio da parte aérea e na altura aos 90 dias após o plantio, em 3 Variedades de Arroz de Terras Altas. Média de 4 repetições

Nitrogênio acumulado por planta (mg)															
Variedade	Inoculação + 0 kg de N				Inoculação + 60 kg de N				Inoculação + 120 kg de N				Sem Inoculação + N		
	ZAE 94	H18	SP 245	Mistura	ZAE 94	H18	SP 245	Mistura	ZAE 94	H18	SP 245	Mistura	0 kg	60 kg	120 kg
IR 42	23.87	17.66	12.92	18.98	29.7	28.18	26.79	39.56	45.99	40.03	39.59	18.83	21.89	24.74	44.77
Pepita	29.63	16.28	22.13	20.31	50.36	22.79	41.28	26.93	45.14	18.52	32.84	25.15	29.36	19.43	28.20
Sertaneja	18.5	16.92	20.11	28.63	21.65	28.42	23.33	14.02	25.74	29.25	18.50	21.73	34.25	17.43	24.04
Média	27.48												CV(%)		47.45
Altura aos 90 dias após o plantio (cm)*															
Inoculação	IR 42			Pepita			Sertaneja								
	0 kg de N	60 kg de N	120 kg de N	0 kg de N	60 kg de N	120 kg de N	0 kg de N	60 kg de N	120 kg de N						
Mistura	47,77 Ba	47,77 Ba	47,42 Ba	73,42 Aa	79,75 Aa	81,97 Aa	65,47 Aa	81,25 Aa	79,55 Ab						
ZAE 94	38,97 Bb	46,55 Ca	48,22 Ba	68,17 Aa	67,55 Ba	83,52 Aa	74,40 Aa	79,80 Ab	88,42 Aa						
H18	41,20 Bb	45,42 Ca	45,82 Ba	80,90 Aa	78,07 Aa	80,17 Aa	76,55 Aa	67,12 Bb	77,65 Ab						
SP 245	32,70 Bb	39,00 Ba	35,10 Bb	72,10 Aa	75,92 Aa	83,35 Aa	69,72 Aa	78,95 Aa	75,02 Ab						
Sem Inoculação	44,25 Ba	43,25 Ba	51,45 Ca	73,32 Aa	78,77 Aa	86,65 Aa	69,35 Aa	72,42 Ab	76,15 Bb						
Média	65,56								(CV%)		9,37				

\*valores seguidos da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

**Tabela 5.** Efeito da Inoculação de bactérias diazotróficas e a mistura destas no perfilhamento por planta e massa seca da raiz em 3 variedades de Arroz de Terras Altas. Média de 4 repetições.

Perfilhamento por planta																
Variedade	Inoculação + 0 kg de N				Inoculação + 60 kg de N				Inoculação + 120 kg de N				Sem Inoculação + N			
	ZAE 94	H18	SP 245	Mistura	ZAE 94	H18	SP 245	Mistura	ZAE 94	H18	SP 245	Mistura	0 kg	60 kg	120kg	
IR 42	5.75	6.17	1.82	7.67	7.32	6.9	3.07	6.9	5.25	6.92	2.82	6.07	5.75	6.42	7.6	
Pepita	1.82	2.00	1.15	1.52	2.42	2.4	2.00	2.32	1.75	1.9	2.00	2.25	1.57	1.5	2.15	
Sertaneja	2.87	2.4	1.82	2.00	2.17	2.17	3.075	2.57	2.35	2.65	2.85	2.67	2.24	2.47	2.75	
Média	3.38															
CV(%)	40.23															
Massa Seca da Raiz (g)																
Variedade	Inoculação + 0 kg de N				Inoculação + 60 kg de N				Inoculação + 120 kg de N				Sem Inoculação + N			
	ZAE 94	H18	SP 245	Mistura	ZAE 94	H18	SP 245	Mistura	ZAE 94	H18	SP 245	Mistura	0 kg	60 kg	120kg	
IR 42	4.77	3.63	3.77	4.37	5.16	5.07	4.52	6.89	7.98	6.93	3.49	5.39	4.13	4.45	8.50	
Pepita	7.99	3.23	3.61	3.19	2.64	6.88	4.25	5.65	7.30	4.28	4.73	4.29	3.77	3.13	6.51	
Sertaneja	2.6	4.47	3.78	8.65	2.64	4.89	7.19	4.52	6.34	6.04	3.49	4.77	7.28	4.32	5.14	
Média	5.03															
CV(%)	66.29															

**Tabela 6.** Efeito da Inoculação de bactérias diazotróficas e a mistura destas no número de panículas, na massa seca da parte aérea e na massa seca dos grãos em 3 variedades de Arroz de Terras Altas. Média de 4 repetições.

