Fundação Educacional do Município de Assis
Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis
Campus "José Santilli Sobrinho"

RAFAEL LUDOVICO

APLICAÇÃO DE AZOSPIRILLUM BRASILIENSE NA CULTURA DO MILHO PARA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

Assis
2011

RAFAEL LUDOVICO

APLICAÇÃO DE AZOSPIRILLUM BRASILIENSE NA CULTURA DO MILHO PARA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

Trabalho de conclusão de curso de Curso apresentado ao Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, como requisito do Curso de Graduação em Química industrial.

Orientador: Profº.Ms.Gilcelene Bruzon

Área de Concentração: Química

Assis
2011

FICHA CATALOGRÁFICA

LUDOVICO, Rafael

Aplicação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho para fixação de nitrogenio/Rafael Ludovico. Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA -- Assis, 2011.

39p.

Orientador: Glicelene Bruzon.

Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA.

1.Milho. 2.Inoculante. 3.Diazotrofica.4.Bactéria.

CDD:660

Biblioteca da FEMA

APLICAÇÃO DE AZOSPIRILLUM BRASILENSE NA CULTURA DO MILHO PARA FIXAÇÃO DE NITROGENIO

RAFAEL LUDOVICO

Trabalho de Consclusão de Curso apresentado ao Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, como requisito do Curso de Graduação, analisado pela seguinte comissão examinadora:

Orientador: Profº.Ms.Gilcelene Bruzon

Analisador: Prof°.Ms. Marta Elenita Donadel

Assis
2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Deus
e meus pais Sergio e Lucia, pelo
apoio e suporte que me deram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me ajudado a ter chego até aqui.

À professora Gilcelene Bruzon, pela orientação e pelo constante estímulo transmitido durante o trabalho.

Aos amigos, Ronaldo Carlos Silva, Edgar Inácio Luduvico pelo apoio técnico que me deram, tambem gostaria de agradeçer ao André Cobra Cirino Nicollielo Vencio por seder a terra para que eu pudesse realizar este trabalho, e a todos que colaboraram direta ou indiretamente, na execução deste trabalho.

Aos familiares, que sempre me deram força para conseguir completar este trabalho e principalmente a meus pais Sergio e Lucia, por todo esforço que fizeram para me ajudar a fazer este trabalho e tambem a concluir minha graduação.

Cada um de nós tem um fogo no coração para alguma coisa. É nossa meta na vida encontrá-lo e mantê-lo aceso.
(Mary Lou Retton)

RESUMO

Este trabalho descreve o uso de um inoculante agricola à base da bácteria *Azospirillum brasilense* que contribui para o crescimento das plantas fornencendo nitrogênio numa forma disponivel para a planta. No vale do paranapenema a agricultura é uma das principais fontes de renda para a população, quanto maior a produtividade melhor poderá ser a qualidade de vida das pessoas que residem no local. Para avaliar a ação do inoculante agricola foram feitos dois testes, um em campo e outro *in vitro*, ambos tendo uma testemunha. O teste *in vitro* foi conduzido numa caixa de vidro com areia e nenhum tipo de adubação, com a finalidade de verificar a ocorrência de emergência do cultivar com a adição do inoculante. No teste em campo foi realizada uma planta com trator e plantadeira mecanizada, após o ciclo total da planta foi realizada a colheita mecanizada e comparada as produtividades. Após vinte dias foi realizada uma avaliação no crescimento e formação dos milhos no teste *in vitro*, observou-se que não houve qualquer mudança entre as plantas, tendo elas as mesmas características morfológicas. No teste em campo onde não houve aplicação do inoculante *Azospirillum brasilense* foi obtida uma produtividade média de 222 sacas de 60 kg por alqueire, já no experimento em campo com a adição do inoculante *Azospirillum brasilense* houve uma produtividade média de 242 sacas de 60 kg por alqueire. A inoculação do milho com a estirpe *Azospirillum brasilense* contribuiu significativamente para o aumento do rendimento de grãos no milho hibrido, seu aumento de produtividade é de vinte sacas à mais, sendo assim pode-se concluir que o uso do inoculante *Azospirillum brasilense* é uma boa alternativa para incrementar a produtividade das lavouras de milho no vale do Paranapanema.

Palavras-chave: Milho; Inoculante; Diazotrofica; Bactéria.

ABSTRACT

This study describes the use of an agricultural inoculate basis on the bacterium Azospirillum brasilense that contributes to the growth of plants providing nitrogen in an available mode to the plant. In the valley of paranapanema the agriculture is one of the principal finance fonts to the population, higher productivity can makes better the quality of life of the people that live there. To evaluate the action of the agricultural inoculants were done two tests, one in field and other in vitro, both having a witness. The in vitro test was conducted in a glass box with sand without any kind of fertilizer, in order to verify the occurrence of emergence to cultivate with the addition of inoculants. In the field test was realized a plant with tractor and mechanized planter, after the full cycle of the plant was realized the mechanized crop and compared the productivities. After twenty days was realized an evaluation in the growth and formation of corns in the in vitro test, was observed that there wasn't any change between the plants and they have the same morphological features. In the field test where there wasn't the application of Azospirillum brasilense inoculants, was obtained a productivity medium of 222 bags of 60 Kg by bushel, and in the field experiment with the addiction of the inoculants Azospirillum brasilense there was a productivity medium of 242 bags of 60 Kg by bushel. The inoculation of the corn with the Azospirillum brasilense race contributed significantly to the increase of grain yield in the hybrid coin, its increase of productivity is twenty bags more, so it can be concluded that the use of Azospirillum brasilense inoculants is a good alternative to increase the productivity of corn's tillage in the valley of the Paranapanema.

