

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SOLOS E QUALIDADE DE ECOSISTEMAS**

**EFICIÊNCIA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS PARA A
CULTURA DO MILHO EM DIFERENTES CONDIÇÕES
EDAFO-CLIMÁTICAS**

Rejane de Carvalho Nascimento

CRUZ DAS ALMAS – BA

2018

EFICIÊNCIA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS PARA A CULTURA DO MILHO EM DIFERENTES CONDIÇÕES EDAFO-CLIMÁTICAS

Rejane de Carvalho Nascimento

Bióloga

Universidade de Pernambuco, 2015

“Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Solos e Qualidade de Ecossistemas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Solos e Qualidade de Ecossistemas na Área de Ciência do Solo”.

Orientadora: Profa. Dra. Rafaela Simão Abrahão Nóbrega

Coorientador: Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior

CRUZ DAS ALMAS - BA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

N244e	<p>Nascimento, Rejane de Carvalho. Eficiência de bactérias diazotróficas para a cultura do milho em diferentes condições edafo-climáticas / Rejane de Carvalho Nascimento._ Cruz das Almas, BA, 2018. 57f.; il.</p> <p>Orientadora: Rafaela Simão Abrahão Nóbrega. Coorientador: Paulo Ivan Fernandes Júnior.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Milho – Cultivo. 2.Fixação biológica – Nitrogênio. 3.Produtividade agrícola – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 633.15</p>
-------	---

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas – UFRB.
Responsável pela Elaboração – Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário – CRB5 / 1615).
Os dados para catalogação foram enviados pela usuária via formulário eletrônico.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SOLOS E QUALIDADE DE ECOSISTEMAS**

**EFICIÊNCIA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS PARA A CULTURA
DO MILHO EM DIFERENTES CONDIÇÕES EDAFO-CLIMÁTICAS**

**Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de
Rejane De Carvalho Nascimento**

Aprovada em: 27 de abril de 2018.

Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior
Pesquisador Embrapa Semiárido
(Coorientador e Examinador Externo)

Prof. Dr. Júlio César Azevedo Nóbrega
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB
(Coordenador do Curso e Examinador Interno)

Prof. Dr. Carlos Augusto Dórea Bragança
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB
(Examinador Interno)

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Solos e
Qualidade de Ecossistemas em _____, conferindo o Grau
de Mestre em Solos e Qualidade de Ecossistemas em
_____.

DEDICATÓRIA

A minha mãe Maria Nazaré de Carvalho pelo apoio, confiança e amor que sempre me dedicou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado sabedoria, paciência e por me sustentar nos momentos difíceis.

A Prof. Dra. Rafaela Simão Abrahão Nóbrega e o Prof. Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior, pela amizade, confiança, dedicação e orientação durante o curso e no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Doutores Júlio César A. Nóbrega, Luciano da S. Souza, Oldair Del'Arco V. Costa, Anacleto Ranulfo, Euzelina dos S. B. Inácio e Carlos Alberto da S. Ledo pelas contribuições concedidas a minha formação acadêmica.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pela oportunidade de realizar este curso.

A Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudo.

A Embrapa Semiárido e CNPq pela concessão da estrutura e apoio financeiro para a realização dos trabalhos.

A minha família pelo amor dedicado, minha mãe Maria Nazaré, meus irmãos (Rosilene e Rosimário), sobrinhas (Nathália e Emilly), tia Josefa, minha cunhada Jeane e minha amiga de sempre Bruna Aragão, que mesmo de longe mantiveram-se presentes na minha rotina diária me incentivando a não desistir.

Às Doutoradas Indra Elena e Soniane, à doutoranda Maria Idaline pela amizade, conselhos e orientações, que me acompanharam desde minha graduação e mesmo de longe sempre estão presentes quando preciso.

A equipe de bolsistas, estagiários e funcionários da UFRB e Embrapa Semiárido por todo auxílio durante o desenvolvimento do trabalho, em especial aos os técnicos agrícolas (Cicero, Valfredo e Erivaldo).

Aos meus colegas no Laboratório de Microbiologia do Solo (Valéria, Reginaldo Neto, Lucas, Pâmela, Cláudia, Gilmar, Jonnathan, Jessica, Tainá, Tailane, Marcos e seu Luiz) e o estudante de agroecologia na UFRB Amauri, pela amizade compartilhada, no laboratório, no campo e nas confraternizações, que me retornaram além de muito aprendizado, várias risadas.

Às amigas Francielle Medeiros, Jucieny Ferreira e Camila Barberino, pelos momentos de alegria, colaboração e companheirismo que me ajudaram a suportar a falta da minha família e vencer mais essa etapa.

À minha turma do mestrado 2016.1 (Ésio, Flávia, Elisangela, Mathias, Jaqueline, Alyne e Bruno) aos quais dividimos diariamente os trabalhos, aflições, nervosismos e alegrias nesses dois anos de estudos.

Um agradecimento especial ao meu noivo, Luiz Carlos Richter, pelo carinho e amor compartilhado.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste.

Muito obrigada!

EFICIÊNCIA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS PARA A CULTURA DO MILHO EM DIFERENTES CONDIÇÕES EDAFO-CLIMÁTICAS

RESUMO: O nitrogênio (N) é o elemento que causa maiores efeitos nas características relacionadas ao crescimento e desenvolvimento das plantas, as quais afetam a produtividade da cultura, exigindo conseqüentemente elevadas doses de fertilizantes nitrogenados. Entretanto, esses problemas podem ser amenizados com técnicas de manejos adequados com a cultura e o uso de inoculantes, que podem substituir o uso de fertilizante nitrogenado de forma parcial ou total no cultivo de diversas culturas. Na cultura do milho existem diversos estudos de associações simbióticas que mesmo não formando nódulos, auxiliam na assimilação do N atmosférico por processos de colonização da superfície e/ou interior das raízes. Com os experimentos de inoculação, dentre outros parâmetros, espera-se alcançar aumentos na produção de grãos, de forma a contribuir para uma agricultura mais econômica e sustentável. Nesse estudo foram identificadas 15 bactérias da Coleção de Microrganismos de Interesse Agrícola da Embrapa Semiárido (CMISA) com base na análise de sequenciamento parcial do gene 16S rDNA com uma estirpe tipo, para instalação de quatro experimentos de campo. O primeiro ensaio teve o intuito de selecionar as bactérias que apresentaram maior produtividade comparado a absoluta, a recomendada e nitrogenadas com 50 e 100% de N-mineral. Com a seleção foi realizado teste *in vitro* para testar as combinações mais promissoras para uma mistura. A partir daí foram instalados os demais ensaios em três diferentes condições edafo-climáticas utilizando três bactérias isoladas e a mistura, sendo identificada ao final uma bactéria com resultado promissor quanto a sua produtividade para formulação de um novo inoculante. Neste contexto objetivou-se avaliar a eficiência de bactérias diazotróficas isoladas de plantas de milho cultivadas em condições de campo no semiárido brasileiro, visando aumentar sua produtividade em diferentes localidades.

Palavras chave: Bactéria associativas; Fertilizante; Fixação de nitrogênio, Inoculante

EFFICIENCY OF DIAZOTROPHIC BACTERIA FOR CORN CULTURE IN DIFFERENT EDAFO-CLIMATIC CONDITIONS

Abstract: Nitrogen (N) is the element that exalts strength in properties related to the growth and development of plants, such as nutrients and crop, requiring high doses of nitrogen fertilizers. However, these problems can be alleviated by nitrogen fertilization techniques and the use of inoculants, which can replace the use of nitrogen fertilizers partially or totally by culture. In the snowy crop, they aid in the assimilation of the atmospheric by processes of colonization of the surface and / or interior of the roots. With the inoculation experiments, for other parameters, the expected ones can be a factor in the production of grains, in order to contribute to an economic and sustainable growth. This set was ligated with the following sequencing analysis methodologies of the 16S rDNA gene with a strain type, for the installation of four field experiments. The first experiment had the objective of selecting the bacteria that showed the highest productivity improve compared the absolute, the controlled and nitrogen with 50% and 100% of N-mineral. With the result it was tested in vitro to the most promising combinations for a blend. The following were applied to the many trials in three different cities the three age associated with the bacterium, being identified as the final bacterium or as it is a solution for a new inoculant. This context objectivated the efficiency of the bacterial diazotrophs isolated from plants of corn cultivated in conditions of plant in the Brazilian semiarid, posing their multiplicity in differentities localities.

Keywords: Associative bacteria; Fertilizer; Nitrogen fixation, Inoculant

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 A cultura do milho	3
2.2 Importância do nitrogênio e da fixação biológica	6
2.3 Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV)	8
REFERÊNCIAS	16
CAPÍTULO 2	23
DESEMPENHO AGRONÔMICO COM O USO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NO CULTIVO DO MILHO (<i>Zea mays</i>) NA REGIÃO NORDESTE	23
3.1 INTRODUÇÃO	26
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.2.1 Identificação taxonômica	27
3.2.2 Locais de experimentos	28
3.2.3 Experimento de campo para seleção das estirpes	30
3.2.4 Compatibilidade das estirpes	32
3.2.5 Experimento de campo em diferentes condições edafo-climáticas	32
4. RESULTADOS	33
4.1 Classificação dos isolados com base na análise de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA	33
4.2 Avaliação de seleção na promoção de crescimento e desempenho agronômico	34
4.3 Resultado do teste de compatibilidade <i>in vitro</i>	36
4.4 Avaliação da promoção de crescimento em diferentes condições edafo- climáticas	39
4.5 Avaliação do desempenho agronômico em diferentes condições edafo-climáticas	41
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) possui uma grande importância na economia e alimentação mundial, o Brasil é o terceiro maior produtor, depois da China e EUA. No Brasil é o segundo cereal mais cultivado, depois da soja. Esta cultura representa grande potencial econômico também para pequenos e médios agricultores, sendo bastante utilizado na alimentação animal e humana.

Atualmente a média nacional de produtividade é 5.409 kg ha⁻¹, sendo considerada baixa (CONAB, 2017). O baixo desempenho da cultura pode ser atribuído, dentre outros fatores, à baixa disponibilidade de nutrientes no solo, principalmente nitrogênio (N) o que mais comumente limita a produção vegetal. Contudo, para que o milho alcance produtividade satisfatória, são necessárias grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados. O suprimento inadequado de N além de causar a limitação da produtividade do milho, pode ocasionar contaminação ambiental e elevar os custos de produção (OKUMURA; MARIANO; ZACCHEO, 2011).

Porém, um seletivo grupo de bactérias pode possibilitar a substituição do fertilizante nitrogenado de forma parcial, por meio da inoculação nas gramíneas. A eficiência da inoculação, no entanto vai depender das interações solo-planta-bactéria, que podem ocorrer com microrganismos benéficos como micorrizas e outras bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), além das fixadoras de N. As plantas podem ser colonizadas ao mesmo tempo por diversas espécies de forma combinada o que possibilita aumentar seu efeito positivo.

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é realizada por um seletivo grupo de procaríotos que possuem a enzima nitrogenase, capaz de reduzir o N₂ atmosférico para a forma combinada inorgânica de amônia (NH₃), assimilável pelas plantas e outros organismos. Bactérias diazotróficas pertencentes a diversos gêneros, tais como, *Azoarcus*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* e *Herbaspirillum* (MONTEIRO et al., 2012; SOUZA et al., 2012) já foram identificadas capazes de se associar as gramíneas.

No Brasil, atualmente oito bactérias estão autorizadas para a inoculação de quatro espécies de gramíneas (milho, trigo, arroz e *Brachiaria*) pertencentes à espécie *Azospirillum brasilense* (BRASIL, 2011), além dessas há uma estirpe de *Herbaspirillum seropedicae* em fase recomendação pelo Ministério da Agricultura,

Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a cultura do milho. Apesar de autorizadas, para todo o Brasil, os experimentos que subsidiaram a recomendação das estirpes foram realizados fora da Região Nordeste.

Tendo em vista que a interação entre planta e bactéria pode ser influenciada dentre outros fatores pelas características genótipos da planta, a estirpe bacteriana e condições edafo-climáticas (HUNGRIA, 2011), são necessárias avaliações de campo em regiões semiáridas produtoras de milho, que subsidiem a recomendação de novos inoculantes, uma vez que a eficiência da FBN pode ser limitada pela competição entre as bactérias inoculadas e a população nativa, comprometendo a fixação de N. Nesse aspecto, a produção de um inoculante contendo mais de uma estirpe torna-se mais uma opção para minimizar a falta de interação positiva, sendo necessários testes que indiquem bactérias com maior potencial de promoção de crescimento competindo com as existentes no solo.

Nesse contexto, objetivou-se neste estudo avaliar a eficiência de novas bactérias autóctones do Semiárido, isoladas de plantas de milho cultivadas em condições de campo visando aumentar sua produtividade em diferentes localidades da Região Nordeste do Brasil.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma monocotiledônea pertencente à família Poaceae. Teve sua origem na América Central, sendo levado para Europa na época das grandes navegações no século XVI e destacou-se com grande capacidade de adaptação a diversos climas, permitindo que seu cultivo fosse realizado em todas as partes do mundo (GARCIA; MATTOSO; DUARTE, 2006).

O milho está entre as plantas de maior abrangência comercial no mundo, devido sua diversidade de utilização. O grão do milho tem composição média de 60% de carboidratos, 10% de proteínas, 4% de lipídios, sendo o restante de minerais e vitaminas (FORNASIERI-FILHO, 2007). Por ser um grão multifuncional, apresenta variadas maneiras de utilização, desde alimentação humana, como amido, farinhas, óleo e também alimentação animal, como forragem conservada para o período de seca, fazendo parte das cadeias produtivas de bovinos, aves e suínos. É usado também como matéria-prima para mais de 500 produtos nas indústrias de alta tecnologia, de cosméticos, bebidas e biocombustíveis (PONCIANO; SOUZA; REZENDE, 2003).

A safra total de milho em 2016/17 apresentou uma produção superior a 93 milhões de toneladas, com a produtividade de aproximadamente 5,4 toneladas ha⁻¹ e uma área com mais de 17 milhões de hectares no Brasil (CONAB, 2017). No entanto, a importância do milho não está relacionada apenas a produção anual, mas a todo o envolvimento que essa cultura tem na produção agropecuária brasileira, tanto no que diz respeito a fatores econômicos, quanto aos fatores sociais. Nesse sentido, o constante aumento nos preços dos alimentos bem como a fragilidade dos nossos sistemas de produção alimentar tem impulsionado a busca por soluções científicas e tecnológicas para a segurança alimentar global (GODFRAY et al., 2010), principalmente em cultura de alta demanda mundial, a exemplo do milho.

As mais variadas situações de clima e solo têm influência direta na produtividade do milho, garantidas também pelo melhoramento genético da cultura, pela melhoria dos atributos químicos, físicos e biológicos dos solos cultivados, além de adoção de práticas de manejo e utilização de elevadas doses de fertilizantes (OKUMURA; MARIANO; ZACCHEO, 2011).

As regiões Sul, Sudoeste e Centro-Oeste do Brasil correspondem juntas por 89% do milho produzido (CONAB, 2017). E atualmente possuem um sistema bem implantado, com técnicas de manejo como a rotação de culturas e sistema de plantio direto, que é responsável pela deposição e acúmulo de resíduos culturais na superfície do solo, o que tem facilitado e aumentado a mineralização microbológica, diminuindo conseqüentemente as perdas de matéria orgânica ao longo do tempo (AMADO; MIELNICZUK; AITA, 2002; BAYER et al., 2004; OKUMURA; MARIANO; ZACCHEO, 2011).