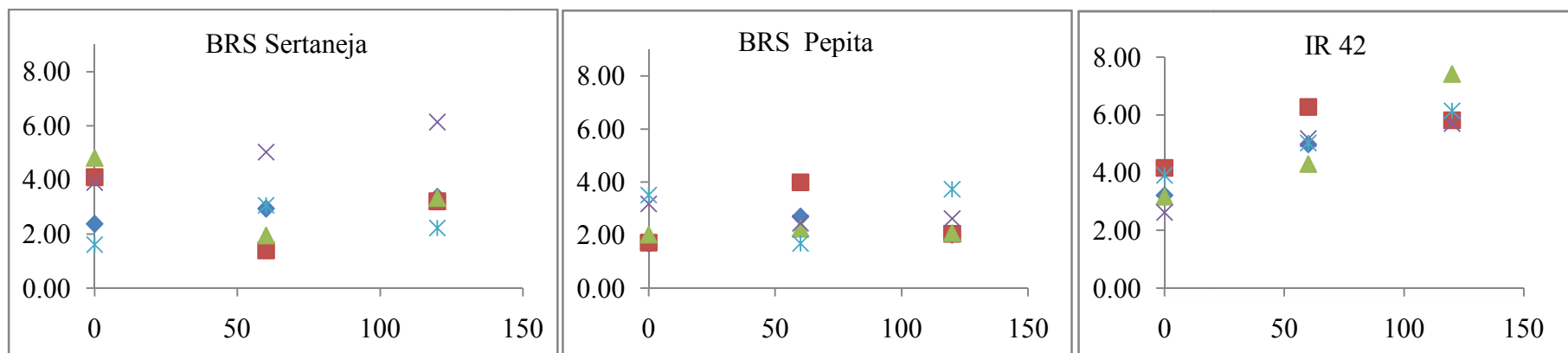
Número de Panículas por planta*									
	IR 42			Pepita			Sertaneja		
Inoculação	0 kg de N	60 kg de N	120 kg de N	0 kg de N	60 kg de N	120 kg de N	0 kg de N	60 kg de N	120 kg de N
Mistura	6,08 Aa	8,04 Aa	8,54 Aa	1,87 Ba	2,62 Ba	3,08 Ba	4,50 Aa	7,50 Aa	8,50 Aa
ZAE 94	5,50 Aa	7,42 Aa	9,50 Aa	2,75 Ba	3,17 Ba	2,33 Ba	4,33 Aa	6,25 Aa	9,50 Aa
H18	4,75 Ba	7,83 Aa	11,00 Aa	2,29 Ba	2,67 Ba	3,12 Ba	6,00 Aa	6,50 Aa	8,75 Aa
SP 245	4,75 Aa	9,25 Aa	8,50 Aa	2,21 Ba	2,33 Ba	2,92 Ba	4,79 Aa	7,70 Aa	8,87 Aa
Sem Inoculação	4,71 Ba	7,67 Aa	10,54 Aa	2,16 Ba	2,29 Ba	3,87 Ba	5,50 Aa	7,25 Ba	4,50 Bb
Média	5,65						CV(%)	28,57	
Massa Seca dos grãos (g. planta <sup>-1</sup> ) *									
	IR 42			Pepita			Sertaneja		
Inoculação	0 kg de N	60 kg de N	120 kg de N	0 kg de N	60 kg de N	120 kg de N	0 kg de N	60 kg de N	120 kg de N
Mistura	4,16 Aa	6,28 Aa	5,82 Ab	1,71 Ba	3,99 Ba	2,05 Ba	4,10 Aa	1,39 Ca	3,21 Ba
ZAE 94	4,77 Aa	5,16 Aa	7,80 Aa	7,99 Aa	2,64 Aa	7,30 Aa	2,60 Ab	4,89 Aa	6,35 Ba
H18	3,21 Aa	4,98 Aa	8,00 Aa	1,67 Aa	2,69 Ba	2,01 Ba	2,37 Ab	2,94 Ba	3,36 Ba
SP 245	2,62 Aa	5,18 Aa	5,70 Ab	3,61 Aa	4,25 Aa	4,74 Aa	3,77 Ab	4,52 Aa	3,49 Aa
Sem Inoculação	3,16 Ba	4,30 Aa	7,42 Aa	2,02 Ba	2,24 Ba	2,08 Ba	4,92 Aa	1,95 Ba	3,33 Ba
Média	3,43						CV(%)	39,22	