Keywords: Maize; inoculants; diazotrophic; bacteria.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Evolução do Milho..... 16

Figura 2 – Ciclo do Nitrogenio..... 19

Figura 2 – Ciclo do Nitrogenio..... 27

Figura 3 – Reação da Nitrogenase..... 23

Figura 4 – 3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-5-methyl-1,3,5-oxadiazinan-4-ylidene (nitro)amine..... 29

Figura 5 – Inoculante Agricola..... 29

Figura 6 – Tratador de sementes manual..... 30

Figura 7 – Abastecimento da plantadeira com as sementes de milho..... 30

Figura 8 - Plantadeira fazendo o plantio..... 31

Figura 9 - Planta manual na caixa de vidro..... 32

Figura 10 - Imagem da caixa de vidro já semeada..... 32

Figura 11 - Milho aos vinte dias sem alteração..... 33

Figura 12 - Imagem da diferença de tamanho do milho..... 34

Figura 13 - Colheita do milho..... 34

SUMÁRIO

1.	**INTRODUÇÃO**	**13**
2.	**MILHO**	**15**
2.1	HISTORICO	15
2.2	DOMESTICAÇÃO DO MILHO	15
2.3	FISIOLOGIA DO MILHO	16
2.3.1	**Sistema Radicular do Milho**	**16**
2.3.2	**Folhas do Milho**	**17**
2.3.3	**Colmo**	**17**
2.3.4	**Inflorescência**	**17**
2.3.5	**Florescimento**	**17**
2.3.6	**Polinização**	**18**
3.	**A IMPORTANCIA DO NITROGENIO PARA AGRICULTURA**	**19**
3.1	Ciclo do Nitrogenio	19
3.2	USOS DO NITROGÊNIO EM FERTILIZANTES NO SÉCULO XX	20
3.3	PROPRIEDADES DA ADUBAÇÃO COM NITROGÊNIO	20
3.4	MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO	21
3.4.1	**Rizóbios**	**21**
3.4.2	**Diazotróficos**	**21**
3.4.3	**Cianobactérias**	**22**
3.4.4	**Franckia**	**22**
3.5	Processo de Fixação Biológica do Nitrogênio	22
4	***Azospirillum brasilense***	**24**
5	**PRODUÇÃO DE INOCULANTES AGRICOLAS**	**25**
5.1	HISTORIA DO INOCULANTE AGRICOLA	25
5.2	MEIOS DE CULTURA	25

5.3 CULTURA PURA DO *Azospirillum brasilense*..... 25
6. APLICAÇÃO NO ENSINO MEDIO..... 26
7. MATERIAIS E METODOS..... 28
7.1 MATERIAIS..... 28
7.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS..... 28
7.2.1 Procedimento em campo..... 28
7.2.2 Procedimento *in vitro*..... 31
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 33
8.1 TESTE IN VITRO..... 33
8.2 TESTE EM CAMPO..... 33
9. CONCLUSÃO..... 35
REFERENCIAS..... 36

1. INTRODUÇÃO

O aumento acentuado da população humana e, principalmente, da taxa de crescimento populacional após a Revolução Industrial na segunda metade do século XIX, implicou um aumento da produtividade agrícola para fazer frente à demanda crescente de alimentos (MALAVOLTA, 1989).

O nitrogênio, assim como o fósforo, são fatores limitantes do crescimento dos vegetais e tornaram-se, por isso, alguns dos principais fertilizantes utilizados hoje na agricultura. O nitrogênio desempenha um importante papel na constituição das moléculas de proteínas, ácidos nucléicos, vitaminas, enzimas e hormônios, elementos vitais aos seres vivos (LESSA, 2007). O nitrogênio (N) compõe aproximadamente 78% da atmosfera. Entretanto, os animais e as plantas não podem absorvê-lo diretamente do ar na forma do gás N_2 (MALAVOLTA, 1989).

Geralmente as formas disponíveis ou “combinadas” de nitrogênio para a nutrição dos seres vivos incluem as combinações amoniacais (NH_4^+), nítricas (NO_3^-) ou orgânicas ($R\text{-}NH_2$) que são metabolizadas visando à construção de biomassa (OSAKI, 1991). Para as culturas de poáceas, como o arroz e o milho, a adubação nitrogenada mineral destaca-se por ser uma prática de cultivo onerosa ao sistema agrícola, chegando a 40-50% do custo de produção; por ser exigente em energia na indústria, consumir grande quantidade de derivados de petróleo, além de representar risco de contaminação ambiental (ZILLI, 2007).