O Nordeste possui uma grande diversidade edafo-climática e nele está inserida a maior parte do semiárido brasileiro, que coincidentemente ou não, também se encontra o único bioma exclusivamente brasileiro, a Caatinga. O semiárido ocupa cerca de um oitavo do território nacional correspondendo a 1,03 milhão de km² (12% da área do País), abrange 1.262 municípios brasileiros, considerando a delimitação atual e congrega uma expressiva parcela da população 25 milhões de pessoas, 12% da população brasileira (BRASIL, 2017)

Entretanto, as médias de produtividade da cultura do milho na região são muito menores do que as médias nacionais, devido às condições climáticas desfavoráveis, principalmente no perímetro semiárido, consequência do baixo emprego de tecnologia. A safra de 2016/17 da Região Nordeste representou a área de 14,76% de todo o milho plantado no Brasil, ou seja, 2,56 milhões de ha⁻¹. A produção foi de 6,66 milhões toneladas representando apenas 7,09% do total colhido no Brasil de toda a produção esperada para a safra e produtividade de 2.595 kg ha⁻¹ a mais baixa de todas as regiões brasileiras (CONAB, 2017).

Dentre os fatores que afeta significativamente a produtividade está relacionado a seca em particular, associada às altas temperaturas e a deficiência de nutrientes, que tem aumentado periodicamente nestas áreas, chegando até a uma perda total de produção (CRUZ et al., 2011).

Com os solos variando de baixa a alta fertilidade e de rasos a profundos, clima quente, semiárido e precipitação de até 800 mm anuais, essa área caracteriza-se, principalmente, por apresentar uma concentração de chuvas nos primeiros quatro meses do ano, sendo assim distribuída heterogeneamente no tempo e também no espaço (HASTENRATH, 2012; NYS E ENGLE, 2015). Isso provoca um déficit hídrico desafiador para quem vive da agropecuária na região, pois as oscilações climáticas

não permitem o estabelecimento de sistemas de produção estáveis, e essa escassez causa consequência direta nos preços finais dos produtos agroindustriais produzidos, trazendo mais prejuízos aos agricultores.

Nesse cenário foi desenvolvida pela Embrapa a variedade de milho Gorutuba com um ciclo superprecoce adaptada ao curto período de chuvas do semiárido nordestino. É semelhante à variedade BRS Caatingueiro, porém ela se destaca quanto a sua produtividade. Neste sentido, a mesma é indicada para a agricultura de subsistência, onde o risco climático é alto, sendo uma boa opção de cultivo para programas sociais de multiplicação de sementes. A variedade caracteriza-se também por ser considerada uma planta baixa de 1,80 a 2,0 metros de altura, comprimento de espiga médio de 10 cm e peso médio de 1000 grãos de 252 g, grãos de coloração amarelo-alaranjada e alto grau de empalhamento, que é importante para reduzir o ataque de pragas e fungos no armazenamento das espigas (CARVALHO; GAMA; CLESO, 2010).

A agricultura irrigada, também tem sido uma aliada para vários agricultores e tem se expandido nos últimos anos diminuindo os riscos para quem pratica a exploração da cultura sob área de sequeiro. Atualmente o Nordeste possui uma área de 1.171.159 hectares irrigados. O médio desempenho econômico da lavoura em condições de cultivo irrigado, ainda constitui fator importante que contribui para que o milho continue sendo uma cultura explorada pelos pequenos e médios produtores da região, segundo a Agência Nacional de Águas (ANA, 2017).

O Nordeste possui, portanto, um cenário promissor para o desenvolvimento da cultura do milho, dispondo de uma série de vantagens sobre outros centros produtores, a começar pela disponibilidade de terras e de crédito, clima favorável, possibilidade de plantio no sistema de sequeiro e mão de obra voltada principalmente para a agricultura familiar. São produtores que possui normalmente pequenas áreas e busca maximizar o uso da área por hectare e, elevar as possibilidades de ter maior produção por unidade produtiva (PRODETEC, 2011).

Além de possuir uma rica diversidade biológica, as populações microbianas que habitam esses solos são capazes de desenvolver estratégias de sobrevivência diante de condições de estresses bióticos e abióticos, para a manutenção dos sistemas ecológicos neste bioma (SILVA et al., 2010). Nesse aspecto essa região

pode se beneficiar com o uso de técnicas mais econômicas e adequadas de plantio de acordo com suas peculiaridades.

2.2 Importância do nitrogênio e da fixação biológica

O N pode ingressar no sistema solo-planta por deposições atmosféricas, fixação biológica – simbiótica ou não, adubações químicas ou orgânicas. A disponibilidade de nutrientes limita o crescimento das plantas afetando diretamente a estrutura, a produção e a função da maior parte dos ecossistemas. Como na maioria das culturas, os nutrientes mais requeridos pela cultura do milho são o N, P, K, destacando-se o N que é exigido em maior quantidade. Além de ser um constituinte primário dos nucleotídeos, o N faz parte da molécula de clorofila, aminoácidos e de diversas enzimas que estão ligadas ao crescimento e desenvolvimento das plantas. Atua em processos vitais da planta, tais como, fotossíntese e respiração (MARSCHNER, 1995; MALAVOLTA, 2006).

O milho é uma cultura que remove grandes quantidades de N do solo e requer o uso de grandes quantidades de adubos nitrogenados, quando se deseja elevar a produtividade. No entanto, o alto custo, bem como os riscos de poluição ambiental decorrentes de adubação nitrogenada, são os principais distúrbios antropogênicos que contribuem para a lixiviação e volatilização do N, além da emissão de gases do efeito estufa, principalmente óxido nitroso (N_2O) (FORTUNA, 2012).

Dentre os fertilizantes nitrogenados existentes, o nitrato de amônia (NH_4NO_3) e sulfato de amônia [$(NH_4)_2SO_4$], estão entre os mais utilizados, porém a ureia (CH_4N_2O) é o mais comercializado no Brasil e no mundo, por possuir uma maior concentração (45% de N) e, conseqüentemente menor custo (IFA, 2017). Porém, possui elevada suscetibilidade à volatilização de amônia (NH_3). Aproximadamente 50% do N aplicado na forma de ureia sobre o solo pode ser perdido por volatilização de amônia, em quatro dias (TASCA et al., 2011), sendo ainda mais intensificado em países de regiões tropicais, como o Brasil (ROS; AITA; GIACOMINI, 2005). Porém, a quantidade de N volatilizada após a aplicação superficial de ureia ao solo é muito variável e depende de inúmeros fatores, incluindo condições climáticas e atributos relacionados com o solo.

Nesse sentido o manejo de N tem sido uma das práticas mais estudadas no intuito de melhorar sua eficiência e uso, na área de fertilidade do solo, devido ao

potencial de resposta das culturas. A quantidade de N requerida pela cultura do milho varia de acordo com estágio de desenvolvimento da planta, sendo menor no início do desenvolvimento e tendo o auge durante o florescimento até a formação de grãos (OKUMURA; MARIANO; ZACCHEO, 2011). Dessa forma, há relatos na literatura de que ele esteja relacionado também no aumento da altura, massa seca da parte aérea, peso de 1000 de grãos (QUADROS et al., 2014), comprimento da espiga e crescimento radicular, aumentando a absorção de nutrientes, incluindo N (SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013).

Nesse aspecto, sistemas de produção agrícolas buscam formas de minimizar a aplicação de fertilizantes nitrogenados para evitar a poluição do ambiente por nitratos, sem perder o rendimento das culturas. Diante da necessidade de políticas públicas voltadas para a baixa emissão do dióxido de carbono, pela primeira vez na história se tem a FBN como ferramenta de compromisso governamental e o manejo da adubação nitrogenada está inserido dentro do plano de metas do Programa ABC (Agricultura de Baixa Emissão de Carbono) vinculado à Política Nacional sobre Mudanças Climáticas de acordo com o artigo 3º do Decreto nº 7.390/2010. Este programa integra um compromisso brasileiro do governo federal inscrito na Lei Nacional sobre mudança do clima, que visa à redução da emissão de gases do efeito estufa, reduzindo a emissão de 10 milhões de toneladas de CO₂ equivalente até 2020 e, conseqüentemente de N₂O incrementando a FBN na produção de 5,5 milhões de hectares através do incentivo e uso de técnicas economicamente viáveis e sustentáveis. O emprego do sistema de plantio direto na palha também está incluído no plano e traz grandes contribuições para eficiência da FBN, uma vez que o mínimo revolvimento do solo e a manutenção de resíduos vegetais na superfície diminuem a oscilação de temperatura e umidade do solo, o que favorece a sobrevivência das bactérias diazotróficas (NOGUEIRA E HUNGRIA, 2013).

Para o sucesso da FBN a cultura de inoculação precisa ser estimulada, o que gerará demanda para que as indústrias passem a produzir inoculantes destinados a outras culturas. Assim, pesquisas com bactérias diazotróficas para incremento de produtividade e redução da adubação química estão sendo incentivadas, não só na cultura do milho, mas em diversas outras culturas como arroz, trigo, sorgo e cana-de-açúcar. Além, da ampliação no uso de bactérias fixadoras em forrageiras

(HUNGRIA et al., 2016), abrindo a possibilidade do uso da FBN não só em agricultura, mas também na pecuária.

2.3 Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV)

As bactérias que colonizam a rizosfera, podem exercer diversos efeitos benéficos às plantas. Os benefícios promovidos podem ocorrer pela fixação de N, solubilização de fosfato; produção de sideróforos (quelantes de ferro); produção de hormônios reguladores do crescimento vegetal (giberelina, auxina, etileno e citocina); e indiretamente através do antagonismo a organismos fitopatogênicos como fungos, vírus e indução da resistência sistêmica contra doenças (SOUZA et al., 2012; ARRUDA et al., 2013; LIU et al., 2013).

Dentro dos gêneros de BPCV estudados por apresentarem potencial na agricultura estão *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Herbaspirillum*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter*, *Staphylococcus*, *Burkholderia* e *Flavobacterium* (REIS et al., 2009; HUNGRIA et al., 2010).

A planta seleciona os microrganismos específicos para ocupar a rizosfera, e esse processo de colonização envolve a produção de diversos componentes e sinalizadores bioquímicos, que estimulam ou inibem especificamente alguns membros da comunidade microbiana, por exemplo, flavonoides, antibióticos (DOORNBOS et al., 2012) e genes específicos, por exemplo o *nifH*.

A capacidade das bactérias de produzir e secretar hormônios vegetais estimula o crescimento da planta, atuando na defesa do hospedeiro contra microrganismos patogênicos, podendo influenciar diretamente o aumento da produção de grãos (SCHMIDT et al., 2011; BHATTACHARYYA E JHA, 2012).

No estudo desenvolvido a partir de *Tripogon spicatus* foram isoladas no semiárido brasileiro bactérias dos gêneros *Enterobacter*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Rhizobium* e *Stenotrophomonas* e identificados como capazes de promover o crescimento do arroz em vaso, aumentando a biomassa da planta em taxas mais elevadas do que as observadas para a estirpe *A. brasiliense* recomendada para a cultura (FERNANDES-JÚNIOR et al., 2015). Esses isolados apresentaram uma capacidade de crescimento com a mesma taxa observada para as plantas que receberam N, indicando que estas bactérias contam com diferentes mecanismos para estimular o desenvolvimento de plantas.

O aumento no rendimento das plantas inoculadas com BPCV inclusive quando cultivadas em campo já foi relatado por diversos autores (PEDRAZA et al., 2009; BHATTACHARYYA E JHA, 2012; ESTRADA et al., 2012). Essas bactérias além de reduzir estresses bióticos sem prejudicar a planta, podem promover a divisão celular e a extensão das raízes (OLIVEIRA et al., 2009) inclusive das raízes laterais e, em alguns casos, aumentar a biomassa de raiz e folha (REIS et al., 2000; PEDRAZA et al., 2009). Contra os estresses abióticos são capazes de metabolizar diferentes fontes de carbono e apresentar tolerância a outros antibióticos que podem ser produzidos por outros microrganismos do solo (FERNANDES JÚNIOR et al., 2012).

A produção de fitormônios é um mecanismo de interação bactéria-planta, influenciado por vários fatores, como o genótipo da planta e do próprio microrganismo. A influência desses micro-organismos está relacionada com os estágios iniciais do desenvolvimento vegetal, estimulando o crescimento do sistema foliar e radicular, influenciando no aumento do número de pelos radiculares (SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013).

A partir da década de 70, as bactérias do gênero *Azospirillum* ganharam grande destaque mundial com os estudos de Döbereiner & Day (1976) e Döbereiner et al. (1976), através da descoberta da capacidade de FBN associadas as gramíneas. Em 1996, os estudos com o gênero *A. brasilense* foram iniciadas e selecionadas as estirpes que apresentavam maior promoção de crescimento das plantas, melhor adaptação às tecnologias nas culturas e maior sobrevivência no solo. Com os resultados foram autorizadas para a cultura do milho e do trigo as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 seguindo os critérios estabelecidos pelo MAPA em 2010 (HUNGRIA, 2011) e para a *Brachiaria* em 2016 (HUNGRIA et al., 2016). Atualmente, existe um grande número de informação acerca dos mecanismos que estimulam o crescimento vegetal com o gênero *Azospirillum*.

O gênero *Herbaspirillum* foi descrito por Baldani et al. (1986) para acomodar a espécie *Herbaspirillum seropedicae* que, posteriormente, teve outras espécies incluídas como a bactéria *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BALDANI et al., 1996). A *H. seropedicae* é uma bactéria diazotrófica endofítica, fixadora de N e promotora de crescimento vegetal.

Nesse aspecto, algumas plantas se beneficiam da associação com as bactérias diazotróficas e/ou promotoras de crescimento, neste último caso, contribuindo para

um aumento na superfície da raiz e de crescimento, melhorando a absorção de nutrientes e água, aumentando a eficiência da adubação nitrogenada e produtividade, atuando como biocontrole de patógenos e organismos deletérios (BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004; HUNGRIA et al., 2010; TRIPTI; USMANI; KUMAR, 2017).

A FBN corresponde a uma entrada direta de N no sistema solo-planta-atmosfera. Este processo consiste na conversão de N₂ atmosférico em amônia (NH₃), forma na qual pode ser utilizada pelas plantas. Os microrganismos responsáveis pela fixação de N são chamados diazotróficos, os quais possuem a nitrogenase, complexo enzimático que é formada por duas proteínas sensíveis ao oxigênio. A dinitrogenase que é uma proteína ferro-molibdênio e a dinitrogenase redutase que é uma proteína ferro-enxofre, que transfere os elétrons para a dinitrogenase. Estas proteínas, juntamente com ATP, Mg⁺² e uma fonte de elétrons são essenciais para a atividade de fixação de nitrogênio (TAIZ e ZEIGER, 2013).