\*valores seguidos da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

Continuação Tabela 6

Massa Seca da Parte Aérea (g)

Variedade	Inoculação + 0 kg de N				Inoculação + 60 kg de N				Inoculação + 120 kg de N				Sem Inoculação + N		
	ZAE 94	H18	SP 245	Mistura	ZAE 94	H18	SP 245	Mistura	ZAE 94	H18	SP 245	Mistura	0 kg	60 kg	120 kg
IR 42	5.12	4.36	3.82	4.37	6.91	7.01	4.42	6.89	9.74	9.86	2.98	5.39	4.56	6.5	10.21
Pepita	5.30	3.64	4.04	3.65	3.54	4.99	4.79	4.80	6.71	3.58	4.33	3.89	3.86	3.15	5.16
Sertaneja	3.11	3.83	3.82	6.68	4.71	6.04	4.42	2.87	4.09	6.23	2.98	4.55	7.52	4.36	4.85
Média	5.28														
CV(%)	33.39														



Mistura;  $y = -0,007x + 3,347$  ;  $R^2 = 10,38\%$  ns  
 H18;  $y = 0,008x + 2,397$   $R^2 = 99,38\%$  ns  
 SP 245;  $y = 0,018x + 3,911$  ;  $R^2 = 1,34\%*$   
 ZAE 94;  $y = 0,005x + 1,989$ ;  $R^2 = 18,03\%$  ns  
 Sem Inoculação;  $y = -0,012x + 4,109$ ;  $R^2 = 26,81\%*$

Mistura  $y = 0,002x + 2,417$  ;  $R^2 = 1,88\%*$   
 H18;  $y = 0,002x + 1,96$  ;  $R^2 = 10,49\%$  ns  
 SP 245;  $y = -0,004x + 3,027$  ;  $R^2 = 53,20\%$  ns  
 ZAE 94;  $y = -0,004x + 3,027$  ;  $R^2 = 0,94\%$  ns  
 Sem Inoculação;  $y = 0,000x + 2,084$ ;  $R^2 = 7,79\%$  ns

Mistura;  $y = 0,013x + 4,593$  ;  $R^2 = 55,32\%$  ns  
 H18 ;  $y = 0,039x + 3,005$  ;  $R^2 = 97,75\%*$   
 SP 245 ;  $y = 0,025x + 2,959$ ;  $R^2 = 87,30\%*$   
 ZAE 94;  $y = 0,001x + 2,868$ ;  $R^2 = 100\%$  ns  
 Sem Inoculação;  $y = 0,035x + 2,833$ ;  $R^2 = 93,20\%*$

◆ H18  
 ■ Mistura  
 ▲ Sem Inoculação  
 × SP 245  
 \* ZAE 94

**\* Significativo pelo teste F ao nível de 5 % de significância;**

**\*ns – Não significativo pelo teste F ao nível de 5 % de significância.**

**Figura 4.** Análise de regressão da variável acúmulo da massa seca de grãos, em função das doses de nitrogênio (0, 60 e 120 kg ha<sup>-1</sup>), nas variedades IR 42, BRS Pepita e BRS Sertaneja, inoculada com as estirpes SP 245, H18, ZAE94, a Mistura e um tratamento Sem Inoculação, destassob condições de casa de vegetação. Média de 4 repetições.