Salienta-se que a disponibilidade biológica do nitrogênio (N) no solo, juntamente com o fósforo (P), enxofre (S) e potássio (K) tem relação direta com a produtividade agrícola. Certas bactérias do solo e as algas azuis dos oceanos convertem o nitrogênio do ar em amônia, sendo que algumas plantas absorvem diretamente a mesma (OSAKI, 1991). Dentre essas bactérias a do gênero *Azospirillum*, especificamente, alcançam o sistema radicular das gramíneas jovens, tecido corticais das raízes, onde se desenvolvem fixando N_2 atmosférico, transformando em sais de nitrogênio que são utilizados pelas plantas (NH_4^+, NO_2, NO_3); atuando como adubo, chamado também de inoculante agrícola (HUERGO, 2006).

Estudos de inoculação de milho mostram aumento da taxa de matéria seca, a qual se acredita estar relacionada com aumento na atividade das enzimas fotossintéticas. Em condições de campo, dependendo da variedade de milho, o incremento na produção pode chegar a 30% quando a inoculação é efetuada com estirpes selecionadas, havendo grande variabilidade na capacidade de obter nitrogênio (DIDONET, 1996).

Este trabalho tem como objetivo testar a contribuição da inoculação da estirpe diazotrófica *Azospirillum brasilense* para o rendimento de grãos da cultura de milho.

2. MILHO

2.1 HISTÓRICO

O milho é um cereal da família das Gramíneas de extrema importância, já que é o terceiro cereal mais cultivado atualmente no mundo. O milho não é nativo do Brasil, a primeira espiga de milho foi encontrada no vale de Tehucan, região onde hoje se localiza o México, datada em aproximadamente 7000 a.C. (NAKAMURA, 2010).

O milho é um cereal derivado do Teosine que era chamado de “alimento dos Deuses” pelos maias, e o Teosine deu origem ao milho por meio de uma seleção artificial (feito pelo homem) (NAKAMURA, 2010).

As primeiras descrições do milho foram relatadas em 1492, na costa norte de Cuba. Aparentemente foi Cristóvão Colombo que levou as sementes à Espanha na sua viagem de volta em 1493, embora seja provável o contato de outros explorados europeus (TERRA, 2004).

2.2 DOMESTICAÇÃO DO MILHO

O milho que conhecemos hoje nem sempre foi como observamos, inicialmente os grãos eram expostos fora da casca, formando um sabugo, e gradativamente as sementes foram se agrupando em fileiras de dois e assim se torando o sabugo que conhecemos hoje (Figura 1). Mais tarde já com os sabugos formados, os antepassados dos astecas foram selecionando somente as plantas que mais produziam em certas regiões, e assim foram desenvolvendo variedades diferentes de milho ideais para certas regiões, com diferenças geográficas e com esse trabalho dos astecas o milho conseguiu se desenvolver em varias regiões do mundo (NAKAMURA, 2010).

Figura 1: Evolução do milho

2.3 FISIOLOGIA DO MILHO

O milho, *Zea mays*, pertence à família das gramínea/poaceae, os aspectos vegetativos e reprodutivos da planta podem variar com alterações no fator ambiental que afetam o controle ontogenio do desenvolvimento (MAGALHÃES, 2002).
Essas plantas demonstram aspectos externos característicos: caule do tipo colmo, com clara divisão em nós engrossados e entrenós longos, rodeados pelas bainhas alargadas das folhas, longas e estreitas, ordenadas em duas séries ao longo do caule (WEBERLING, SCHWANTES, 1986).

2.3.1 Sistema radicular do milho

O milho tem mais de um tipo de raiz, tem as raízes primárias e seminais que se desenvolvem dos primórdios do embrião e fixam a plântula até três semanas. As raízes adventícias surgem de seis a dez nós e ficam localizadas abaixo da superfície do solo, e as raízes de suporte que são raízes adventícias que surgem acima da superfície do solo e que da sustentação a planta (MAGALHÃES, 1994).

2.3.2 Folhas do milho

O milho possui de cinco a quarenta e oito folhas que se arranjam alternadas umas das outras e suportadas no colmo através de suas bainhas. As folhas podem variar de longas estreitas a curtas e largas, e ter posição horizontal ou vertical em relação ao colmo (MAGALHÃES, 1994).

2.3.3 Colmo

O colmo do milho pode medir de 0,6 a 0,7 m, sendo que sua altura final e o diâmetro são diretamente afetados pela disponibilidade de água e nutrientes, temperatura e quantidade de luz, mas podendo variar de 1 a 4 metros de altura final (MAGALHÃES, 1994).

2.3.4 Inflorescência

O milho é uma planta monóica, ou seja, apresenta flores unissexuais, mas distribuídas no mesmo indivíduo, a parte masculina se apresenta no pendão, e a parte feminina se apresenta na espiga (MAGALHÃES, 1994).

2.3.5 Florescimento

O florescimento ocorre aproximadamente entre 50 a 100 dias após o plantio, mas pode variar de acordo com a temperatura local, a temperatura considerada ideal para o florescimento gira em torno de 30° a 35°C de dia com noites amenas (MAGALHÃES, 1994).

2.3.6 Polinização

A polinização do milho consiste na transferência de pólen da flor masculina (pendão) para a flor feminina (estigma), cada planta libera aproximadamente de dois a cinco milhões de grãos de pólen, para fertilizar aproximadamente mil grãos por planta. Porém pela sua organização morfológica o milho não consegue se autofecundar, ou seja, mesmo a planta apresentando os órgãos sexuais masculinos e femininos se não tiver outra planta perto ela não terá produtividade significativa, cerca de apenas 2% do pólen liberado por uma planta pode se autofecundar, sendo assim o milho tem um sistema de polinização de que tem o nome de polinização cruzada, ou seja, uma troca de pólen entre as plantas (MAGALHÃES, 1994).