As bactérias diazotróficas podem ser classificadas em três grupos quanto à interação com as plantas: I) bactérias simbióticas, que estabelecem uma interação muito estreita entre o macro e o microsimbionte e, em alguns casos, são formadas estruturas diferenciadas denominadas nódulos; II) bactérias assimbióticas de vida livre, que não se associam a outras espécies e; III) bactérias assimbióticas associativas, que contribuem para o crescimento de plantas sem a formação de estruturas diferenciadas, não estabelecendo uma simbiose (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Dentre as bactérias associativas Baldani et al. (1997) também as dividiu em três grupos: I) endofíticos obrigatórios, que colonizam o interior das raízes e a parte aérea das plantas como *Herbaspirillum* spp.; II) endofíticos facultativos, que são capazes de colonizar raízes interna e externamente de plantas não leguminosas como *Burkholderia* spp. e; III) microrganismos rizosféricos, que são aquelas espécies que colonizam as raízes superficialmente como *Azospirillum* spp. Embora a quantidade de N fixado com as associativas não seja tão grande quanto aquela fixada pelos nódulos na simbiose rizóbio com leguminosas, em plantas actinorrízicas ou em associações de cianobactérias os resultados têm sido significativos.

Nesse ambiente as bactérias diazotróficas são responsáveis por regular o suprimento de oxigênio para prover ATP e ao mesmo tempo proteger a nitrogenase

contra seu efeito deletério. Essas bactérias vão desenvolver várias estratégias para limitar o acesso do oxigênio, como crescimento de microaerofílico, heterocistos, vesículas, barreira de difusão ao oxigênio e até mesmo mudanças morfológicas como os nódulos nas leguminosas, que protege e agrupa as bactérias (YATES et al., 1997). Enquanto as associativas uma vez distribuídas no vegetal, ficam mais suscetíveis às trocas com o meio externo (REIS, 2007).

Outro fator que ocorre com os diazotróficos que habitam a rizosfera é que necessitam competir com a microflora do solo por fontes de carbono. Já os diazotróficos endofíticos que são encontrados no interior dos tecidos das plantas, nos espaços intercelulares, encontram um ambiente mais uniforme, seguro e favorecido pela ausência de oxigênio. Esta estratégia microbiana pode explicar a alta contribuição da FBN em cana-de-açúcar e arroz associada a *H. seropedicae* (BALDANI et al., 1996; GAMALERO et al., 2004).

As bactérias associativas movimentam-se no exsudato da raiz e são liberados na rizosfera permitindo a colonização e multiplicação, na rizosfera e no rizoplane (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010). O processo de colonização no milho com *H. seropedicae* foi descrito por Monteiro et al., (2012) no qual a bactéria inicialmente coloniza a superfície da raiz, nos pontos de emergência das raízes secundárias. Após a penetração superficial através do exsudato a bactéria penetra nos tecidos da planta e espalha-se rapidamente pelos tecidos internos ocupando espaços intercelulares das células da raiz movendo-se pela raiz e parte aérea através do xilema.

Populações de bactérias endolíticas como *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* (OLIVARES et al., 1997) espécies do gênero *Azospirillum* e novas espécies do gênero *Burkholderia* (REIS-JÚNIOR et al., 2004; SCHULTZ et al., 2014) já foram encontradas colonizando plantas de cana-de-açúcar. Bactérias deste gênero também já foram isoladas das raízes de milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e espécies tropicais como a bananeira (*Musa* spp.) e abacaxizeiro (*Ananas comosus*) (BALDANI et al., 1986; PIMENTEL et al., 1991; CRUZ et al., 2001).

Diversos estudos já mostraram a ocorrência de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* endofíticos em diversas culturas como: milho (*Zea mays*) (JOHNSTON-MONJE et al., 2016); cana de açúcar (*Saccharum* spp.) (BURBANO et al., 2011); capim-

elefante (*Penisetum purpureum*) (VIDEIRA et al., 2013); *Eucalyptus spp.* (MIGUEL et al., 2016).

Pela primeira vez Ding et al. (2005) demonstraram que a FBN ocorria em *Bacillus marisflavi* e *Paenibacillus massiliensis*. Esses autores também encontraram fragmentos do gene *nifH* em *Bacillus megaterium* e *Bacillus cereus*. Dessa forma, ficou evidenciado a presença do gene *nifH* no genoma de ambos os gêneros *Bacillus*.

Entretanto, vários fatores afetam a dinâmica da rizosfera e a composição da comunidade microbiana. A colonização vai depender, dentre os fatores, do genótipo da planta e o tipo de solo, no qual as bactérias aumentam suas respectivas populações e passam a interagir de maneira mais intensa com a espécie vegetal em desenvolvimento de forma heterogênea. Desse modo, esses indivíduos colonizam a rizosfera ou mesmo a superfície e o interior das raízes, caules e folhas em diferentes concentrações (JURANDY; NOGUEIRA; ANDREOTE, 2016).

Estudos avaliando características agronômicas e o rendimento de grãos de três híbridos de milho inoculados ou não, com uma mistura de três espécies de *Azospirillum* (*A. brasilense*, *A. lipoferum* e *A. oryzae*) relataram que a inoculação foi capaz de influenciar diretamente as respostas quanto algumas variáveis avaliadas como o peso de 1000 grãos; a altura; rendimento da parte aérea e teor relativo de clorofila para cada variedade (QUADROS et al., 2014). Os autores verificaram o efeito da interação entre os híbridos e tratamentos sobre a produtividade, indicando que, dependendo do genótipo do milho, o benefício da inoculação pode ser observado em diferentes partes da planta, como grãos, parte aérea ou colmo.

Dois isolados de *Burkholderia kururiensis* e *Azospirillum brasilense* ao serem inoculados em duas cultivares de arroz, proporcionaram aumento significativo do número de raízes laterais somente com a inoculação da *A. brasilense*. Tal estudo demonstrou efeito benéfico da inoculação estimulando o crescimento radicular (SOUZA et al., 2012). De fato, é relatado que o gênero *Azospirillum* possui espécies capazes de estimular o crescimento vegetal por meio de produção de hormônios (AMBROSINI et al., 2015).

O efeito da inoculação quando avaliado em 5 diferentes tipos de solo com *Bradyrhizobium* e adubação nitrogenada na cultura do feijão-caupi demonstrou que os componentes vegetativos e produção da planta, varia com o tipo de solo cultivado.

De modo geral entre os solos utilizados o Neossolo Flúvico Eutrófico Vertissólico apresentou os maiores resultados, enquanto o Latossolo Vermelho distrófico apresentou baixas médias entre as variáveis analisadas. Essa influência ocorre possivelmente pelos atributos do solo, em decorrência de maior teor de matéria orgânica (M.O) e o tipo argila, esses fatores justificaram os resultados positivo mesmo sem inoculação (SANTOS et al., 2014).

Em ensaio avaliando o efeito da inoculação com uma estirpe de *Burkholderia* em dois diferentes locais, com solos classificados de Planossolo Háptico distrófico em (Seropédica – RJ) e outro em Latossolo Vermelho distrófico (Planaltina – DF) com dois genótipos de milho. No RJ a inoculação sozinha apresentou maiores resultados do que os tratamentos acrescentados com N40 e N80 em ambos os genótipos. No DF a inoculação não indeferiu entre os nitrogenados, não apresentando diferença entre os tratamentos e os genótipos. Porém alcançou maior média de grãos, comparado ao encontrado no RJ em todos os tratamentos (ALVES, et al., 2016).

Em estudo conduzido em casa de vegetação por Ferreira et al. (2013), por exemplo, para alcançar a promoção do crescimento de milho inoculado por *A. brasilense* em solos argiloso e arenoso, foi necessária maior dose (10^{11} células ml^{-1}) de inóculo nos solos argilosos. Contudo, quando o milho foi cultivado em solo arenoso, não houve diferença entre as aplicações de diluição ou concentração do inóculo, mas em ambos os solos a produção de grãos aumentou em 29% no tratamento de *A. brasilense* e N, em relação à adubação nitrogenada isolada. Em ambos os testes, a resposta da produtividade foi significativamente afetada e condicionada ao tipo de solo em teste.

Deste modo, pode-se dizer que as bactérias associativas podem empregar uma variedade de mecanismos distintos, isolados ou em combinação, para colonizar com sucesso o sistema radicular da planta. Esses resultados demonstram a necessidade de estudos contínuos que visem obter uma variedade de inoculantes eficientes que possam ser aplicados de acordo com as diferenças da cultura (variedades) e local de cultivo (solo, clima, pluviosidade, temperatura).

A assiduidade nos estudos demonstra a importância das pesquisas em revelar novas estirpes mais eficientes que possa suplantar o potencial fixador, a exemplo da

estirpe recomenda BR 2001 para feijão-caupi que foi suplantada por três estirpes mais eficientes que estão disponíveis hoje para a cultura por Moreira (2005).

Estudos desenvolvidos na Embrapa Semiárido por Cavalcanti (2016) encontrou bactérias com potencial promoção de crescimento no milho adotando três diferentes metodologias para isolamento das bactérias. As bactérias foram obtidas em meio sólido em placa, meio semissólido e/ou utilizando o feijão-caupi como planta-isca para a inoculação dos extratos de raízes do milho. A autora obteve 405 isolados de duas cultivares (BRS Caatingueiro e BRS Gorutuba), em duas áreas distintas (Juazeiro - BA e Petrolina – PE), com material coletado de várias partes da planta e rizosfera. Realizou a identificação fenotípica; avaliou a presença de fragmentos do gene *nifH*, incluindo *nodC* nas leguminosas; a similaridade entre os isolados e a variabilidade genética das bactérias por meio da técnica de Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) 16S rRNA. As avaliações *in vitro* relatou ter encontrado um total de 92% de isolados capazes de produzir ácido indol acético (AIA); 30% solubilizaram fosfato de cálcio em meio sólido e 19% foram produtores de sideróforos. Quando testado em vasos com condições de campo essas bactérias obteve maior crescimento na massa da parte aérea seca, massa de raiz seca e N total, comparando-as à estirpe recomendada e nitrogenada com a metade da dose recomendada para a cultura. Quinze isolados foram considerados com potencial, sendo necessários a identificação molecular e testes em campo.

A estirpe de bactéria isolada da própria planta hospedeira apresenta dezenas de vantagens (SOUZA et al., 2012). Entretanto, para avaliar o sucesso da inoculação e a competitividade com outras estirpes autóctones ou mesmo outros componentes da microbiota do solo devem ser considerados, pois podem ser decisivos para a seleção de estirpes para novos inoculantes.

O Brasil produz anualmente mais de 50 milhões de doses de inoculantes, um recorde mundial. Dentre as culturas que utilizam inoculantes destaca-se a soja, sendo o segundo produtor mundial com mais de 30 milhões de hectares plantados com essa cultura, que utiliza unicamente o N fixado para o aporte deste nutriente (ANPII, 2017). Na soja, o uso de inoculante é capaz de suprir as necessidades de N da cultura com taxas de fixação de N superior a 300 kg de N ha⁻¹ (HUNGRIA et al., 2007). A substituição de fertilizantes químicos pela inoculação com bactérias do

gênero *Bradyrhizobium* na cultura da soja representa uma economia de aproximadamente US\$ 12 bilhões de dólares (ANPII, 2016).

A cana-de-açúcar também tem sido alvo de vários estudos devido à extensão da área cultivada e do alto gasto com fertilizantes nitrogenados. Os estudos têm demonstrado que bactérias diazotróficas associadas naturalmente a cana-de-açúcar conseguem contribuir com até 60% das necessidades de N da cultura (SCHULTZ et al., 2014; URQUIAGA et al., 2012).

Ao avaliarem o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas e da adubação nitrogenada na produção de grãos e no acúmulo de N em plantas de arroz, concluíram que a inoculação com *H. seropedicae* e *Burkholderia* sp. é capaz de contribuir com incrementos na matéria seca e acúmulo de N (GUIMARÃES et al., 2010). Ainda, segundo os autores, a produção de grãos apresentou um melhor resultado quando utilizando a dose de 50 kg de N ha⁻¹ sintético em associação com as bactérias diazotróficas estudadas que culminou na produção de grãos com acúmulo 35% de N a mais em relação ao controle.

Dentre os fatores importantes na obtenção de um inoculante, a possibilidade de variação entre genótipos é uma delas, uma vez que cada inóculo pode ser mais eficiente em determinadas cultivares, em relação a outros. Alves et al., (2016) avaliando estirpes do gênero *Burkholderia* e duas variedades de milho observaram que inoculação não aumentou o rendimento de grãos ou o teor de N. No entanto, o híbrido SHS505 demonstrou incremento de grãos em condição sem N. O incremento de produção de grãos em ambas as variedades aumentou de 300 a 742 Kg ha⁻¹ condicionado à inoculação com a metade de N, chegando a acumular mais de 10 Kg de N nos grãos. Nesse estudo foi possível observar a interação específica entre a estirpe e o genótipo da planta.

Resposta diferente foi encontrada por Arruda et al., (2013), que ao avaliarem o inóculo em condição de estufa de duas cultivares de milho obtiveram resposta positiva em ambos. O resultado demonstrou que as estirpes bacterianas não foram específicas e podem estimular o crescimento no milho, independentemente do cultivar.

O efeito da inoculação depende de diversos fatores, entre eles a composição microbiana e a eficiência da estirpe introduzida. Existem estirpes bacterianas diazotróficas selecionadas e autorizadas pelo MAPA para mais de 100 espécies

vegetais (BRASIL, 2011), indicando o grande potencial da extensão da FBN a outras culturas de importância econômica. Que na maioria dos casos resulta em aumento de matéria seca, acúmulo de N e produtividade (BARTCHECHEN et al., 2010). E apesar da dificuldade para comprovação da eficiência desta tecnologia com as associativas por não haver formação de nódulos e pela variedade de resultados em condições de campo, ligada a fatores como condições edafo-climáticas e interações com a biota do solo, os resultados de sua eficiência não podem ser ignorados, pois existe uma variedade de ensaios realizados no mundo, tais como: Israel, França, Bélgica, Argentina, Uruguai, México e África do Sul, nas mais diversas culturas comprovando sua eficácia (REIS, 2007).

REFERÊNCIAS

- ALVES, G. C.; MACEDO, A. V. DE M.; REIS-JÚNIOR, F. B. DOS; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Plant growth promotion by four species of the genus *Burkholderia*. **Plant and Soil**, v.399, p. 373–387, 2016.
- AMADO, T. J. C.; MIELNICZUK, J.; AITA, C. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho nos RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira Ciência Solo**, v. 26, p. 241–248, 2002.
- AMBROSINI, A.; SOUZA, R. DE. Ecological role of bacterial inoculants and their potential impact on soil microbial diversity. **Plant Soil**, v. 400, p. 193-207, 2015.
- ANA - Agência Nacional de Águas. **Atlas irrigação: uso da água na agricultura irrigada** -- Brasília: ANA, 2017.
- ANPII - Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Importadores de Inoculantes. **Como o Brasil se tornou líder mundial no uso de inoculantes**, 2017. Disponível em: <http://www.anpii.org.br/consumo-de-inoculantes-deve-aumentar/>. Acesso: 23/04/2018.
- ANPII - Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Importadores de Inoculantes. **ANPII aborda os rumos da fixação do nitrogênio e da indústria de inoculantes no Brasil durante a XVIII Relare**, 2016. Disponível em: <http://www.anpii.org.br/anpii-aborda-os-rumos-da-fixacao-do-nitrogenio-e-da-industria-de-inoculantes-no-brasil-durante-a-xviii-relare-3/>. Acesso em: 23/04/2018.
- ARRUDA, L.; BENEDUZI, A.; MARTINS, A.; LISBOA, B.; LOPES, C. et al. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, p. 15–22, 2013.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov. a Root-Associated Nitrogen-Fixing

- Bacterium. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D. et al. Emended Description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a Mild Plant Pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and Classification of a Group of Clinical Isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* Species 3. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 802-810, 1996.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5/6, p. 911-922, 1997.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum* -plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 521-577, 2004.
- BAYER, C.; MARTIN-NEO, L.; MIELNICZUK, J.; PAVINATO, A. Armazenamento de carbono em frações lábeis da matéria orgânica de um Latossolo Vermelho sob plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 677-683, 2004.
- BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1327-1350, 2012.
- BRASIL. **Diário oficial**, Ministério da Integração Nacional. Resolução Nº 107, de 27 de julho de 2017 e Resolução Nº 115, de 23 de novembro de 2017.
- BRASIL. **Diário oficial**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 13, de 24 de março de 2011.
- BURBANO, C. S.; LIU, Y.; RÖSNER, K. L.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. et al. Predominant nifH transcript phylotypes related to *Rhizobium rosettiformans* in field-grown sugarcane plants and in Norway spruce. **Environmental Microbiology Reports**, v. 3, p. 383-389, 2011.
- CARVALHO, H. W. L.; GAMA, E. E. G.; CLESO, A. P. P. **Comunicado técnico 104**, p. 4, 2010.
- CAVALCANTI, M. I. P. Seleção de bactérias promotoras de crescimento em milho cultivado no Semiárido obtidas por diferentes estratégias de isolamento. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, p. 96, 2016.
- COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42 p. 669-678, 2010.
- CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos safra 2016/2017 - Nono levantamento**, Brasília, v. 4, p. 1-161, jun. 2017.
- CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M. DE; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. PEDROSA, F. DE O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria

isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2375-2379, 2001.