## 5. CONCLUSÕES

- A Inoculação proporcionou incrementos significativos na massa seca dos grãos da variedade IR42 e BRS Sertaneja.
- O efeito da inoculação depende da variedade e da dose de N utilizada.
- A variedade Pepita não respondeu a inoculação, mas a fertilização nitrogenada proporcionou aumento na altura das plantas.
- Análise da regressão mostrou que a estirpe H18 apresentou maiores ganhos na massa dos grãos por kg de Nitrogênio aplicado na variedade IR42.
- O maior número de panícula não significou aumento da produção.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A. S. **Caracterização e uso de bactérias diazotróficas isoladas de diferentes Variedades de arroz originárias do estado do maranhão.** Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 88p. Tese (Doutorado em Fitotecnia, Agroecologia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia. Tese de doutorado. 2008.

BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, V. L. D. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: SERAFINI, L. A., BARROS, N. M., AZEVEDO, J.L. **Biociologia: avanços na agricultura e na agroindústria**, Caxias do Sul: EDUCS, p. 195-232, 2002.

BALDANI, V.L.D; BALDANI, J.I & DOBEREINER, J. Effects of Azospirillum inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Can.J.Microbiol.*,1983.

BALDANI J. I.; BALDANI V. L. D.; SELDIN L.; DÖBEREINER J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.154, p.86–93, 1986.

BALDANI, J. I.; REIS, V. R. S.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, V. L. D. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (org) **Biociologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. EDUCS, Caxias do Sul, 433p. 2002.

BALDANI, J., KRIEG, N., BALDANI, V., HARTMANN, A. & DÖBEREINER, J. *Genus II. Azospirillum*. EN: GARRITY G, BRENNER D, KRIEG N, STALEY J. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2<sup>nd</sup> Edition. New York, Springer, p 7 – 26. 2005.

BALDANI, V. L. D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** 262 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ. 1996

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biol. Fert. Soils**.30:485 – 491, 2000.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 77, n.3, 2005.

BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, 1995.

BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v.16, p.729–77, 1998.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, n.4, p.1327–1350, 2012.

BHATTACHARJEE, R.B; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S.N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 80, n. 2, p.199-209, 2008.

BODDEY, R.M.; BODDEY, L. H.; URQUIAGA, S. A técnica de redução de acetileno na medição da fixação biológica de nitrogênio. Itaguaí: Editora Universidade Rural, 37p. (EMPRAPA-CNPBS. Documentos, 6. 1990.

BODDEY, R.M. Identification of wetland rice genotypes with potencial for biological nitrogen fixation. **In: International Symposium on sustainable Agriculture for the tropics - The Role of Biological nitrogen fixation.** Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brazil, 26<sup>th</sup> november – 1<sup>st</sup> december, p. 242 – 243, 1995.

BONILLA, G.A.S. **Seleção de bactérias diazotróficas solubilizadoras de fósforo e seu efeito no desenvolvimento de plantas de arroz.** f 48-64. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Fitotecnia) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.

BRADY, N.; WEIL, R. **Elements of the nature and properties of soils.** Segunda edição. Editorial Prentice Hall. 606 p. 2004.

BRASIL, M. **Ocorrência e Diversidade Genética de Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Variedades de Arroz RJ.** 105 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2005.

BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira Café - Safra 2012. Segunda estimativa, maio. Brasília - DF. 2012.

BREMNER, J.M.; MULVANEY, C.S. Nitrogen total. In: RAGE, A. L., (ed.) *Methods of soil analysis*. Part 2. 2 ed. Madison: **Soil Science Society of America**, p. 595 – 624. 1982.

BRESEGHELLO, F.; MORAIS, O.P.; CASTRO, E.M. Cultivo de Arroz de Terras Altas no Estado do Mato Grosso. *Sistemas de Produção*, No. 7. Embrapa Arroz e Feijão, 2006.

BRESEGHELLO, F.; MORAIS, O.P.; CASTRO, E.M.; CASTRO, A.P.de; UTUMI, M.M.; LOPES, A. de M.; PEREIRA, J. de A.; CORDEIRO, A.C.C.; SOUZA, N.R.G.de.; LOBO, V.L da S.; SOARES A.A; GUIMARÃES, C.M.; BASSINELLO, P.Z.; FONSECA, J.R.; KOAKUZU, S.N.; PRABHU, A.S.; BRS Pepita: cultivar de arroz de terras altas produtiva e precoce, Comunicado Técnico, 150, Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2007.