3. A IMPORTÂNCIA DO NITROGÊNIO PARA AGRICULTURA

3.1 CICLO DO NITROGÊNIO

O nitrogênio é um elemento que possui propriedade de circular entre plantas, animais e o solo. Este processo chama-se ciclo do nitrogênio (Figura 2), que é um dos ciclos mais importantes no ecossistema terrestre (LESSA, 2007).

Apesar da grande quantidade de nitrogênio existente na atmosfera o ciclo do nitrogênio envolve principalmente organismos e o solo. Como nos ciclos de outros elementos organógenos (C, P, S), também cabe aos microrganismos controlar a velocidade no reabastecimento de nitrogênio. A quantidade de nitrogênio transformada pelos microrganismos em compostos assimiláveis pelas plantas é superior a quantidade de nitrogênio convertido por processos industriais (LARCHER, 1986).

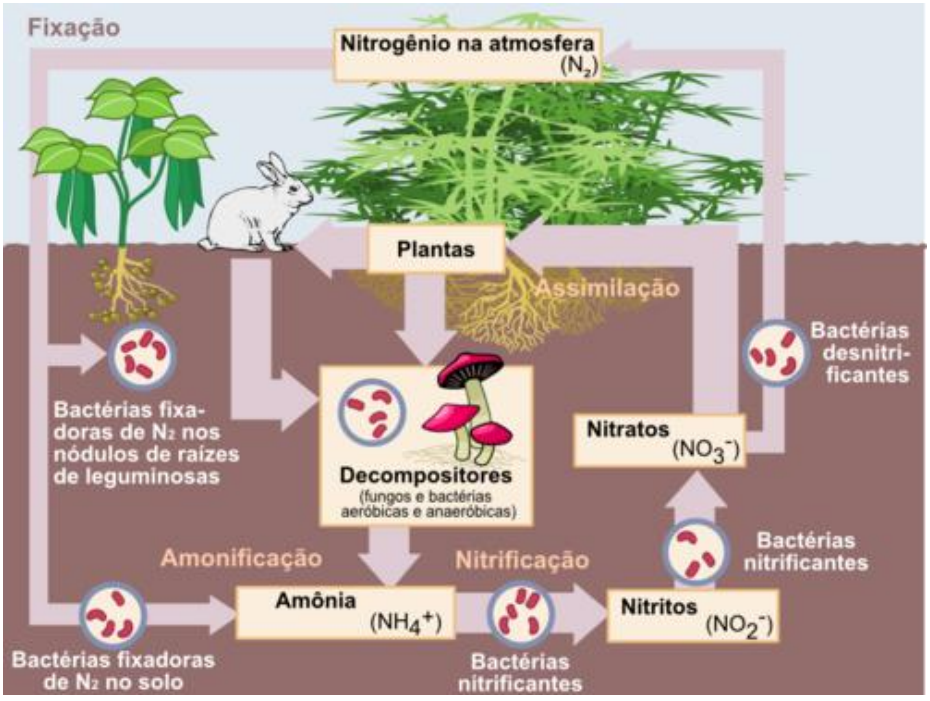

Figura 2: Ciclo do Nitrogênio

3.2 USOS DO NITROGÊNIO EM FERTILIZANTES NO SÉCULO XX.

O aumento da população neste século foi suportada, primeiro, pelo processo de Haber-Bosch (que combina nitrogênio e hidrogênio, formando amônia ou produzindo outros compostos como uréia), sendo necessário cerca de 1,3 toneladas de combustível fóssil para fixar 1 tonelada de nitrogênio em alta pressão (35 a 100 Mpa) e temperatura (300 a 400ºC), com cerca de $77x10^6$ toneladas de nitrogênio aplicados globalmente como fertilizante. O requerimento de combustível fóssil é cerca de $91x10^9$ toneladas por ano, isto corresponde a aproximadamente 1,4% de todo o combustível fóssil consumido. Segundo, a Revolução Verde, o aumento da produção de cereais está associado à utilização, em doses elevadas, deste tipo de fertilizante sintético. Além do alto consumo de combustível, existem outros problemas como a contaminação da água e de alimentos por NO_3 e NO^{-2}, toxicidade das plantas pela presença de altos níveis de NO^{-2} nos solos alteração no desenvolvimento das plantas pelo excesso de N e a emissão de CO_2 contribuindo para o aquecimento global (NUNES, 2003).

3.3 PROPRIEDADES DA ADUBAÇÃO COM NITROGÊNIO

Com a exceção da água, o nitrogênio é geralmente considerado o nutriente mais limitante para o crescimento de plantas no seu ambiente natural. Além do carbono e hidrogênio, o nitrogênio é o nutriente mais abundante na matéria viva, participando na composição de moléculas de ácidos nucléicos, proteínas e polissacarídeos entre outras. Entretanto, apesar de ser requerido em quantidades significativas pelos seres vivos, na natureza o nitrogênio é encontrado em abundância em uma forma quimicamente muito estável e, portanto sua pronta assimilação pela maioria dos seres vivos é limitada, requerendo sua transformação para uma forma combinada que facilite sua assimilação (MARIN, 1999).