CRUZ, J. C.; PEREIRA-FILHO, I. A.; PIMENTEL, M. A. G.; COELHO, A. M.; KARAM, D. et al. Produção de Milho na Agricultura Familiar. **Embrapa Milho e Sorgo - Circular Técnica 159**, p. 42, 2011.

DING, Y.; WANG, J.; LIU, Y.; CHEN, S. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizosphere in Beijing region. **Journal Applied Microbiology**, v. 99, 1271-1281, 2005.

DOBEREINER, J.; MARRIEL, I. E.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum-lipoferum* beijerinck. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 22, n. 10, p. 1464-1473, 1976.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: **International Symposium on Nitrogen Fixation**, v. 1, p. 518-38, 1976.

DOORBOS, R.F.; VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. **A review. Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, p. 227–243, 2012.

ESTRADA, G. A.; BALDANI, V. L. D.; OLIVEIRA, D. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant and Soil**, v. 369, p. 115-129, 2012.

FERNANDES-JÚNIOR, P. I.; AIDAR, S. DE T.; MORGANTE, C. V.; GAVA, C. A. T.; ZILLI, J. E. et al. The resurrection plant *Tripogon spicatus* (Poaceae) harbors a diversity of plant growth promoting bacteria in northeastern Brazilian Caatinga. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 39, n. 4, p. 993-1002, 2015.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; LIMA, A. A. DE; PASSOS, S. R.; GAVA, C. A. T.; OLIVEIRA, P. J. DE. et al. Phenotypic diversity and amyolytic activity of fast growing rhizobia from pineonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1604-1612, 2012.

FERREIRA, A. S.; PIRES, R. R.; RABELO, P. G.; OLIVEIRA, R. C; LUZ, J. M. Q; BRITO, C. H. Implications of *Azospirillum brasilense* inoculation and nutrient addition on maize in soils of the Brazilian Cerrado under greenhouse and field conditions. **Applied Soil Ecology**, v. 72, p. 103-108, 2013.

FORNASIERI FILHO, D. **Manual da cultura do milho**. Jaboticabal: Funep, p. 576, 2007.

FORTUNA AM. The soil biota. **Nature Education Knowledge**, v.3, n.10, p.1, 2012.

GAMALERO, E.; LINGUA, G.; GIUSY-CAPRI, F.; FUSCONI, A.; LEMANCEAU, P. Colonization pattern of primary tomato roots by *Pseudomonas fluorescens* A6RI characterized by dilution plating, flow cytometry, fluorescence, confocal and scanning electron microscopy. **Fems Microbiology Ecology**, v. 48, n. 1, p. 79-87, 2004.

GARCIA, J. C.; MATTOSO, M. J.; DUARTE, J. DE O. Importância do milho em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, v. 27, n. 233, p. 7-12, 2006.

GODFRAY, H. C. J.; BEDDINGTON, J. .; CRUTE, I. R.; HADDAD, L.; LAWRENCE,

- D. et al. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. **Science**, v. 327, p. 812-818, 2010.
- GUIMARÃES, S. L.; CAMPOS, D. T. S.; BALDANI, V. L. D.; JACOB-NETO, J. Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada em cultivares de arroz. **Revista Caatinga**, v. 23, n. 4, p. 32–39, 2010.
- HASTENRATH, S. Exploring the climate problems of Brazil's Nordeste: A review. **Climatic Change**, p. 243-251, 2012.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. **Embrapa Soja - Documentos 283**, p. 80, 2007.
- HUNGRIA, M.; CAMPOS, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, p. 413-425, 2010.
- HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. **Embrapa Soja - Documentos 325**, p. 36, 2011.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 221, p. 125-131, 2016.
- IFA - International Fertilizer Association. Disponível em: <https://www.fertilizer.org/>. Acesso: 23/04/2018.
- JOHNSTON-MONJE, D.; LUNDBERG, D. S.; LAZAROVITS, G.; REIS, V. M.; RAIZADA, M. N. Bacterial populations in juvenile maize rhizospheres originate from both seed and soil. **Plant and Soil**, v. 405, p. 337-355, 2016.
- JURANDY, E.; NOGUEIRA, B.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2. ed. ESALQ, Piracicaba, SP: p. 221, 2016.
- LIU, F.; XING, S.; MA, H.; DU, Z.; MA, B. Plant growth-promoting rhizobacteria affect the growth and nutrient uptake of *Fraxinus americana* container seedlings. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 4617-4625, 2013.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Editora Ceres, p. 631, 2006.
- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. San Diego: **Academic Press**, p. 889, 1995.
- MIGUEL, P. S. B.; OLIVEIRA, M. N. V. DE; DELVAUX, J. C.; JESUS, G. L. DE; BORGES, A. C. et al. Diversity and distribution of the endophytic bacterial community at different stages of *Eucalyptus* growth. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 109, p. 755–771, 2016.
- MONTEIRO, R. A.; BALSANELLI, E.; WASSEM, R.; MARIN, A. M.; LIZIANE, C. C. et al. *Herbaspirillum* plant interactions: Microscopical, histological and molecular aspects. **Plant Soil**, v. 356, p. 175-196, 2012.
- MOREIRA, F. M. S. "Estirpes de bactérias altamente eficientes que fornecem nitrogênio para o caupi foram selecionadas na UFLA e já são recomendadas para a

- produção de inoculantes comerciais." **Boletim de Extensão da UFLA**, disponível on line: [www.ufla.br/editora/publicações/boletim de extensão](http://www.ufla.br/editora/publicações/boletim%20de%20extens%C3%A3o), 2005.
- MOREIRA, F. M.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora da Universidade Federal de Lavras, p. 726, 2006.
- NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Oportunidades e ameaças à contribuição da fixação biológica de nitrogênio em leguminosas no Brasil. **Artigo em anais de congresso**. In: Microorganisms for future agriculture, p. 433-436, 2013. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/971180>. Acesso em: 07/06/18.
- NYS, E.; ENGLE, N. Convivência com o seminário e gestão proativa da seca no Nordeste do Brasil: uma nova perspectiva. **Equipe Banco Mundial**, p. 8, 2015.
- OKUMURA, R. S.; MARIANO, D. C.; ZACCHEO, P. V. C. Uso de fertilizante nitrogenado na cultura do milho: uma revisão. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 4, n. 2, p. 226-244, 2011.
- OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, v. 135, p. 723–737, 1997.
- OLIVEIRA, F. A.; CAVALCANTE, L. F.; SILVA, I. DE F. DA; PEREIRA, W. E.; OLIVEIRA, J. C. DE.; FILHO, J. F. DA C. Crescimento do milho adubado com nitrogênio e fósforo em um Latossolo Amarelo. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 4, p. 8, 2009.
- PEDRAZA, R. O.; BELLONE, C. H.; BELLONE, S. C.; SORTE, P. M. F. B.; TEIXEIRA, K. R. DOS S. *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 36-43, 2009.
- PIMENTEL, J. P.; OLIVARES, F.; PITARD, R. M.; AKIBA, F.; DOBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 137, n. 1, p. 61-65, 1991.
- PONCIANO, N. J.; SOUZA, P. M. DE; REZENDE, A. M. Entraves da comercialização à competitividade do milho brasileiro. **Revista Paranaense de Desenvolvimento**, n. 104, p. 23-39, 2003.
- PRODETEC. **Produção de milho deslancha no nordeste**, 2011. Disponível em: <http://www.agenciaprodetec.com.br/component/content/article/228-producao-de-milho-deslancha-no-nordeste.html>. Acesso em: 07/06/18.
- QUADROS, P. D.; ROESCH, L. F. W.; SILVA, P. R. F.; VIEIRA, V. M.; ROEHRS, D. D.; CAMARGO, F. A. O. Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. **Revista Ceres**, v. 61, n. 2, p. 209-218, 2014.
- REIS, V. M. Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas. **Embrapa Agrobiologia - Documentos 232**, p. 22, 2007.
- REIS-JÚNIOR, F. B.; SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Intra-specific diversity study of nitrogen fixing bacterium *Azospirillum amazonense* isolated from different *Brachiaria species*. **Symbiosis**, v. 36, p. 41-56, 2004.
- REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, 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.; ALVES, G. C.; MARRIEL, I. E.; REIS-JÚNIOR, F. B.; ZILLI, J. E. Recomendação de inoculante para cultura de milho utilizando a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe BR 11417. **Embrapa Agroecologia - Comunicado técnico 119**, p. 2, 2009.
- ROS, C. O.; AITA, C.; GIACOMINI, S. J. Volatilização de amônia com aplicação de uréia na superfície do solo, no sistema plantio direto. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 799–805, 2005.
- SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v. 111(5), p. 105-130, 2013.
- SANTOS, K. C.; UCHOA, S. C.; MELO, V. F.; ALVES, J. M. A.; ROCHA, P. R. R.; XIMENES, C. K. S. Inoculação com *Bradyrhizobium* e adubação nitrogenada em feijão-caupi cultivado em diferentes solos. **Revista Agro@ambiente**, v. 8, n. 3, p. 306-317, 2014.
- SCHMIDT, M. A.; SOUZA, E. M.; BAURA, V.; WASSEM, R.; YATES, M.G. et al. Evidence for the endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* (common bean) roots by the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, p. 182-185, 2011.
- SILVA, P. C. G.; MOURA, M. S. B.; KIILL, L. H. P.; BRITO, L. T. L.; PEREIRA, L. A. et al. Capítulo 1. Caracterização do Semiárido brasileiro: fatores naturais e humanos. In: SA, I. B.; SILVA, P. C. G. da. (Ed.). **Semiárido brasileiro: pesquisa, desenvolvimento e inovação**. Embrapa Semiárido, p. 48, 2010.
- SOUZA, R.; BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; COSTA, P. B.; MEYER, J. et al. The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. **Plant and Soil**, v. 366, p. 585-603, 2012.
- SCHULTZ, N.; SILVA, J. A.; SOUZA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; OLIVEIRA, R. P. et al. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 2, p. 407–414, 2014.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed., Artmed, p. 918, 2013.
- TASCA, F. A.; ERNANI, P. R.; ROGERI, D. A.; GATIBONI, L. C.; CASSOL, P. C. Volatilização de amônia do solo após a aplicação de ureia convencional ou com inibidor de urease. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 2, p. 493-509, 2011.
- TRIPTI, A. K.; USMANI, Z.; KUMAR, A. V. Biochar and flyash inoculated with plant growth promoting rhizobacteria act as potential biofertilizer for luxuriant growth and yield of tomato plant. **Journal of Environmental Management**, p. 20-27, 2017.
- URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; MORAIS, R. F. DE; BATISTA, R. B.; SCHULTZ, N. et al. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 5v21, 2012.
- VIDEIRA S. S.; SILVA, M. C. P.; GALISA, P. S.; DIAS, A. C. F.; NISSINEN, R. et al. Culture-independent molecular approaches reveal a mostly unknown high diversity of

active nitrogen-fixing bacteria associated with *Pennisetum purpureum*—a bioenergy crop. **Plant Soil**, v. 373, p. 737-754, 2013.

YATES, M. G.; SOUZA, E. M. de; KAHINDI, J. H. Oxygen, hydrogen and nitrogen fixation in *Azotobacter*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 863-869, 1997.

CAPÍTULO 2

DESEMPENHO AGRONÔMICO COM O USO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NO CULTIVO DO MILHO (*Zea mays*) NA REGIÃO NORDESTE

Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico "Plant and Soil"

DESEMPENHO AGRONÔMICO COM O USO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NO CULTIVO DO MILHO (*Zea mays*) NA REGIÃO NORDESTE

Resumo: O uso de inoculantes contendo bactérias diazotróficas na cultura do milho é uma forma promissora para diminuir o consumo de fertilizantes nitrogenados. Contudo, o resultado da interação entre diazotrófico-gramínea, em termos de potencialidade agrônômica, seja como promotores de crescimento ou como fixadores de nitrogênio atmosférico, vai depender de capacidades específicas dessa interação. Neste contexto, objetivou-se a seleção de bactérias autóctones do semiárido brasileiro isoladas no milho, para avaliação em diferentes localidades. O primeiro experimento de campo foi implantado em Juazeiro/BA, com sementes do milho (BRS Gorutuba) inoculadas com 15 isolados da Coleção de Microrganismos de Interesse Agrícola da Embrapa Semiárido (CMISA) por meio turfoso. Os isolados foram previamente sequenciadas pelo gene 16S rRNA e identificadas com uma estirpe tipo como bactérias promotoras de crescimento de milho pertencentes a gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Bacillus* e *Paenibacillus*. Além dessas bactérias, foi utilizado o inoculante autorizado para a cultura do milho contendo *Azospirillum brasilense*, a testemunha absoluta (sem adição de nitrogênio mineral e inoculação) e as testemunhas nitrogenadas com 50 e 100% de N-ureia, em quatro repetições. Sete estirpes que se destacaram foram selecionadas quanto capacidade de induzir maior produtividade à cultura e a partir desse resultado, foi realizado uma análise de compatibilidade para testar a competição e/ou interação *in vitro*. Com esse resultado, três estirpes foram selecionadas para compor os tratamentos de três experimentos de campo instalados em diferentes condições edafo-climáticas em única safra de 2017, seguindo os protocolos da legislação brasileira. Além disso, houve o acréscimo de um tratamento inoculante formado pela mistura dessas estirpes, um tratamento com a estirpe recomendada, a testemunha absoluta e as nitrogenadas. Os dados foram avaliados pelas médias das quatro repetições pelo teste Scott-Knott. A estirpe DBG7 (*Paenibacillus* sp.) foi responsável por promover maior rendimento para a cultura com resultados semelhantes à nitrogenada 50% e a estirpe recomendada. O incremento nos três locais variou entre 14 a 33%, representando em valores um aumento de 744 a 1.313 kg ha⁻¹, ou seja, de 12 a 21 sacas a mais por hectare cultivado, sugerindo a aplicabilidade da inoculação. Esse resultado reforça a possibilidade de substituir pela metade à utilização de fertilizantes nitrogenados e revela a prospectiva de um novo inoculante comercial.