CAMPOS, D.V.B.; RESENDE, A .S.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R. & BODDEY, R.M. Identification of wetland rice genotypes with potencial for biological nitrogen fixation. **In: International Symposium on sustainable Agriculture for the tropics - The Role of**



**Biological nitrogen fixation.**Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brazil, 26<sup>th</sup> november – 1<sup>st</sup> december, p. 242 – 243, 1995.

COCKING, E.C. Concerted action for cereal and other non-legume crop nitrogen fixation, enhanced growth and yield.in: KENNEDY, I.R.; CHOUDHURY, A.T.M.A. (Eds.). **Biofertilizers in Action**, Rural Industries Research and Development Corporation, Canberra, p. 1–3, 2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento de safra brasileira: grãos, terceiro levantamento, Dezembro de 2013. Disponível em [www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/4graos\\_07\\_01.10.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/4graos_07_01.10.pdf). Acesso em: 15 de setembro de 2014.

DOBDELAERE, S. VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*.22(2):107–149, 2003.

DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em gramíneas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 1, n. 1, p. 01 – 54,1977.

DÖBEREINER, J., BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas.** – Brasília: EMBRAPA – SPI, Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 1995, 60 p.

DOWNING, K. J.; LESLIE, G.; THOMSON, J. A. Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis* cry1Ac7 and *Serratia marcescens*. A genes in sugarcane-associated bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.7,p.2804-2810, 2000.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE, B.; HAMADA, T.; ISAWA, T.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. Isolated from wild rice species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5285 – 5293, 2001.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 5.0. In: **45a Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria**. UFSCar, São Carlos, SP, 2003. p.255-258.

FERREIRA, J.S.; SABINO D.C.C.; GUIMARAES, S.L.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. Seleção e veículos para o preparo de inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado, **Revista Agronomia**, vol. 37, nº 2, p. 06 - 12, 2003.

FERREIRA, J.S.; GOI, S.R.; BALDANI V.L.D.; BALDANI J.I., Serviços ambientais na agricultura: a contribuição das bactérias fixadoras de nitrogênio associadas ao arroz. **Revista: Floresta e Ambiente**. v15, n.2, p. 35 - 39, 2008.

FIGUEREDO, M. V.B.; SOBRAL, J.K.; STAMFORD, T. L.M.; ARAÚJO, J. M. Bactérias promotoras do crescimento de plantas estratégia para uma agricultura Sustentável. **In: Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais/ editores técnicos**, Márcia do Vale Barreto Figueredo, Hélio Almeida Burity, José de Paula Oliveira, Carolina Etienne de Rosália e Silva, Newton Perreira Stamford- Brasília, DF:

Embrapa Informação Tecnológica; Recife, PE: Instituto Agrônômico de Pernambuco. 761 p., 2010.

GUIMARAES, S. L.; BALDANI, J. I; BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas em arroz de sequeiro. **Revista Agronomia**, v.37, p.25-30, 2003.

GUIMARAES, S.L.; CAMPOS, D.T.S.; BALDANI, V.L.D.; NETO, J.J. Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada em Variedades de arroz. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 4, p. 32-39, out.-dez., 2010

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.E. Fixação biológica do nitrogênio com a cultura de soja. Workshop Nitrogênio na sustentabilidade de sistemas intensivos de produção agropecuária, pg. 51-75, Dourados-MS, 2000.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. Documentos n. 325, Londrina: EmbrapaSoja, 2011.

JAMES, E.K.; BALDANI, J.I. The role of biological nitrogen fixation by non-legumes in the sustainable production of food and biofuels. *Plant and Soil*, v. 356, n.1, p. 1 - 3, 2012.

JEYABAL, A. and KUPPUSWAMY, G.; Recycling of Organic Wastes for the Production of The Vermicompost and its Response in Rice-Legume cropping system and fertility. **Eur. J. Agron.** International Rice Research 15: 153-170, 2001.