3.4 MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO.

O número de gêneros e espécies de microrganismos fixadores de nitrogênio vem aumentando consideravelmente nos últimos anos, e com o aumento das espécies de microrganismos, também houve um aumento na diversidade e sendo assim as características mudam de uma espécie para a outra. Com isso houve a necessidade de se classificar os microrganismos em grupos com algumas semelhanças. (LOPES, 2006).

Os microrganismos fixadores de N são agrupados em rizóbios, diazotróficos, cianobactérias e franckia.

3.4.1 Rizóbios

Incluem-se nesse grupo as bactérias dos gêneros A*zorhizobium, Bradyrhizobium, Rhizobium, Mesorhizobium, Sinorhizobium* esses gêneros geralmente estabelecem associação simbiótica com a maioria das leguminosas (LOPES, 2006).

3.4.2 Diazotróficos

Incluem nesse grupo bactérias dos gêneros B*eijerinckia, Azotobacter, Azospirillum, Herbaspirillum* esses gêneros geralmente vivem na rizosfera de gramineas sem formar nódulos, proporcionando benefícios para a planta através da fixação do nitrogênio (LOPES, 2006).

3.4.3 Cianobactérias

Incluem-se nesse grupo as bactérias do gênero *Azolla*, que são microrganismos fotossintéticos que normalmente se encontram associados em simbiose com pteridófitas aquáticas (LOPES, 2006).

3.4.4 *Franckia*

Esse termo designa em microrganismo de um gênero de Actinomiceto, em microrganismo fixador de N, mas que pouco se sabe, pois no Brasil a poucas pesquisas por razões econômicas (LOPES, 2006).

3.5 Processo de Fixação Biológica do Nitrogênio

A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é um processo exclusivo dos microorganismos, seja ele de vida livre ou associado a outros organismos (parasitas ou simbioticamente), esse processo só é possível graças à propriedade que esses microorganismos têm de produzir a enzima nitrogenase e outros componentes essenciais para ocorrer à fixação de nitrogênio (LOPES, 2006).

O nitrogênio é um dos elementos mais críticos para cultivo de plantas, pois sua quantidade no solo é limitada, porem aproximadamente 78% do ar atmosférico é gás nitrogênio (N_2), mas não pode ser assimilado pela maioria dos organismos. O gás nitrogênio é constituído por dois átomos de nitrogênio fortemente ligados por uma ligação tripla, por esse motivo a grande maioria dos organismos não pode assimilar (ALVES, 2007).

Para converter o N_2 em uma forma assimilável é necessário fornecimento de alta temperatura e pressão, (fixação artificial do N_2 pelo processo de Haber-Bosch), já a fixação biológica do N_2 ocorre através do complexo enzimático nitrogenase, presente em apenas alguns organismos procariontes. A fixação biológica utiliza energia

celular em forma de ATP, no entanto a reação (figura 3) pode ocorrer em temperatura e pressão ambiente (ALVES, 2007).

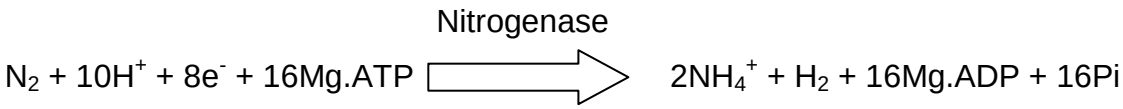

Figura 3: Reação da Nitrogenase.

4. *Azospirillum brasilense*

As bactérias do gênero *Azospirillum* são bactérias diazotrófica, ou seja, microrganismos aeróbios que se associam as raízes de diversas plantas, mas em especial as das gramíneas, e por isso seu valor comercial (HUERGO, 2006).

As células do *Azospirillum brasilense* são em forma de bastonetes curvos gordos que são 0.8µm - 1.0µm de diâmetro e 2 µm - 4 µm de comprimento. As células são tipicamente gram negativa, mas quando cultivadas em Agar nutriente algumas células são resistentes a manchas. Células cultivadas em meio semi-sólido ou líquido, com agitação. As células normalmente contêm grânulos de poli-β-hidroxibutirato (PHB) a partir de processos de fixação de nitrogênio (HUERGO, 2006).

5. PRODUÇÃO DE INOCULANTES AGRÍCOLAS

5.1 HISTÓRIA DO INOCULANTE AGRÍCOLA

Inoculante agrícola se trata de culturas puras de certas espécies de bactérias, a primeira fabrica de cultura pura foi estabelecida na Alemanha no inicio do século 20, ela cultivava bactérias do gênero *Rhizobium*. Em seguida os EUA também implantaram uma fabrica de cultura pura de *Rhizobium*. A primeira fabrica de *Rhizobium* no Brasil foi instalada no Rio Grande do Sul, em Pelotas no ano de 1953, teve total apoio da Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul (AQUARONE, 2002).

5.2 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura podem ser divididos em dois grupos: os complexos e os sintéticos. Os meios sintéticos são os meios que são preparados usando-se compostos puros e em proporções bem definidas. Os meios complexos são meios que são preparados usando-se produtos de origem animal, vegetal ou microbiana, sem composição definida (AQUARONE, 2002).