Palavras chave: Bactérias endofíticas; Fixação biológica; *Paenibacillus*; Semiárido

PERFORMANCE AGRONOMIC WITH THE USE OF DIAZOTROPHIC BACTERIA IN MAIZE CULTURE (*Zea mays*) IN THE NORTHEAST REGION

Abstract: The use of inoculants containing bacteria in the maize crop is a promising way of reducing the consumption of nitrogen fertilizers. However, the principle of diazotrophic-grass interaction in terms of agronomic potentiality is as growth promoters or as atmospheric nitrogen fixers, it will depend on what will be called interaction. In this context, the objective was to select the autopsies of the Brazilian national semi-arid region for the evaluation of the different localities. The first field experiment was carried out in Juazeiro / BA, with corn seeds (BRS Gorutuba), inoculated with the isolate 15 of the Collection of Microorganisms of Agricultural Interest of Embrapa Semiarid (CMISA) by means of peat moss. The were were sequenced by the 16S rRNA gene and appear to be more unstable as growth promoters of some genera *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Bacillus* and *Paenibacillus*. In addition to these bacteria, the inoculant authorized for maize cultivation containing *Azospirillum brasilense*, an absolute control (without addition of mineral nitrogen and inoculation) and a nitrogen control with 50% of N-urea in four replicates. Seven cases that have not been found to be evidence in the capacity of inducing greater analysis to the culture and a due, was a compatibility analysis to test an *in vitro* competition and / or interaction. With this occasion, were selected to compose the first three periods of experience in 2017 edition, following the procedures of the Brazilian legislation. In addition, the addition of an inoculant treatment was performed with the aim of improving treatment conditions, improving the quality of the process and improving the treatment conditions. Data were collected by averages during Scott-Knott replicates. A strain DBG7 (*Paenibacillus* sp.) Was responsible for producing higher yield for a culture with 50% nitrogen effect and the recommended strain. The increase in the three factors varied from 14 to 33%, showing an increase from 744 to 1,313 kg ha⁻¹, that is, from 12 to 21 sacks per hectare cultivated, suggesting an applicability of the inoculation. This result reinforces the possibility of using nitrogen fertilizers and reveals a perspective of a new commercial inoculant.

Keywords: Endophytic bacterium; Biological fixation; Paenibacillus; Semi-arid

3.1 INTRODUÇÃO

As mais variadas situações de clima e solo têm influência direta na produtividade no milho (*Zea mays*), garantidas também pelo melhoramento genético, pela melhoria dos atributos químicos, físicos e biológicos dos solos cultivados, além de adoção de práticas de manejo (OKUMURA; MARIANO; ZACCHEO, 2011).

A cultura do milho demanda elevadas quantidades de nitrogênio (N) e requer o uso de grandes quantidades de adubos nitrogenados para um sistema agrícola de elevada produtividade. No entanto, no cenário atual os sistemas agrícolas buscam formas de minimizar a aplicação de fertilizantes nitrogenados para evitar a poluição do ambiente e reduzir os custos de produção, sem perder o rendimento.

Nesse aspecto, a inoculação com bactérias que possuem a capacidade de produzir fitormônios, que induzem o crescimento radicular e melhoram a absorção de água e nutrientes pelas plantas (COSTA et al., 2015), além de fixar nitrogênio (SANTI et al., 2013) tem demonstrado ser uma biotecnologia promissora para o manejo mais sustentável desta cultura (HUNGRIA et al., 2010; FERREIRA et al., 2013). As bactérias promotoras de crescimento vegetal têm a capacidade de formar associações endofíticas, colonizando espaços internos da planta.

As gramíneas possuem menor capacidade de formar associações com as bactérias fixadoras de nitrogênio, quando comparadas às leguminosas. No entanto, tem sido demonstrado que parte considerável do N presente nessas plantas pode derivar da fixação biológica do nitrogênio (FBN) (BALDANI et al., 2014). Apesar dos resultados promissores já observados com as estirpes comerciais de gramíneas, bioprospecção de novas estirpes e a avaliação de sua eficiência são importantes na seleção de isolados com potencial para incrementar ainda mais o sucesso da FBN em condições de campo (ALVES et al., 2016).

As bactérias associativas podem empregar uma variedade de mecanismos distintos, isolados ou em combinação, para promover o crescimento vegetal ao colonizar com sucesso o sistema radicular. Nesse caso, a combinação de mais de uma estirpe pode aumentar o efeito positivo e a eficiência do inoculante (SANTOS et al., 2017).

Uma realidade desta abordagem reside na existência da recomendação técnica para inoculantes comerciais na cultura da soja com a utilização de ao menos duas bactérias fixadoras de N₂. Para gramíneas, os inoculantes comerciais do milho

geralmente contam com a presença de duas estirpes de *Azospirillum brasilense* (HUNGRIA et al., 2010) e o inoculante misto para a cultura da cana-de-açúcar contém cinco estirpes de diferentes espécies de bactérias diazotróficas associativas (SCHULTZ et al., 2015).

Em um estudo conduzido por Cavalcanti (2016), houve o isolamento de 405 bactérias utilizando diferentes metodologias em duas variedades de milho, em áreas distintas da região semiárida, com material coletado de várias partes da planta e rizosfera. Foram realizados a caracterização fenotípica, molecular, os traços de promoção de crescimento *in vitro* (produção de ácido-indol-acético, sideróforos, solubilização de fosfato de cálcio, determinação no teor de proteínas e antagonismo a *Fusarium oxysporum*), além da promoção de crescimento em vasos com condições de campo, sendo selecionados ao final, 15 isolados que induziram os melhores resultados quanto ao teor de N nessa última avaliação. Para dar continuidade ao trabalho de Cavalcante (2016), esse estudo teve por objetivo avaliar a eficiência dessas bactérias diazotróficas oriundas de solos da região semiárida do Brasil para a cultura do milho em diferentes condições edafo-climáticas do Nordeste.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Identificação taxonômica

Para a realização da identificação taxonômica foi realizada a avaliação de 15 isolados de bactérias promotoras de crescimento oriundas da CMISA para a cultura do milho. O DNA das espécies bacterianas foram extraídas e identificadas por similaridade com uma estirpe tipo na análise da sequência parcial do gene 16S rRNA.

As bactérias foram cultivadas em meio líquido Dyg's: 2 g de glicose; 1,5 g de peptona; 2 g de extrato de levedura; 0,5 g de $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para 1 L, sendo ajustado o pH para 6,8 (RODRIGUEZ NETO et al., 1986) e mantido sob agitação constante por 5 dias. O DNA foi extraído utilizando o kit de extração de DNA genômico assistente® (Promega, EUA), seguindo as instruções do fabricante. As reações de PCR foram realizadas com os primers universais 27F e 1492R (WEISBURG et al., 1991) e os produtos foram verificados por eletroforese horizontal em gel de agarose (0,8%, p/v). Para a purificação dos produtos do PCR, utilizou-se o kit de purificação de PCR/Gel® assistente (Promega, EUA) seguindo as instruções

do fabricante. O sequenciamento foi realizado com um analisador genético ABI 3037xl (Applied Biosystems, EUA) por Macrogen (Seoul, Coreia do Sul). A qualidade das sequências foi avaliada pela SeqScan software v 2.0 (aplicada Biosystems, EUA) e o *contigs* foram montados com o BioEdit software v 7.0 (<http://mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Para identificação bacteriana, as sequências de rRNA 16S foram comparadas com o banco de dados EzBioCloud (www.ezbiocloud.net) (YOON et al., 2017) e as sequências depositadas no GenBank.

3.2.2 Locais de experimentos

Para a seleção das bactérias diazotróficas na cultura do milho foram instalados quatro experimentos em três localidades da Região Nordeste: dois em Juazeiro (BA), um em Cruz das Almas (BA) e um Petrolina (PE), nessa respectiva ordem, detalhados na Tabela 1. A variedade do cultivar utilizado foi BRS Gorutuba.

O primeiro experimento teve o objetivo selecionar as bactérias que apresentaram melhor resposta quanto ao uso do inoculante e aumento da produtividade, obtendo menor número de bactérias para os próximos três experimentos em diferentes condições edafo-climáticas.

Para o início dos experimentos foram coletadas amostras compostas, formadas a partir de dez subamostras de solo na camada de 0 a 0,20 m de profundidade das áreas experimentais para a caracterização da fertilidade dos solos (Tabela 2). Antes da instalação dos experimentos em todas as áreas houve o preparo do solo, sendo realizadas aração e gradagem.

As adubações complementares nos experimentos de Juazeiro (BA) e Petrolina (PE) foram realizadas de acordo com resultado da análise de solo, e recomendação para a cultura, sendo aplicados 20 kg ha⁻¹ de P₂O₅ usando superfosfato simples, 20 kg ha⁻¹ de K₂O na forma de cloreto de potássio e 90 kg ha⁻¹ de ureia nas parcelas nitrogenadas (CAVALCANTI, 2008). Já no experimento de Cruz das Almas (BA) a área foi fertilizada com a recomendação de 55 Kg ha⁻¹ de P₂O₅ na forma de superfosfato simples, 10 Kg ha⁻¹ de K₂O como cloreto de potássio e 120 kg ha⁻¹ de ureia nas parcelas nitrogenadas (RIBEIRO et al., 1999).

Tabela 1. Detalhamento dos experimentos: local, período, classificação do solo, quantidade de estirpes testadas + recomendada, temperatura mínima, máxima e a média registrada no período, precipitação acumulada e suprimento hídrico.

Experimento	Local	Período	Solo	Estirpes	Temp. mín. (°C)	Temp. máx. (°C)	Temp. Média (°C)	Precipitação acumulada (mm)	Suprimento hídrico
1	Juazeiro - BA	ago./nov. 2016	Vertissolo Háptico de textura argilosa	15 + 1	18	36	27	22	Gotejamento
2	Juazeiro - BA	jun./ out. 2017	Vertissolo Háptico de textura argilosa	3 + 1	17	34	24	5	Gotejamento
3	Cruz das Almas - BA	jul./ out. 2017	Latossolo Amarelo Álico Coeso, de textura argilosa	3 + 1	16	29	22,5	417	Disponibilidade de chuva
4	Petrolina – PE	ago./ nov. 2017	Argissolo Vermelho-Amarelo	3 + 1	18	36	26	20	Gotejamento

Tabela 2. Características de fertilidade de solo na camada 0 - 20cm.

Experimento	Local	pH (H ₂ O)	C	P	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	SB ¹	CTC ²	EC ³	V ⁴
			g kg ⁻¹	mg dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³			mS cm ⁻¹			%			
1	Juazeiro – BA	7,0	2,1	20,3	0,25	0,02	23,1	2,7	0	0,7	26,1	26,8	0,168	97,3
2	Juazeiro – BA	7,1	8,2	29,1	0,51	0,16	15,6	3,6	0	0	19,9	19,9	0,33	100
3	Cruz das Almas – BA	5,9	7,8	4,0	0,13	-	0,9	0,4	0,1	2,0	1,4	3,4	-	41,2
4	Petrolina – PE	6,0	2,6	15,4	0,24	0,06	2,1	1,0	0	0,5	3,4	3,9	2,600	87,6

1 – Soma de base; 2 – Capacidade de troca de cátions; 3 – Condutividade elétrica; 4 – Saturação por bases.

3.2.3 Experimento de campo para seleção das estirpes

O primeiro experimento foi instalado no Campo Experimental Mandacaru, nas dependências da Embrapa Semiárido, localizado no município de Juazeiro, BA (coordenadas 09°24'S, 40°26'W com altitude de 351 metros), no período de agosto a novembro de 2016. O município está localizado em clima Tropical semiárido. O ensaio foi implantado no campo em solo (Tabela 1).

O suprimento hídrico em Juazeiro, BA e Petrolina, PE foi realizado pelo sistema de irrigação por gotejamento com fitas e espaçamento de 0,5 m entre gotejadores e uma profundidade de irrigação de 1,6 L h⁻¹.

O delineamento experimental adotado foi em blocos ao acaso com 19 tratamentos e quatro repetições. Cada parcela foi constituída de 5 linhas de 3 m de comprimentos espaçadas em 1 m entre linhas e 0,25 m entre plantas na mesma linha, totalizando uma área 15 m².

Os 19 tratamentos foram constituídos pela inoculação individual dos 15 isolados em teste (15 tratamentos); uma estirpe recomendada (Ab-V5) de *A. brasilense*; uma testemunha absoluta (sem inoculação e sem adubação nitrogenada); o nitrogenado com 45 kg ha⁻¹ de N-ureia e o controle nitrogenado com 90 kg ha⁻¹ de N-ureia, aplicados de forma parcelada no plantio e floração (50 % em cada fase).

Inicialmente todas as estirpes foram cultivadas em placas com meio sólido Dyg's para confirmar a morfologia das colônias e a pureza do estoque. Os inoculantes foram preparados a partir do cultivo dos isolados em meio Dyg's líquido sob agitação constante. A inoculação ocorreu com 250 g de inoculante turfoso para 10 kg⁻¹ de sementes (10⁸ células mL⁻¹), inclusive a autorizada. Na inoculação, uma solução supersaturada de sacarose (50 mL por kg de semente) foi utilizada como agente adesivo. O processo de inoculação consistiu na aplicação da solução açucarada sobre as sementes, seguida do inoculante turfoso; após a mistura, as sementes foram deixadas para secar na sombra por 15 minutos, a semeadura foi feita imediatamente após a secagem, em período não superior a duas horas.

As plantas espontâneas foram controladas manualmente e para as pragas lagarta-do-cartucho (*Spodoptera fugiperda*) e lagarta rosca (*Agrotis ipsilon*), três aplicações de Lambda-cialotrina e Clorpirifós, respectivamente em aproximadamente 15, 45 e 65 dias, após a emergência.

Decorridos 45 dias (florescimento pleno), após a semeadura, avaliaram-se o índice relativo de clorofila a e b. Entre 60-65 dias após a semeadura, realizaram-se coletas das amostras para avaliação das variáveis biométricas na fase (V8) da cultura retirando-se, de forma aleatória cinco plantas da segunda linha de cada parcela dispensando-se 1 m em cada cabeceira. A altura de plantas foi mensurada com auxílio de trena. Em seguida, as plantas foram removidas com auxílio de uma pá e seccionadas em diferentes partes, colmo e folhas sendo estas acondicionadas em sacos de papel, identificadas e levadas à estufa de circulação forçada de ar a $65 \pm 2^\circ \text{C}$ por 72 h, para posterior pesagem e determinação da massa da parte aérea seca (MPAS). As espigas foram avaliadas nessa fase vegetativa quanto ao tamanho (cm planta^{-1}) e peso (g planta^{-1}) sem casca, com auxílio de régua e balança, respectivamente.

O teor de N (mg planta^{-1}) da parte aérea seca foi avaliado na terceira folha plenamente expandida a partir do ápice da haste. O material foi moído e a concentração de N avaliada pelo método de combustão seca no analisador elementar de C e N LecoSorb (LECO, EUA) no Laboratório de Análise de Solos e Plantas da Embrapa Semiárido. O mesmo método foi realizado para avaliar o teor de N no grão na segunda coleta. O resultado foi usado para determinar a relação C/N e o acúmulo de N da parte aérea.