GUIMARÃES, E.P.; SANT'ANA, E.P. Sistemas de cultivo. In: VIEIRA, N.R.A.; SANTOS, A.B.; SANT'ANA, E.P. **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA arroz e feijão. P.17-35. 1999

GUIMARÃES, A. P. **Bases bioquímicas do fracionamento isotópico de  $^{15}\text{N}$  na fixação biológica de nitrogênio e da eficiência energética do processo em diferentes estirpes de bactérias diazotróficas**. 79p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campus, RJ, 2010.

KENNEDY, I. R. & ISLAM, N. The current and potential contribution of asymbiotic nitrogen fixation to nitrogen requirements on farms: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture** , v.41, p.447-457, 2001.

KUNDU, D. K., LADHA, J. K. Engancing soil nitrogen use and biological nitrogen fixation in wetland rice. **Experimental Agriculture**, v. 31, n. 3, p. 261-278, 1995.

LEE, S. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconactobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. **Journal of Bacteriology**, v.186, n°16, p. 5384-91, 2004.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO- MAPA, Culturas, Arroz. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/arroz> Acessado em 20/Set/2014.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NOBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *ComunicataScientiae* 1(2): p 74-99, 2010.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DOBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of Inoculants ingendophitic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v.242, p. 205-215, 2002.

OLIVEIRA, E. Quantificação da fixação biológica de nitrogênio em arroz (*Oryza sativa L.*) inundado. 135p. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 1994.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonasputtidagr12-2* by tryptophan and the stationary phase sigma factor RpoS. **Canadia journalmicrobiology**, v.48, p.635-642, 2002.

PENG, S.; BISWAS, J. C.; LADHA, J. K. *et al.* Influence of rhizobial inoculation on photosynthesis and grain yield of rice. **Agronomy Journal**, n. 94, p. 925 – 929, 2002.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, n.3, p. 227-247. 2000.

REIS, V.M.; OLIVEIRA, A.L.M.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In : FERNANDES, M.S. (ed.) *Nutrição Mineral de Plantas*. SBCS, Viçosa, 2006. 154- 194p.

RODRIGUES, L. S.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. **Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado**. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.41, n.2, p.275-284, 2006.

RODRIGUES, L. S. **Estudo da diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a Variedades de arroz inundado**. Seropédica: UFRRJ, 2003. 85p. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciências do solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum*spp. **Naturwissenschaften**, v.91, p.552–555, 2004.

SABINO, D. C. C. **Metabolismo de nitrogênio em plantas de arroz (*OryzasativaL.*) em associação com bactérias diazotróficas endofíticas**. 75p. **Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência do solo)** - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2003.

SABINO, D.C; FERREIRA, J.S; GUIMARAES, S.L; BALDANI, V.L.D. Bactérias Diazotróficas como promotoras do desenvolvimento de plântulas de arroz, **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p.2012.

SAWAR, M.; KREMER R.J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 20, p.282-285, 1995.

STOLLER DO BRASIL- MASTERFIX GRAMÍNEAS. Disponível em [www.stoller.com.br/stoller-do-brasil/publicacoes/2011/09/03/inoculante-masterfix-gram%C3%ADneas-comprova-efici%C3%Aancia-e-sustentabilidade](http://www.stoller.com.br/stoller-do-brasil/publicacoes/2011/09/03/inoculante-masterfix-gram%C3%ADneas-comprova-efici%C3%Aancia-e-sustentabilidade), Acessado em 11/mar/2013.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, v.12, p.15-22. 1982.

VIANA, T.O. **Isolamento e inoculação de bactérias diazotróficas em arroz (*Oryza sativa* L.) cultivado em Vitória da Conquista-BA**. 97 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Fitotecnia), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista. 2012.

VIDEIRA, Sandy.Sampaio. **Taxonomia polifásica de bactérias diazotróficas do gênero *Sphingomonas* spp. e efeito da inoculação em plantas de arroz**. 126 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2008.

TERRES, A. L. S. et al. **Melhoramento genético do arroz irrigado**. In: GOMES, A.S. & MAGALHÃES JR., A.M., eds. Arroz irrigado no Sul do Brasil. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, p.259-303, 2004.

WU, P. et al. Molecular-marker-facilitated investigation on the ability to stimulate N<sub>2</sub> fixation in the rhizosphere by irrigated rice plants. **Theoretical Applied Genetics**, v. 91, n. 8, p. 177-1183, 1995.