5.3 CULTURA PURA DO *Azospirillum brasilense*

As bactérias do gênero *Azospirillum* são capazes assimilar varias fontes de carbono, como por exemplo: D-gliconato, Arabinose, frutose, etanol, glicerol, fumarato, malato, lactato, ceto-gliconato (SILVA, 2006).

As bactérias do gênero *Azospirillum* têm a capacidade de assimilar o nitrogênio gasoso, por isso na sua cultura é borbulhado nitrogênio gasoso para que haja a procriação da bactéria (SILVA, 2006).

6. APLICAÇÃO NO ENSINO MÉDIO

O nitrogênio é um dos elementos mais importantes da atmosfera terrestre, é elemento básico na constituição de aminoácidos e ácidos nucléicos. O processo pelo qual o nitrogênio circula através das plantas e do solo pela ação de organismos vivos é conhecido como Ciclo do Nitrogênio (figura 2) (LESSA, 2007).

O nitrogênio é o elemento mais abundante na atmosfera terrestre, na sua forma molecular N_2, o nitrogênio do ar é absorvido pelas bactérias e é transformado em sais assimiláveis pelas plantas. Neste ponto o nitrogênio que estava na atmosfera já passou para a planta, e na planta tem duas rotas: A morte da planta ou a alimentação de algum animal pela planta. Na alimentação de um animal o nitrogênio que estava na planta passa para o animal na constituição de proteínas e ácidos nucléicos (LESSA, 2007).

Como o começo do ciclo do nitrogênio começa com bactérias ele também termina com as bactérias, que são as bactérias desnitrificantes que agem sobre o animal ou a planta morta, essas bactérias pegam o nitrogênio em forma de aminoácidos ou ácidos nucléicos e o transformam de novo em nitrogênio na sua forma molecular o N_2(LESSA, 2007).

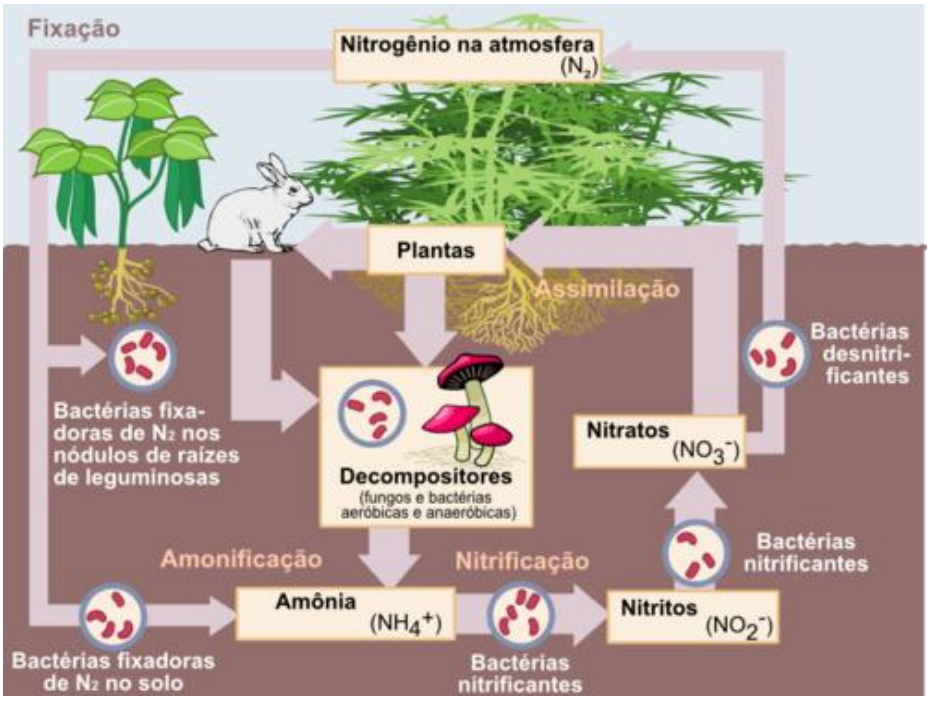

Figura 2: Ciclo do Nitrogênio

Hoje o estado de São Paulo utiliza apostilas distribuídas pelo governo. Estas apostilas já apresentam conteúdo especifico separado por série e bimestre. Na apostila do 3° ano do ensino médio, primeiro bimestre, é relatada a produção industrial da amônia a partir do processo Haber, abordando a influência da pressão e temperatura (SEE, 2011). Além do método industrial de Haber, é interessante que os alunos saibam que naturalmente o nitrogênio do ar pode ser utilizado e a amônia produzida. O assunto ciclo do nitrogênio é interessante, pois pode apresentar tanto a importância das descobertas para humanidade, como a importância da natureza para nossa sobrevivência.

7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 MATERIAIS

2 Sacos de sementes de milho hibrido com 60 mil sementes cada.

200 mililitros da solução de inoculante

240 gramas de inseticida a base de tiametoxam

12 litros de herbicida a base de atrazina

14 litros de herbicida a base de glifosato

Tratador de sementes manual

Plantadeira com seis linhas de plantio

Trator

Caixa de Vidro

Areia

7.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

O experimento foi realizado in vitro e em campo, comparando milho com e sem presença de inoculante.