Na segunda coleta de espigas, realizada aos 90-95 após a emergência na fase (R3), selecionaram-se dez plantas da área útil nas duas linhas centrais de cada parcela dispensando-se 1 m em cada cabeceira. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em câmara fria a 10°C até posterior processamento. O milho foi debulhado para o cálculo do rendimento de grãos (kg ha^{-1}) com umidade padronizada a 13% e a massa de 100 grãos (g) em cada parcela. O rendimento foi padronizado para kg ha^{-1} . O incremento relativo foi calculado sobre o valor da produtividade em relação a testemunha absoluta (%).

Os resultados foram avaliados pela análise de variância e, quando o teste "F" foi significativo a 5%, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Scott-knott, também ao nível de 5% e transformados para $(X + 1)^{0.5}$. Os dados foram avaliados com o software de análise estatística Sisvar v 5.0 (FERREIRA, 2011).

3.2.4 Compatibilidade das estirpes

Após o primeiro experimento, realizou-se o teste *in vitro* de resistência intrínseca entre os sete isolados que apresentaram melhor resposta no experimento de campo, buscando avaliar a competitividade e/ou interação entre eles.

Os isolados foram cultivados em tubos contendo caldo Dyg's sob agitação orbital por três dias a 125 rpm. Posteriormente inocularam-se separadamente três alíquotas de 10 µL do caldo de cultivo em pontos equidistantes de placas de Petri, contendo meio Dyg's sólido. As placas foram incubadas e após 48 h, outra camada de meio Dyg's contendo agar nobre (baixo ponto de fusão) e pré-inoculado com o segundo isolado em teste foi vertida sobre a primeira camada, formando uma dupla camada. A interação entre os isolados foi observada com análise visual a formação de halo translúcido ao redor das colônias, observando sua inibição, neutralidade e/ou efeito positivo sobre o crescimento da outra (ROMEIRO, 2001).

3.2.5 Experimento de campo em diferentes condições edafo-climáticas

Os próximos três experimentos de campo foram realizados na safra de 2017. O primeiro ensaio foi realizado em Juazeiro (BA), instalado no mesmo local, mas em diferente área experimental descrita na Tabela 1, no período de junho a outubro. O segundo ensaio foi realizado em Cruz das Almas (BA), no Campus da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (coordenadas 12°40'S e 39°06'W, com altitude de 225 metros), no período de julho a outubro. O município está localizado em clima Tropical Úmido em solo classificado como Latossolo Amarelo Álico Coeso, de textura argilosa. Já o terceiro ensaio foi instalado em Petrolina (PE), no Campo Experimental de Bebedouro nas dependências da Embrapa em Petrolina (coordenadas 09°09'S e 40°22'W com altitude de 369 metros) no período de agosto a novembro. O município está situado no clima Tropical semiárido em solo classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo. Os dados climatológicos dos três municípios onde foram instalados os experimentos estão descritos na Tabela 1.

O delineamento experimental adotado foi em blocos ao acaso com quatro repetições. As parcelas experimentais foram implantadas de forma que possibilitasse uma área experimental suficientemente representativa de 4,0 x 6,0m e distanciada em 1,0 m entre linhas e 0,25 m entre plantas na mesma linha. Seguindo as normas recomendadas na RELARE (Reunião da Rede de Laboratórios para a

Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola) (BRASIL, 2011).

Nos três ensaios testaram-se oito tratamentos: a inoculação única de três isolados (DBG7, DBG24 e LBG82); um MIX formado pela mistura desses três isolados; uma testemunha absoluta (sem inoculação e sem N); uma estirpe autorizada (Ab-V5); um controle nitrogenado com 50% de N-ureia ha⁻¹ e o controle nitrogenado com 100% de N-ureia ha⁻¹. A adubação foi parcelada em duas etapas, entre o plantio e floração. A inoculação seguiu a recomendação de 250 g de inoculante turfoso para 10 kg⁻¹ de sementes.

As variáveis avaliadas foram às mesmas descritas anteriormente no primeiro experimento. Os resultados foram avaliados pela análise de variância e, quando o teste “F” foi significativo a 5%, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Scott-knott, também ao nível de 5% e transformados para $(X + 1)^{0.5}$. Os dados foram avaliados com o software de análise estatística Sisvar v 5.0 (FERREIRA, 2011).

4. RESULTADOS

4.1 Classificação dos isolados com base na análise de sequenciamento parcial do gene16S rRNA

Dos quinze isolados testados, treze foram identificados com base na análise de sequenciamento parcial do gene 16S rDNA com uma estirpe tipo, três pertencem ao gênero *Rhizobium*, três ao *Bradyrhizobium*, seis ao *Bacillus*, um ao *Paenibacillus* e dois não foram identificados, decorrente a qualidade das amostras. Os isolados demonstraram alta similaridade na sequência entre 98 a 100% (Tabela 3).

Todos os isolados pertencem a gêneros já conhecidos pela capacidade de proporcionar incrementos na produtividade atuando como BPCV ou no processo de FBN nas gramíneas.

Tabela 3. Identificação dos 15 isolados de bactérias promotoras do crescimento do milho pertencentes a Coleção de Microrganismos de Interesse da Embrapa Semiárido (CMISA) com base na análise de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA com uma estirpe tipo.

TRATAMENTO	ESPÉCIE MAIS PRÓXIMA (ESTIRPE TIPO)	SIMILARIDADE (%)	NÚMERO DE ACESSO NO GENBANK
DBG15	Não identificada	--	--
DBG23	Não identificada	--	--
PBG82	<i>Bacillus siamensis</i> KTC 13613 ^T .	98	KY643639.1
PBG56	<i>Bacillus megaterium</i> (NBRC 15308 ^T)	99	CP009920.1
PBG89	<i>Bacillus pumilus</i> (NCTC10337 ^T)	99	LT906438.1
DBG1	<i>Bacillus safensis</i> (NBRC100820 ^T)	99	NR_113945.1
DBG19	<i>Bacillus nealsonii</i> (DSM 15077 ^T)	99	NR_044546.1
DBG24	<i>Bacillus subtilis</i> (NCIB 3610 ^T)	100	CP020102.1
DBG7	<i>Paenibacillus panacisoli</i> (Gsoil 1411 ^T)	98	NR_041381.1
LBG82	<i>Rhizobium calliandrae</i> (CCGE 524 ^T)	99	JX855162.1
LMG32	<i>Rhizobium calliandrae</i> (CCGE 524 ^T)	99	JX855162.1
LMG27	<i>Rhizobium pusense</i> (NRCPB 10 ^T)	99	FJ969841.1
LBC71	<i>Bradyrhizobium kavangense</i> (14-3 ^T)	99	KP899562.1
LMG31	<i>Bradyrhizobium kavangense</i> (14-3 ^T)	99	KP899562.1
LBC76	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> (CCBAU10071 ^T)	100	AF193818

4.2 Avaliação na promoção de crescimento e desempenho agrônômico em diferentes condições edafo-climáticas

Experimento 1 – Em Juazeiro, BA não foi observada diferença significativa para as variáveis altura das plantas, massa da parte aérea seca, teor de N da parte aérea, teor de N no grão e peso de 100 grãos (Tabela 4). Para o IRC oito isolados bacterianos foram capazes de resultar plantas com IRC superior à testemunha absoluta e iguais aos valores observados nos tratamentos com as duas doses de N.

Tabela 4. Avaliação na promoção de crescimento e desempenho agrônômico nas plantas de milho inoculadas com estirpes de bactérias diazotróficas no Campo Experimental em Mandacaru, Juazeiro (BA).

TRAT.	IRC	ALT (cm planta ⁻¹)	MPAS	TNPA (g planta ⁻¹)	TNG	P100G (g)	PROD (kg ha ⁻¹)	I.R (%)
LBC71	41,3 b	183 a	45,5 a	23,04 a	20,34 a	23,51 a	4,407 b	49
LMG27	51,0 a	178 a	56,2 a	23,16 a	20,71 a	22,64 a	3,703 c	25
LBC76	46,1 b	162 a	93,7 a	22,63 a	20,65 a	22,19 a	4,021 c	36
LBG82	48,0 a	167 a	65,0 a	23,87 a	20,14 a	23,87 a	4,871 b	65
LMG31	48,2 a	184 a	53,7 a	20,89 a	21,23 a	21,74 a	3,710 c	25
LMG32	42,4 b	150 a	58,3 a	22,70 a	20,89 a	22,79 a	2,927 c	-0,6
PBG56	40,2 b	174 a	42,5 a	22,16 a	21,14 a	21,12 a	3,485 c	18
PBG82	45,7 b	137 a	61,6 a	21,06 a	20,93 a	26,95 a	2,339 c	-20
PBG89	51,2 a	169 a	83,7 a	22,44 a	19,75 a	25,72 a	4,754 b	61
DBG1	54,8 a	164 a	50,0 a	23,83 a	22,14 a	23,70 a	4,476 b	51
DBG15	50,8 a	167 a	71,2 a	22,82 a	20,51 a	24,02 a	3,465 c	17
DBG19	36,7 b	170 a	47,5 a	22,63 a	20,32 a	23,02 a	4,606 b	56
DBG23	44,3 b	173 a	68,7 a	23,31 a	20,57 a	21,81 a	4,026 c	36
DBG24	52,9 a	189 a	58,7 a	23,02 a	20,51 a	23,30 a	5,232 b	77
DBGS7	48,4 a	171 a	46,2 a	22,24 a	20,78 a	21,34 a	4,940 b	67
Ab-V5	43,5 b	192 a	58,3 a	22,02 a	21,39 a	20,86 a	4,601 b	56
T.N 90	55,7 a	165 a	63,3 a	25,95 a	20,52 a	24,35 a	7,810 a	165
T.N 45	48,1 a	180 a	58,3 a	23,95 a	20,19 a	23,94 a	4,075 c	38
T.A	39,1 b	170 a	53,3 a	21,53 a	20,66 a	22,11 a	2,947 c	--
CV%	5,73	3,27	18,68	4,17	3,29	5,32	17,07	

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

IRC = Índice relativo de clorofila, ALT =, MPAS = Massa Parte Aérea Seca, TNPA = Teor de N na Parte Aérea, TNG = Teor de N no Grão, P100G = Peso de 100 Grãos, PROD = Produtividade e I.R = Incremento relativo. Ab-V5 = estirpe recomendada; T.N90 = testemunha nitrogenada com 90 kg ha⁻¹ de ureia; T.N45 = testemunha nitrogenada com 45 kg ha⁻¹ de ureia e T.A = testemunha absoluta, sem inoculação e sem N.

A maioria das estirpes proporcionou incremento na produtividade do milho com valores superiores aos encontrados no tratamento que recebeu a adubação com a metade da dose recomendada N-ureia. Apenas os tratamentos que receberam as inoculações das estirpes PBG82 e LMG32 não apresentaram aumento de produtividade, em comparação a testemunha absoluta. Sete isolados induziram produtividade das plantas de milho iguais aos valores obtidos no tratamento inoculado com a estirpe autorizada (Ab-V5) e, também foram superiores aos tratamentos testemunha absoluta e ao com aplicação de 45 kg N-ureia ha⁻¹. Isto demonstra a capacidade destas em suplementar parcialmente o N mineral

necessário para as plantas. Deve-se ressaltar que, com relação à produtividade do milho, todos os tratamentos foram inferiores à testemunha que recebeu a adubação com 90 kg N-ureia ha⁻¹. Cinco estirpes se destacaram, pois, mesmo não se diferenciando ($p < 0,05$), obtiveram resultado igual ou superior a Ab-V5. Tal fato demonstra a capacidade destas de fornecer o N necessário para as plantas, tanto quanto a estirpe atualmente autorizada para uso comercial.

As estirpes identificadas como DBG7 = *Paenibacillus panacisoli*, DBG24 = *Bacillus subtilis*, DBG1 = *Bacillus safensis*, PBG89 = *Bacillus pumilus* e LBG = *Rhizobium calliandrae* destacaram-se por apresentar melhor desempenho para as variáveis IRC e produtividade.

4.3 Resultado do teste de compatibilidade *in vitro*

Sete estirpes de bactérias (LBC71, LBG82, PBG89, DBG1, DBG19, DBG24 e DBG7) utilizadas no experimento anterior foram selecionados por apresentarem melhor desempenho na produtividade igual à estirpe comercial e superiores ao tratamento com 45 kg N ha⁻¹ e à testemunha absoluta. Essas foram avaliadas quanto a sua eficiência de competitividade/interação. Das 42 combinações formadas 10 foram responsáveis por proporcionar efeito benéfico a outra bactéria, por estimular o seu crescimento. Três destas apresentaram interação negativa, que foi observada pela formação de halo translúcido ao redor da bactéria. As demais não tiveram interação e não interferiram sobre crescimento da outra (Tabela 5).

Tabela 5. Teste de compatibilidade *in vitro* dos sete isolados com potencial efeito de promover o rendimento em milho. Os isolados foram crescidos em duas camadas avaliando o poder de competitividade e/ou interação, promovendo efeito de crescimento, inibição ou neutralidade entre eles.

BASE	COBERTURA	INTERAÇÃO	BASE	COBERTURA	INTERAÇÃO
PBG89	DBG7	+	DBG1	DBG19	N
PBG89	LBC71	-	DBG7	BG89	N
PBG89	DBG1	+	DBG7	LBC71	N
PBG89	DBG24	+	LBC71	DBG19	N
LBG82	DBG24	+	DBG19	DBG7	N
DBG24	LBC71	-	LBC71	DBG24	N
LBG82	LBC71	-	LBC71	DBG1	N
DBG24	PBG89	+	LBC71	LBG82	N
LBC71	PBG89	+	DBG24	DBG19	N
LBG82	DBG7	+	DBG24	DBG1	N
DBG7	DBG19	+	LBC71	DBG7	N
DBG1	DBG7	+	DBG19	LBC71	N
LBG82	DBG19	+	BG89	LBG82	N
DBG24	LBG82	N	DBG19	DBG1	N
DBG24	DBG7	N	DBG7	DBG1	N
DBG7	DBG24	N	DBG1	DBG24	N
DBG7	LBG82	N	DBG19	DBG24	N
BG89	DBG19	N	DBG19	BG89	N
DBG1	LBG82	N	LBG82	DBG1	N
DBG1	PBG89	N	DBG19	LBG82	N
DBG1	LBC713	N	LBG82	BG89	N

BASE = primeiro isolado, COBERTURA = segundo isolado. INTERAÇÃO (+) = positiva; (-) = negativa e (N) = neutro.

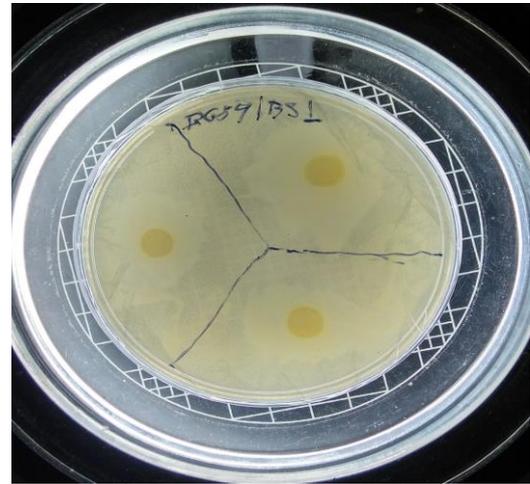
As estirpes LBG82 (*Rhizobium calliandrae*), DBG24 (*Bacillus subtilis*) e DBG7 (*Paenibacillus panacisoli*), que foram responsáveis por apresentar maior produtividade, apresentaram também resposta positiva e/ou neutra nessa avaliação. A partir desse resultado foi formulado um inoculante misto com a mistura dessas três bactérias para os próximos três experimentos de campo.