## 7. ANEXOS

### A. Meios de Cultivo utilizados

#### Meio Batata

Batata cozida 200g

Ácido málico 2,5g

Açúcar 2,5g

Sol. de micronutrientes para meio de Cultura 2 ml

Vitamina para meio de cultura 1ml

Ajustar o pH para 6,8 – 7,0 com solução de KOH a 1%.

Completar para 1000 ml com água destilada.

Adicionar 1,84 g l<sup>-1</sup> de agar para semi-sólido e 15 g l<sup>-1</sup> de agar para sólido.

**Meio NFb** (BALDANI & DÖBEREINER, Soil Biology & Biochemistry. Oxford, v. 12, n. 4, p. 433-439, 1980)

Ácido málico 5 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (solução 10%) 5 ml

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 2 ml

NaCl (solução 10%) 1 ml

CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (solução 1%) 2 ml

FeEDTA (solução 1,64%) 4 ml

Azul de bromotimol 0,5% em 0,2N de KOH 2 ml

Sol. de micronutrientes para meio de cultura 2 ml

Vitamina para meio de cultura 1 ml

KOH 4,5 g

Ajustar o pH para 6,5.

Completar para 1000 ml com água destilada.

Adicionar 1,9 g e 17 g de agar/L para meio semi-sólido e sólido respectivamente.

**Meio JNFb**(DÖBEREINER e outros, Embrapa-SPI, Brasília, 1995)

Ácido málico 5 g

$K_2HPO_4$  (solução 10%) 6 ml

$KH_2PO_4$ (sol. 10%) 18 ml

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (sol. 10%) 2 ml

NaCl (solução 10%) 1 ml

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (solução 1%) 2 ml

Solução de micronutrientes para meio de cultura 2 ml

Azul de bromotimol 0,5% em 0,2N de KOH 2 ml

FeEDTA (solução 1,64%) 4 ml

Vitamina para meio de cultura 1 ml

KOH 4,5 g

Ajustar o pH para 5,8 com KOH e completar o volume para 1000 ml. Adicionar 1,7 g e 17 g de agar/L para meio semi-sólido e sólido respectivamente. Ao meio sólido adicionar 20mg de extrato de levedura.

**Meio DYGS** (RODRIGUEZ NETO, SummaPhytopathologica, Campinas, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986. )

Glicose 2,0 g

Ácido málico 2,0 g

Peptona bacteriológica 1,5 g

Extrato de levedura 2,0 g

$K_2HPO_4$  0,5 g

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,5 g

Ácido glutâmico 1,5 g

Água destilada 1000 ml

pH 5,0 – Burkholderia spp.

pH 6,0 – Herbaspirillum spp.

pH 6,8 – Azospirillum spp.

pH 6,0 – Gluconacetobacter diazotrophicus (sem a adição do ácido málico ao meio).

## **B. Soluções**

### **Solução salina para diluição de células**

$K_2HPO_4$  (solução 10%) 1,0 ml

$MgSO_4$  (solução 10%) 0,5 ml

$NaCl$  (solução 10%) 0,2 ml

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (solução 1%) 0,5 ml

$FeEDTA$  (solução 1,64%) 1,0 ml

Sol. demicronutrientes para meio de cultura 0,5 ml

Ajustar o pH para 6,5 com sol. de ácido sulfúrico 5%.

Completar com água destilada para 1000 ml

### **Solução de micronutrientes para meio de cultura**

$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  0,200g

$MnSO_4 \cdot H_2O$  0,235g

$H_3BO_3$  0,280g

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0,008g

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0,024g

Completar o volume para 200 ml com água destilada.

### **Solução de vitaminas**

Biotina 10 mg

Piridoxol – HCl 20 mg

Dissolver em banho-maria e completar o volume para 100 ml com água destilada,

$K_2HPO_4$  sol. 10 % 1 ml

$MgSO_4$  sol. 10 % 0,5 ml

$NaCl$  sol. 10 % 0,2 ml

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$  sol. 10 % 0,5 ml

$FeEDTA$  sol. 1,64 % 1 ml

Sol. De micronutrientes para meio de cultura 0,5 ml

Manter a solução em geladeira.