7.2.1 Procedimento em campo

Primeiramente foi feita a escolha do local onde será conduzido o campo experimental, o local é numa fazenda de cultivo de soja e milho, com solo de terra

roxa localizada aproximadamente a 1,5km de São José das Laranjeiras, Maracaí-SP.

Após a escolha do local foi feio um controle de ervas daninhas com o herbicida a base glifosato, numa dosagem de 7 litros por alqueire, isto foi feito quatro dias antes do plantio.

Em seguida as sementes de milho passaram por um tratamento com o inseticida a base de Tiametoxam ($C_8H_{10}ClN_5O_3S$) (Figura 4), para proteger as sementes ao ataque de insetos, e depois foi feito a inoculação das sementes com *Azospirillum brasilense (*Figura 5) com 100 mililitros da solução por saco de semente, ambos os procedimentos foram realizados em um tratador de sementes manuais (Figura 6).

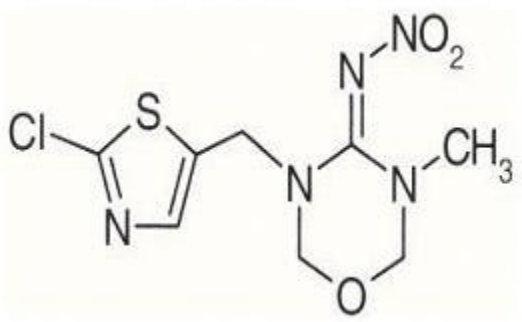

Figura 4: 3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-5-methyl-1,3,5-oxadiazinan-4-ylidene (nitro)amine.

Figura 5: Inoculante Agricola

Figura 6: Tratador de sementes manual

Após o tratamento das sementes foi feito o plantio um uma plantadeira PST3 TATU (Figura 7), rebocada por um trator Massey Fergunson 297, foi plantado dois alqueires, estes divididos em dose linhas (Figura 8).

Figura 7: Abastecendo a plantadeira com as sementes de milho

Figura 8: Plantadeira fazendo o plantio

Vinte e cinco dias após o plantio foi feito novamente o controle de ervas daninhas com um herbicida a base de Triazina, deixando assim todo o campo limpo de ervas, apenas com a cultivar. Após este procedimento foi aguardado o tempo do ciclo total do milho em torno de 120 dias. Depois desta etapa será feita a colheita do milho possibilitando compararmos a produtividade do milho inoculado com o mesmo outro cultivo sem a adição do Azospirillum brasilense.

7.2.2 Procedimento in vitro

O teste in vitro foi conduzido numa caixa de vidro com areia (Figuras 9 e 10) e nenhum tipo de adubação, a finalidade deste teste foi verificar se haverá alguma diferença na emergência do cultivar com a adição do inoculante.

Para este teste utilizou-se uma caixa de vidro com furos em baixo, de medidas de 70x20x50 cm (comprimento, largura e altura). Adicionou-se areia e em seguida foram plantadas oito sementes de milho com inoculante e oito sementes de milho

sem inoculante. Em ambos os testes foi adicionada água diariamente. O experimento foi conduzido durante vinte dias.

Figura 9: Planta manual na caixa de vidro

Figura 10: Imagem da caixa de vidro já semeada

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

8.1 TESTE *IN VITRO*

Após os vinte dias foi realizada uma avaliação no crescimento e formação dos milhos no teste in vitro, no experimento realizado in vitro não houve qualquer mudança entre as plantas, tendo elas as mesmas características morfológicas (figura 11).

Figura 11: Milho aos vinte dias sem alteração.

8.2 TESTE EM CAMPO

No experimento realizado em campo foram feitas várias avaliações agronômicas, as primeiras feitas sete dias após a emergência até o setuagésimo dia das plantas

verificou-se que não houve nenhuma mudança entres as plantas, somente após o setuagésimo dia foi verificado um aumento no tamanho das plantas inoculadas em aproximadamente 30 cm (figura 12) e este foi o mesmo até a colheita.

Figura 12: Imagem da diferença de tamanho do milho

Após a colheita (figura 13) na pesagem dos grãos foi possível observar que no teste em campo onde não houve aplicação do inoculante *Azospirillum brasilense* foi obtida uma produtividade média de 222 sacas de 60 kg por alqueire, já no experimento em campo com a adição do inoculante *Azospirillum brasilense* houve uma produtividade média de 242 sacas de 60 kg por alqueire.

Figura 13: Colheita do milho

9. CONCLUSÃO

A inoculação do milho com a estirpe *Azospirillum brasilense* verificou-se que contribuiu significativamente para o aumento do rendimento de grãos no milho hibrido. O custo para a aplicação do inoculante *Azospirillum brasilense* que fica em torno de R$ 10,00 por alqueire (aproximadamente 0,4 sacas de milho), levando em consideração que houve produtividade de vinte sacas por alqueire pode-se concluir que há um ganho livre de 19,6 sacas por alqueire, sendo assim pode-se concluir que o uso do inoculante *Azospirillum brasilense* é uma boa alternativa para incrementar a produtividade das lavouras de milho no vale do Paranapanema.