Abaixo na figura 1, representadas como A, B, C e D, foram identificadas a interação positiva entre as bactérias: PBG89 / DBG24; PBG89 / DBG1; PBG89 / DBG7 e LBG82 / DBG24. Enquanto nas figuras E e F foram identificadas a falta de interação entre as bactérias: DBG24 / LBC71 e PBG89 / LBC71.

Figura 1. Avaliação visual *in vitro* da competitividade e/ou interação entre as bactérias em uma dupla camada em meio sólido Dyg's, sob diferente ponto de fusão. As figuras (A, B, C e D) representam a interação positiva entre as duas bactérias. As figuras (E e F) representam a interação negativa inibindo o crescimento da outra bactéria, perceptível pela formação de halo translúcido ao redor.



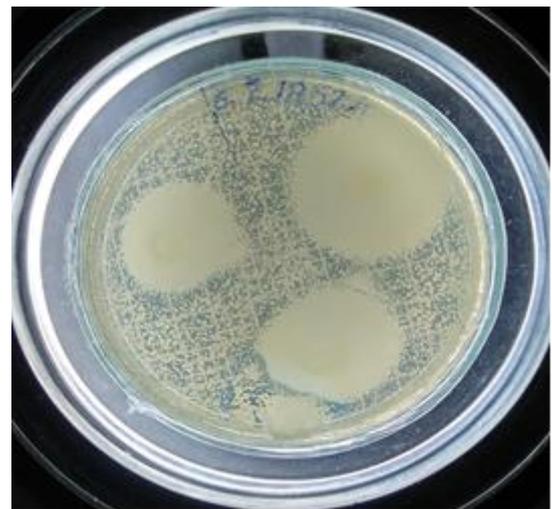
(A)



(B)



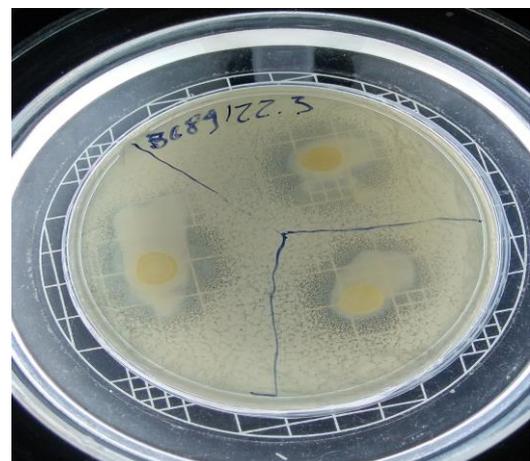
(C)



(D)



(E)



(F)

4.4 Avaliação da promoção de crescimento em diferentes condições edafo-climáticas

Em Juazeiro, os tratamentos inoculados com as estirpes DBG7 e com Ab-V5 induziram maior valor para MPAS com aumento 21%, conseqüentemente, proporcionaram o aumento de 3% no ANPA para as plantas de milho comparada a testemunha absoluta. Para as demais variáveis não houve diferenças ($p>0,05$) (Tabela 6).

Já em Cruz das Almas o tratamento que recebeu 120 kg ha^{-1} de N apresentou aumento de 13,6% na altura quando comparado a testemunha absoluta, seguido por aumento de 4,5% proporcionado pelo tratamento com a adubação de 60 kg ha^{-1} de N. Os demais tratamentos inoculados apresentaram médias similares ($p<0,05$) às plantas que não receberam adubação química e inoculação. Para as variáveis MPAS, TNPA, C/N e ANPA não houve diferenças ($p>0,05$) entre os tratamentos, indicando a falta de resposta da cultura aos tratamentos adubados e inoculados (Tabela 6).

Em Petrolina (PE), as médias de MPAS variaram entre o mínimo de $136 \text{ g planta}^{-1}$ para DBG7, que representou uma redução de 16%, comparada à testemunha absoluta e a máxima para a estirpe DBG24 com $169,5 \text{ g planta}^{-1}$. Para as demais variáveis não houve diferença ($p>0,05$) entre os tratamentos (Tabela 6).

Tabela 6. Componentes de produção da fase vegetativa da cultura do milho inoculado com estirpes de bactérias diazotróficas nos campos experimentais de Juazeiro, BA; Cruz das Almas, BA e Petrolina, PE, em única safra de 2017.

TRATAMENTO	ALT (cm planta ⁻¹)	MPAS (g planta ⁻¹)	TNPA (g Kg planta ⁻¹)	Relação C/N	ANPA (g N planta ⁻¹)
Juazeiro, BA					
LBG82	192 a	102,8 b	33,51 a	12,51 a	3,43 b
DBG24	187 a	101,0 b	30,12 a	13,74 a	3,02 b
DBG7	196 a	131,0 a	31,06 a	13,30 a	4,07 a
MIX	199 a	105,8 b	29,90 a	13,66 a	3,16 b
Ab-V5	183 a	127,9 a	30,60 a	13,27 a	3,91 a
T.N 90	190 a	113,2 b	30,69 a	13,33 a	3,47 b
T.N 45	193 a	115,6 b	29,57 a	13,89 a	3,42 b
T.A	193 a	108,7 b	28,19 a	14,77 a	3,02 b
CV (%)	1,96	5,90	3,92	3,55	4,21
Cruz das Almas, BA					
LBG82	167 c	68,5 a	21,81 a	22,43 a	1,51 a
BG24	175 c	67,5 a	23,58 a	20,62 a	1,59 a
DBG7	177 c	86,8 a	25,23 a	19,38 a	2,21 a
MIX	174 c	84,5 a	23,70 a	20,57 a	2,00 a
Ab-V5	165 c	73,9 a	23,23 a	21,15 a	1,76 a
T.N 120	200 a	118,6 a	24,70 a	19,88 a	2,97 a
T.N 60	184 b	84,5 a	23,90 a	20,17 a	2,02 a
T.A	176 c	77,5 a	24,47 a	19,83 a	1,90 a
CV (%)	1,74	10,91	4,36	4,5	9,54
Petrolina, PE					
LBG82	165 a	148,5 a	43,14 a	3,80 a	6,41 a
DBG24	159 a	169,5 a	43,00 a	4,11 a	7,29 a
DBG7	167 a	136,0 a	42,84 a	3,74 a	5,83 a
MIX	171 a	151,0 a	43,20 a	4,45 a	6,52 a
Ab-V5	160 a	161,0 a	43,49 a	3,85 a	7,00 a
T.N 90	163 a	163,3 a	43,13 a	3,76 a	7,06 a
T.N 45	156 a	147,3 a	42,98 a	3,96 a	6,30 a
T.A	159 a	162,8 a	43,64 a	4,18 a	7,10 a
CV (%)	2,52	9,52	0,79	4,95	8,66

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. ALT = Altura, MPAS = Massa da Parte Aérea Seca, TNPA = Teor de N na Parte Aérea, Relação C/N e ANPA = Acumulo de N na Parte Aérea. MIX = Mistura das bactérias; Ab-V5 = estirpe recomendada; T.N 90 e T.N 120 = testemunha nitrogenada com 90 e 120 kg ha⁻¹ de ureia; T.N 45 e T.N 60 = testemunha nitrogenada com 45 e 60 kg ha⁻¹ de ureia; T.A = testemunha absoluta, sem inoculação e sem N.

4.5 Avaliação do desempenho agrônômico em diferentes condições edafo-climáticas

Em Juazeiro (BA), não houve diferença ($p>0,05$) para nenhum das variáveis analisadas, apesar de ter sido observada a maior média geral para produtividade $10,15 \text{ kg ha}^{-1}$. As estirpes LBG82 e a DBG7 induziram a maior produtividade do milho com incremento equivalente à testemunha inoculada com a estirpe autorizada e nitrogenada com N45 (Tabela 7).

Em Cruz das Almas (BA), não houve resposta para as variáveis TESP, PESP e P100G ($p>0,05$). Contudo, as estirpes DBG24 e o tratamento MIX proporcionaram maior produtividade do milho, pois possibilitaram incrementos de 47% e 36% respectivamente, não diferindo ($p>0,05$) do tratamento que recebeu $120 \text{ kg de N ha}^{-1}$. A estirpe DBG7 está incluída nesse grupo, pois proporcionou incremento de 33%. A média de produtividade apresentada neste ensaio foi a mais baixa dos três locais correspondendo a $2,76 \text{ kg ha}^{-1}$ (Tabela 7). A estirpe LBG82 e a recomendada Ab-V5 apresentaram pior resposta, com incremento de apenas 3,8% sobre o tratamento sem inoculação, seguida da parcialmente nitrogenada com 50% de N representando 8,1%.

Em Petrolina (PE) as estirpes LBG82 e DBG7 induziram a maior média do peso de 100 grãos nas plantas. As mesmas estirpes se destacaram quanto à produtividade e não apresentaram diferença ($p>0,05$) da recomendada e das nitrogenadas. Ambas representaram um incremento de 15% sobre o tratamento sem inoculação (Tabela 7). A média de produtividade apresentada neste ensaio foi de $7,45 \text{ kg ha}^{-1}$.

Tabela 7. Componentes de produção da fase reprodutiva da cultura do milho inoculado com estirpes de bactérias diazotróficas nos campos experimentais de Juazeiro, BA; Cruz das Almas, BA e Petrolina, PE, em única safra de 2017.

TRATAMENTO	TESP (cm planta ⁻¹)	PESP (g planta ⁻¹)	P100G	PROD (kg ha ⁻¹)	I. R (%)
Juazeiro, BA					
LBG82	14,7 a	168,89 a	38,99 a	10,42 a	16
DBG24	15,1 a	180,29 a	40,19 a	10,01 a	11
DBG7	15,0 a	185,76 a	38,84 a	10,29 a	14
MIX	15,0 a	186,57 a	39,33 a	9,83 a	9
Ab-V5	15,7 a	181,51 a	40,08 a	10,47 a	16
T.N 90	15,3 a	176,52 a	41,16 a	10,64 a	18
T.N 45	15,2 a	181,27 a	43,56 a	10,50 a	16
T.A	15,8 a	197,37 a	42,13 a	8,98 a	--
CV (%)	2,75	5,74	3,70	5,99	
Cruz das Almas, BA					
LBG82	14,3 a	98,07 a	23,03 a	2,31 b	4
DBG24	14,3 a	109,65 a	27,67 a	3,27 a	47
DBG7	14,3 a	109,10 a	24,43 a	2,97 a	33
MIX	15,6 a	105,37 a	26,19 a	3,03 a	36
Ab-V5	14,7 a	106,67 a	25,32 a	2,31 b	4
T.N 120	15,7 a	136,26 a	24,85 a	3,52 a	58
T.N 60	14,2 a	114,56 a	26,51 a	2,41 b	8
T.A	14,5 a	119,47 a	22,27 a	2,23 b	--
C.V (%)	5,19	7,51	5,32	11,02	
Petrolina, PE					
LBG82	18,5 a	212,12 a	37,87 a	7,73 a	15
DBG24	18,2 a	189,43 a	34,37 b	6,97 b	4
DBG7	17,8 a	181,84 a	38,23 a	7,73 a	15
MIX	16,4 a	165,40 a	34,90 b	6,69 b	-0.3
Ab-V5	16,6 a	183,95 a	39,20 a	7,70 a	14
T.N 90	16,8 a	168,15 a	35,64 b	8,52 a	26
T.N 45	17,0 a	187,94 a	36,09 b	7,55 a	12
T.N 0	18,0 a	234,22 a	34,29 b	6,72 b	--
CV (%)	4,26	9,05	2,83	5,05	

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. TESP = Tamanho Médio da Espiga, PESP = Peso Médio da Espiga, P100G = Peso de 100 Grãos, PROD = Produtividade e I.R = incremento relativo. MIX = Mistura das bactérias; Ab-V5 = estirpe recomendada; T.N 90 e T.N 120 = testemunha nitrogenada com 90 kg ha⁻¹ e 120 kg ha⁻¹ de ureia; T.N 45 e T.N 60 = testemunha nitrogenada com 45 kg ha⁻¹ e 60 kg ha⁻¹ de ureia; T.A = testemunha absoluta, sem inoculação e sem N.

5. DISCUSSÃO

As BPCV tem sido pesquisada em várias partes do mundo e em diferentes culturas (BURBANO et al., 2011; VIDEIRA et al., 2013; JOHNSTON-MONJE et al., 2016; MIGUEL et al., 2016), afim de elucidar os mecanismos de promoção de crescimento vegetal, assim como a possibilidade de redução de pesticidas (MONTESINOS E BONATERRA, 2009) e fertilizantes químicos na agricultura, principalmente os nitrogenados. Neste contexto, em regiões semiáridas, onde o clima desfavorece a produção pela carência de chuvas e altas temperaturas, a obtenção de estirpes de bactérias diazotróficas já adaptadas a estas condições pode beneficiar a agricultura e o meio ambiente.

Estudos já relataram a presença de genes antibióticos e a eficiência de *Bacillus* contra *Fusarium verticillioides* no milho (CAVAGLIERI, et al., 2005) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* no tomate (ELANCHEZHIAN et al., 2018). O *Bacillus cereus* também já apresentou efeito promissor como potencial biocontrole de nematóides no trigo (ZHANG et al., 2016). Os efeitos da combinação de *Bradyrhizobium* e *Paenibacillus graminis* ou *Bradyrhizobium* e *Bacillus* já foram relatados como capazes de promover melhor proteção contra o estresse à salinidade do solo, no semiárido brasileiro, em plantas de feijão-caupi (SANTOS et al., 2018); assim como na fitorremediação de solos com espécies de *Achromobacter* inoculadas em plantas de *Arabidopsis thaliana* (HO et al., 2012).

Nesse estudo foram identificados quatro gêneros de BPCV associados as plantas de milho. Os gêneros identificados no presente trabalho foram isolados anteriormente por Cavalcanti (2016) a partir da metodologia de inoculação de extratos de raízes de milho em feijão-caupi como planta-isca, sendo identificados nesse trabalho como *Bradyrhizobium* (3) e *Rhizobium* (3). Já os isolados obtidos por meio tradicional de cultivo sólido e semissólido diretamente do milho foram identificados pertencendo aos gêneros *Bacillus* (6) e *Paenibacillus* (1). Esses gêneros já foram encontrados na rizosfera de gramíneas em diferentes ecossistemas (BENEDUZI et al., 2008; JOHNSTON-MONJE et al., 2016; SANTOS et al., 2018).

Com a possibilidade de redução de uso de insumos químicos nitrogenados nos cultivos de milho em regiões semiáridas, considerando resultados obtidos no primeiro experimento de campo (Tabela 4), foram selecionados os isolados que

além de apresentarem melhor resultado quanto a produtividade, também apresentaram resposta positiva e/ou neutra no teste de interação *in vitro*. (Tabela 5). Segundo Santos et al. (2017), uma mistura de estirpes compatíveis e eficientes em promoção de crescimento das plantas, como foi utilizado no presente estudo, aumenta a possibilidade de sucesso na formulação de um inoculante (Tabelas 6 e 7). A partir daqui os ensaios seguintes foram realizados seguindo os protocolos da legislatura brasileira para a recomendação de estirpes para novos inoculantes. Três dos quatro ensaios exigidos foram instalados em única safra de sob condições edafo-climáticas distintas, obtendo resultados estatísticos estabelecidos, iguais e superiores a estirpe atualmente recomendada e a testemunha absoluta.