REFERÊNCIAS

ALVES, Gabriela Cavalcanti, **Efeitos da Inoculação de Bactérias Diazotróficas dos Generos *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em Genótipos de Milho**, 2007, 65p, Dissertação – Instituto de Agronomia – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

AQUARONE, Eugênio; BORZANI, Walter; SCHMIDELL, Willibaldo; LIMA, Urgel de Almeida. **Biotecnologia Industrial**. Processos fermentativos e enzimáticos. Editora Edgard Blucher, v. 3, 2002

CONCEIÇÃO, Patricia Marluci da in at, Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho, **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, setembro. 2009.p 1880-1883.

DIDONET, Agostinho Dirceu in at, Avaliação de Linhagens de Arroz de Terras Altas Inoculadas com *Azospirillum lipoferum* Sp59b e *Azospirillum brasilense* Sp245, In: **BOLETIM TÉCNICO**. Embrapa Arroz e Feijão, Comunicado Técnico, Goias, 2003.

DIDONET, Agostinho Dirceu in at, Acúmulo de Nitrogênio e de massa seca em plantas de Trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*, **Pesquisa Agropecuaria Brasileira,** v. 30, n. 9, setembro 1996, p 645-651.

HUERGO, Luciano Fernandes, **Regulação do Metabolismo de Nitrogênio em *Azospirillum brasilense***, 2006, 187p, Tese – Departamento de Bioquimica - Universidade Federal do paraná, Paraná, Curitiba, 2006.

LARCHER, Walter, **Ecofisiologia Vegetal**, 4° edição, São Paulo, Editora: Editora Pedagógica e Universitaria Ltda, 1986.

LESSA, Ruth Néia Teixeira, **Ciclo do Nitrogenio**, Universidade Federal de Pelotas Instituto de Química e Geociências Departamento de Química Analítica e Inorgânica, Disponível em: <http://www.ufpel.edu.br/iqg/livrovirtual/estanteamb_arquivos/nitrogenio.pdf>. Acesso em: 02 de junho de 2010.

LOPES, Ely Sidney. Fixação Biológica do Nitrogênio no Sistema Solo-Planta. In:NITROGÊNIO E ENXOFRE NA AGRICULTURA BRASILEIRA, 2, 2006, Piracicaba, Brasil. **Anais do Simpósio**, v.1, Abril, 2006, p.43-67.

MAGALHÃES, Paulo Cesar in at, Fisiologia do Milho, In: **BOLETIM TÉCNICO**, Embrapa, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, 2002, 23p.

MAGALHÃES, Paulo Cesar in at, Fisiologia da Planta do Milho, In: **BOLETIM TÉCNICO**, Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, Sete Lagoas, 1994.

MALAVOLTA, Euripedes, **ABC da Adubação,** 5° edição, São Paulo, Editora: Agronomica Ceres, 1989.

MARIN, Victor Augustus in at, **Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical**. Embrapa .Disponivel em:< https://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/download/doc091.pdf>. Acesso em:28 de julho de 2010.

MESQUITA, Eduardo Eustáquio, **Fixação Simbiótica e Processos de Transferencia de Nitrogênio das Leguminosas para as gramineas associadas**. Forragicultura. Disponivel em:< http://www.forragicultura.com.br/arquivos/FIXACAOSIMBIOTICAPROCESSOS.pdf>. Acesso em: 30 de agosto de 2010.

NAKAMURA, Erika in at, Guia do Milho tecnologica do campo a mesa, In: **BOLETIM TECNICO**. Conselho de Informações sobre Biotecnologia, Conselho de Informações sobre Biotecnologia, São Paulo, 2010.

NUNES, Fabio Souza, RAIMONDI, Angela Cristina, NIEDWIESKI, Antonio Carlos, Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases, **Química Nova**. V. 26, n.6, Dezembro, 2003. P 872-879.

OSAKI, Flora, **Calagem e Adubação**, 2° edição, Campinas, editora:Instituto Brasileiro de Ensino Agricola, 1991.

ROSA, Rogério da Silva, MESSIAS, Rossine Amorim, AMBROZINI, Beatriz, **Importância da compreesão dos ciclos biogeoquímicos para o**

desenvolvimento sustentavel. Universidade de São Paulo. Disponivel em< http://www.iqsc.usp.br/iqsc/servidores/docentes/pessoal/mrezende/arquivos/EDUC-AMB-Ciclos-Biogeoquimicos.pdf> Acesso em : 29 de abril de 2011.

Secretaria do Estado da Educação. SEE. Química. Apostila 3° Ensino médio v.1, 2011.

SILVA, Luana Rissi, **Produção experimental de inoculantes agrícolas á base de Azospirillum spp. para Fixação Biológica de Nitrogênio em gramíneas e Forrageiras**, 2006, 137p, Dissertação – Biotecnologia – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006

TERRA, Tatiana de Freitas, **Análises citogenéticas e moleculares em populações do milho (Zea mays L.), Teosinto (Zea mexicana L.) e em hibridos entre as duas especies**, 2004, 58p, Dissertação – Area de concentração de plantas de lavoura – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

WEBERLING, Focko, SCHWANTES, Hans Otto, **Taxionomia Vegetal**, 4° edição, São Paulo, Editora: Editora Pedagógica e Universitária Ltda., 1986.

ZILLI, Jerri Edson in at, Contribuição da bactéria diazotrófica Herbaspirillum seropedicae para o rendimento de grãos de arroz e milho em Roraima, In: **BOLETIM TÉCNICO**. Embrapa Roraima, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Roraima, Roraima, 2007.