Os dados climáticos apresentados indicaram que as conduções do experimento mantiveram a temperatura e disponibilidade hídrica constante e uniforme para a execução do experimento, principalmente nos ensaios em condições irrigadas (Tabela 1). Esses aspectos favorecem o crescimento e desenvolvimento das plantas, pois aumentam a mineralização da matéria orgânica e contribuem para maior disponibilidade de N para as plantas.

As áreas utilizadas para a condução dos experimentos nos Campos Experimentais de Mandacaru e Bebedouro, localizados em Juazeiro e Petrolina, respectivamente, fazem parte das dependências da Embrapa Semiárido e são utilizados sucessivamente para a condução de ensaios com culturas anuais (melancia, melão, cebola, abobora, feijão-caupi, etc), sendo fertilizados constantemente. Nestas áreas, as plantas apresentaram valores representativos no desenvolvimento vegetativo e produtivo, mesmo em condições de ausência de inoculação ou fertilização com ureia. Tanto em Juazeiro, quanto em Petrolina os resultados para as variáveis de produção na fase vegetativa e reprodutiva foram bastante similares, possivelmente pelas condições ambientais distintas. Petrolina, no entanto, apresentou valores com uma pequena superioridade para MPAS, TNPA, ANPA e TESP. Enquanto em Juazeiro destacou-se pela ALT, P100G e PROD.

Na prática, apenas a produção de grãos é de valor econômico, sendo o parâmetro mais importante refletindo a importância econômica da inoculação (ALVES et al., 2015; SILVEIRA et al., 2016). Portanto, o incremento relativo descrito aqui foi expressado em incremento de produção de grãos.

As estirpes LBG82 (*Rhizobium calliandrae*) e DBG7 (*Paenibacillus*) foram responsáveis por induzirem maior produtividade do milho, com médias de 10.294 e 10.419 kg ha⁻¹ em Juazeiro e médias de 7.734 e 7.730 kg ha⁻¹ em Petrolina, respectivamente. Ambas resultaram em incremento entre 14 a 16%, equivalente a recomendada e a nitrogenada com 50% de N (Tabela 7). Observando a média nacional atual de produtividade de 5.409 kg ha⁻¹ (CONAB, 2017), foi notório por esse aspecto que todos os tratamentos realizados superaram consideravelmente a média nacional, elevando a produtividade entre 128 a 196%.

Já em Cruz das Almas, o experimento foi conduzido em uma área experimental em solos com baixos teores de nutrientes, sendo esse local, o mais beneficiado pela implementação do experimento. Os três tratamentos de inoculação (DBG24, DBG7, MIX) e de fertilização com o total de N foram as que apresentaram maiores respostas quanto ao incremento, elevando a média regional do Nordeste entre 114 a 135%, que atualmente é de 2.595 kg ha⁻¹, denotando a produtividade mais baixa de todas as regiões brasileiras (CONAB, 2017). Porém, as médias alcançadas por essas estirpes foram de 3.274, 2.969 e 3.027 kg ha⁻¹, respectivamente.

Estudos recentes testando o efeito do inoculante comercial, composto pela mistura das duas estirpes de *A. brasilense* Ab-v5 e Ab-v6 recomendadas para a cultura do milho apresentou incremento de médio no rendimento de grãos em 13,21%, enquanto o estudo com uma nova mistura da estirpe Ab-V5 e a estirpe 53GRM1 de *Rhizobium* sp., uma estirpe isolada da rizosfera de milho e sem registro no MAPA, obteve incremento médio de 26,61% (SPOLAOR et al., 2016), ressaltando a importância de estudos contínuos para formulação de novos inoculantes. Nesse trabalho, no entanto o MIX só apresentou incremento superior a estirpe isolada em Cruz das Almas e redução de produtividade em Petrolina.

As respostas variam possivelmente em decorrência as condições edafoclimáticas que as bactérias tiveram que se adaptar, o que pode ter interferido, a princípio, na interação com as plantas (MAHENTHIRALINGAM et al., 2005).

O tratamento com a estirpe autorizada de *A. brasiliense* (Ab-V5) apresentou resposta positiva em todos os experimentos. Isto também foi relatado por Costa et al. (2015) para os componentes de produção da cultura do milho. O resultado do presente estudo também comprova a eficiência da estirpe em regiões semiáridas, corroborando o estudo conduzido por Sampaio (2013) que observou incrementos de

produção da cultura do milho inoculado com *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) e *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11417) sob condições irrigadas em Juazeiro, BA. Também é relatado na literatura que a inoculação de *Azospirillum* proporciona incrementos de 7 a 15% para MPAS e produtividade, respectivamente, nas duas safras de grãos de milho, sob plantio convencional e plantio direto, mesmo sem a adição de N (LANA et al., 2012). É provável que bactérias do gênero *Azospirillum* utilizem N oriundo da adubação nitrogenada para assimilar carbono e multiplicar-se mais rapidamente, incrementando os efeitos da inoculação.

Com a adubação nitrogenada na dose total representou as melhores respostas nos componentes de produção do milho, em todos os locais. Porém, o uso das novas estirpes de bactérias diazotróficas demonstrou expressivos aumentos na produtividade, pois proporcionaram médias equivalentes à testemunha recomendada (Ab-V5) e nitrogenada com 50% do recomendado para a cultura. Assim, os resultados encontrados nesse estudo são promissores quanto ao uso de inoculantes.

Vale salientar que os valores encontrados nesse estudo foram do efeito isolado de cada tratamento. Estudos com uso do inoculante em gramíneas não buscam substituir o uso total do fertilizante nitrogenado, mas obter um maior aproveitamento no manejo da cultura, de forma a agir em consórcio com o N-mineral para alcançar maior promoção de crescimento e rendimento na cultura, como relatado por Muller et al. (2016) e Repker et al. (2013).

O resultado obtido faz com que se intensifiquem as buscas por novas alternativas que visem melhor aproveitamento do N, a fim de alcançar maior aplicabilidade dessa tecnologia para diversos agricultores, principalmente em regiões onde o risco climático é alto.

6. CONCLUSÃO

A estirpe DBG7 (*Paenibacillus* sp.) isolada do semiárido brasileiro foi responsável por promover maior produtividade de grãos para a cultura do milho, em três locais com diferentes condições climáticas da Região Nordeste, avaliados em única safra de 2017 apresentando rendimentos equivalente à nitrogenada com 50% e a recomendada (Ab-V5). O incremento proporcionado sobre a testemunha absoluta variou entre 14 a 33%, o que representou em valores um aumento de 744 a

1.313 kg ha⁻¹, ou seja, de 12 a 21 sacas a mais por hectare cultivado, sugerindo a aplicabilidade da inoculação.

Esse resultado revela possibilidade de exploração para produção de novos inoculantes que venham substituir pela metade a utilização de fertilizantes nitrogenados e aumentar a oferta com a comercial.

REFERÊNCIAS

- ALVES, G. C.; VIDEIRA, S. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. **Plant and Soil**, v. 387, n.1-2, p. 307-321, 2015.
- ALVES, G. C.; MATOS MACEDO, A. V. DE; REIS, F. B. DOS; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Plant growth promotion by four species of the genus *Burkholderia*. **Plant and Soil**, v. 399, n. 1-2, p. 373-387, 2016.
- BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; VIDEIRA, S. S.; BODDEY, L. H.; BALDANI, V. L. D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**, v. 384, n. 1-2, p. 413-431, 2014.
- BENEDUZI, A.; PERES, D.; VARGAS, L. K.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; PASSAGLIA, L. M. P. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 39, n. 3, p. 311-320, 2008.
- BRASIL. **Diário oficial**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 13, de 24 de março de 2011.
- BURBANO, C. S.; LIU, Y.; RÖSNER, K. L.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. et al. Predominant nifH transcript phylotypes related to *Rhizobium rosettiformans* in field-grown sugarcane plants and in Norway spruce. **Environmental Microbiology Reports**, v. 3, p. 383-389, 2011.
- CAVAGLIERI, L.; ORLANDO, J.; RODRÍGUES, M. I.; CHULZE, S.; ETCHEVERRY, M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* *in vitro* and at the maize root level. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 748-754, 2005.
- CAVALCANTI, F. J. de A. Recomendações de adubação para o Estado de Pernambuco: segunda aproximação. **Instituto Agrônomo de Pernambuco**, Recife, p. 212, 2008.
- CAVALCANTI, M.I.P. Seleção de bactérias promotoras de crescimento em milho cultivado no Semiárido obtidas por diferentes estratégias de isolamento. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, p. 96. 2016.
- CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos safra 2016/2017 - Nono levantamento**, Brasília, v. 4, p. 1-161, jun. 2017.

- COSTA, R. R. G. F.; QUIRINO, G. DA S. F.; NAVES, D. C. DE F.; SANTOS, C. B.; ROCHA, A. F. DE S. Efficiency of inoculant with *Azospirillum brasilense* on the growth and yield of second-harvest maize. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 3, p. 304-311, 2015.
- ELANCHEZHIAN, K.; KEERTHANA, U.; NAGENDRAN, K.; PRABHUKARTHIKEYAN, S. R.; RAGUCHANDER, T.; KARTHIKEYAN, G. Multifaceted benefits of *Bacillus amyloliquefaciens* strain FBZ24 in the management of wilt disease in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 103, p. 92-101, 2018.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia Lavras**: Editora da Universidade Federal de Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FERREIRA, A. S.; PIRES, R. R.; RABELO, P. G.; OLIVEIRA, R. C.; LUZ, J. M. Q.; BRITO, C. H. Implications of *Azospirillum brasilense* inoculation and nutrient addition on maize in soils of the Brazilian Cerrado under greenhouse and field conditions. **Applied Soil Ecology**, v. 72, p. 103-108, 2013.
- JOHNSTON-MONJE, D., LUNDBERG, D.S., LAZAROVITS, G., REIS, V.M., RAIZADA, M.N., Bacterial populations in juvenile maize rhizospheres originate from both seed and soil. **Plant and Soil**, v. 405, n. 1-2, p.337–355, 2016.
- HO, Y.; MATHEW, D. C.; HSIAO, S.; SHIH, C.; CHIEN, M. et al. Selection and application of endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain F3B for improving phytoremediation of phenolic pollutants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 219-220, p. 43-49, 2012.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1, p. 413-425, 2010.
- LANA, M.C.; DARTORA, J.; MARINI, D.; HANN, J.E. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Revista Ceres**, v. 59, n. 3, p. 399-405, 2012.
- MAHENTHIRALINGAM, E.; URBAN, T. A.; GOLDBERG, J. B. O multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 144-156, 2005.
- MIGUEL, P. S. B.; OLIVEIRA, M. N. V. DE; DELVAUX, J. C.; JESUS, G. L. DE; BORGES, A. C. et al. Diversity and distribution of the endophytic bacterial community at different stages of *Eucalyptus* growth. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 109, p. 755-771, 2016.
- MONTESINO, E.; BONATERRA, A. Microbial Pesticides. In: **Encyclopedia of Microbiology**, ed. Elsevier, p. 110-120, 2009.
- MÜLLER, T. M.; SANDINI, I. E.; RODRIGUES, J. D.; NOVAKOWISKI, J. H.; BASI, S.; KAMINSKI, T. H. Combination of inoculation methods of *Azospirillum brasilense* with broadcasting of nitrogen fertilizer increases corn yield. **Ciência Rural**, v. 46, n. 2, p. 210–215, 2016.
- OKUMURA, R. S.; MARIANO, D. C.; ZACCHEO, P. V. C. Uso de fertilizante nitrogenado na cultura do milho: uma revisão. **Revista Brasileira de Tecnologia**

Aplicada nas Ciências Agrárias, v. 4, n. 2, p. 226-244, 2011.

REIS, V. M. Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas. **Embrapa Agrobiologia - Documentos 232**, p. 22, 2007.

REPKE, R. A.; CRUZ, S. J. S.; SILVA, C. J.; FIGUEIREDO, P. G.; BICUDO, S. J. Eficiência da *Azospirillum brasiliense* combinada com doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 12, p. 214-226, 2013.

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T.; ALVAREZ, V. H. Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes 1999 em Minas Gerais - **5ª Aproximação**. Viçosa, MG, p. 359, 1999.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA, J.R.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Suma Phytopathologica*, v. 12, p. 16, 1986.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p. 279, 2001.

SAMPAIO, A. A. Contribuição de bactérias diazotróficas para o desenvolvimento vegetativo e produção de milho na região do Submédio São Francisco. **Dissertação de Mestrado**. Universidade do Estado da Bahia, Juazeiro, p. 71, 2013.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v. 111, n.5, p. 105-130, 2013.

SANTOS, A. A.; SILVEIRA, J. A. G.; BONIFACIO, A.; RODRIGUES, A. C.; FIGUEREDO, M. V. B. Antioxidant response of cowpea co-inoculated with plant growth-promoting bacteria under salt stress. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 513-521, 2018.

SANTOS, C. L. R.; ALVES, G. C.; MACEDO, A. V. M.; GIORI, F. G.; PEREIRA, W. et al. Contribution of a mixed inoculant containing strains of *Burkholderia* spp. and ssp. to the growth of three sorghum genotypes under increased nitrogen fertilization levels. **Applied Soil Ecology**, v. 113, p. 96-106, 2017.

SCHULTZ, N.; SILVA, J. A.; SOUZA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; OLIVEIRA, R. P. et al. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 2, p. 407-414, 2014.

SILVEIRA, A. P. D.; SALA, V. M. R.; CARDOSO, E. J. B. N.; LABANCA, E. G.; CIPRIANO, M. A. P. Nitrogen metabolism and growth of wheat plant under diazotrophic endophytic bacteria inoculation. **Applied Soil Ecology**, v. 107, p. 313-319, 2016.

SPOLAOR, L. T.; GONÇALVES, L. S. A.; SANTOS, O. J. A. P.; OLIVEIRA, A. L. M.; SCAPIM, C. A. Plant growth-promoting bacteria associated with nitrogen fertilization at topdressing in popcorn agronomic performance. **Bragantia**, v. 75, n. 1, p. 33-34, 2016.

VIDEIRA S. S.; SILVA, M. C. P.; GALISA, P. S.; DIAS, A. C. F.; NISSINEN, R. et al. Culture-independent molecular approaches reveal a mostly unknown high diversity of active nitrogen-fixing bacteria associated with *Pennisetum purpureum* - a bioenergy crop. **Plant Soil**, v. 373, p. 737-754, 2013.

WEISBURG, W.G.; BAMS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S Ribosomal DNA Amplification, for Phylogenetic Study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 697-703, 1991.

YOON, S. H.; HA, S. M.; KWON, S.; LIM, J.; SEO, H.; CHUN, J. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, p. 1613-1617, 2017.

ZHANG, J.; LI, Y.; YUAN, H.; SUN, B.; LI, H.; Biological control of the cereal cyst nematode (*Heterodera filipjevi*) by *Achromobacter xylosoxidans* isolate 09 x 01 and *Bacillus cereus* isolate 09B18. **Biological Control**. v. 92, p. 1-6, 2016.