

Uso de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio como Inoculante para Aplicação em Gramíneas



Sementes de milho híbrido HS5050 inoculado com inoculante turfoso contendo bactéria diazotrófica do gênero *Azospirillum*.

Foto: Marinete Flores da Silva



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1517-8498

Junho/2007

Documentos 232

Uso de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio como Inoculante para Aplicação em Gramíneas

Veronica Massena Reis

*Seropédica – RJ
2007*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridas na:

Embrapa Agrobiologia

BR465 – km 7

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 2682-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Comitê Local de Publicações: Eduardo F. C. Campello (Presidente)
José Guilherme Marinho Guerra
Maria Cristina Prata Neves
Verônica Massena Reis
Robert Michael Boddey
Maria Elizabeth Fernandes Correia
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente:

Revisores e/ou ad hoc: Gustavo Ribeiro Xavier e Luis Henrique de Barros Soares

Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Felix

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

1ª impressão (2007): 50 exemplares

R375u Reis, Veronica Massena

Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 22 p. (Documentos, Embrapa Agrobiologia. ISSN 1517-8498; 232).

1. Gramínea. 2. Bactéria. 3. Inoculante. I. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). II. Título. III. Série.

CDD 584.9

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane Nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 56, p. 105-114, 1992.

VANDE BROEK, A.; DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; VANDOMMELEN, A. *Azospirillum*-plant interactions: signaling and metabolic interactions. In: TRIPPLET, E. W. (Ed.). **Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process**. Wyomondham: Horizon Science, 2000. p. 761-777.

VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. The genetics of the *Azospirillum*-plant root association. **CRC Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v. 14, p. 445-466, 1995.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, Dodrecht, v. 255, p. 571-586, 2003.

WANI, S. P.; CHANDRAPALAIH, S.; DART, P. J. Responses of pearl millet cultivars to inoculation with nitrogen-fixing bacteria. **Experimental Agriculture**, Trinidad, v. 21, p. 175-182, 1985.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 487-511, 2001.

Autora

Veronica Massena Reis

Eng^a. Agrônoma, PhD em Ciência do Solo, Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia.
BR 465, km 7 – Caixa Postal 74505, Cep 23851-970, Seropédica/RJ
e-mail: veronica@cnpab.embrapa.br

PAREDES-CARDONA, E.; CARCANÓ-MONTIEL, M.; MASCARÚA-ESPARZA, M. A.; CABALLERO-MELLADO, J. Respuesta del maíz a la inoculación con *Azospirillum brasilense*. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, México, v. 30, p. 351-355, 1988.

PENOT, I.; BERGES, N.; GUIGUENÉ, C.; FAGES, J. Characterization of *Azospirillum* associated with maize (*Zea mays* L.) in France using biochemical tests and plasmid profiles. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, p. 798-803, 1992.

PEOPLES, M. B.; HERRIDGE, D. F.; LADHA, J. K. Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, p. 3-28, 1995.

PERSELLO-CARTINEAUX, F.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: molecular plant rhizobacteria interactions. **Plant Cell and Environment**, Oxon, v. 26, p. 189-199, 2003.

RAYMOND, J., SIEFERD, J. L.; STAPLES, C. R.; BLANKENSHIP, R. E. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 21, p. 541-554, 2004.

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

SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J.; SRINIVASAN, M. Rhizosphere bacterial signaling: a love parade beneath our feet. **Critical Review in Microbiology**, Boca Raton, v. 30, p. 205-240, 2004.

SUMNER, M. E. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. **Advances in Soil Sciences**, New York, v. 12, p. 54-123, 1990.

TAL, S.; OKON, Y. Production of the reserve material poly-beta-hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 31, p. 608-613, 1985.

JUNG, G.; MUGNIER, J.; DIEM, H. G.; DORMMERGUES, Y. R. Polymer-entrapped *Rhizobium* as an inoculant for legumes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 65, p. 219-232, 1982.

KAPULNIK, Y.; OKON, Y.; HENIS, Y. Yield response of spring wheat cultivars (*Triticum aestivum* and *T. turgidum*) to inoculation with *Azospirillum brasilense* under field conditions. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 4, p. 27-35, 1987.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKÉS, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, London, v. 36, p. 1229-1244, 2004.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Indoles-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, London, v. 8, p. 298-300, 2000.

LIN, W.; OKON, Y.; HARDY, R. W. F. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 45, p. 1775-1779, 1983.

LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B. R. Applications of free living plant growth promoting rhizobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 86, p. 1-25, 2004.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 26, p. 1591-1601, 1994.

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **ASM News**, Washington, v. 63, p. 364-370, 1997.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 242, p. 205-215, 2002.

Apresentação

A preocupação crescente da sociedade com a preservação e a conservação ambiental tem resultado na busca pelo setor produtivo de tecnologias para a implantação de sistemas de produção agrícola com enfoques ecológicos, rentáveis e socialmente justos. O enfoque agroecológico do empreendimento agrícola se orienta para o uso responsável dos recursos naturais (solo, água, fauna, flora, energia e minerais).

Dentro desse cenário, a Embrapa Agrobiologia orienta sua programação de P&D para o avanço de conhecimento e desenvolvimento de soluções tecnológicas para uma agricultura sustentável.

O documento 232/2007 vem de encontro a meta da Unidade de gerar pesquisas sobre o uso de bactérias diazotróficas para aplicação em gramíneas, com ênfase nas pesquisas realizadas com cana-de-açúcar, milho, arroz, trigo e sorgo. Neste documento são analisados os diversos tipos de produtos disponíveis no mercado como também o uso destes no mundo.

José Ivo Baldani
Chefe Geral da Embrapa Agrobiologia

SUMÁRIO

1. Introdução.....	7
2. Uso na agricultura.....	8
3. O inoculante	12
4. Considerações finais.....	16
5. Referências Bibliográficas	16

FAGES, J. *Azospirillum* inoculants and field experiments. In: OKON, Y. (Ed.). **Azospirillum/plant associations**. Boca Raton: CRC, 1994. p. 87-109.

FAGES, J.; MULARD, D. Isolement de bactéries rhizosphériques et effect de leur inoculation and pots chez *Zea mays*. **Agronomie**, Paris, v. 8, p. 309-315, 1988.

FALLIK, E.; OKON, Y. The response of maize (*Zea mays*) to *Azospirillum* inoculation in various types of soils in the field. **World Journal of Microbiology and Technology**, Oxford, v. 12, p. 511-515, 1996.

FALLIK, E.; OKON, Y.; EPSTEIN, E.; GOLDMAN, A.; FISHER, M. Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense* inoculated maize roots. **Soil Biology and Biochemistry**, London, v. 21, p. 147-153, 1988.

GADKARI, D.; MÖESDORF, G.; MEYER, O. Chemolithoautotrophic assimilation of dinitrogen by *Streptomyces thermoautotrophicus* UBT1: identification of an unusual N₂-fixation system. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 174, p. 6840-6843, 1992.

GARCIA DE SALOMONE, I. E.; DÖBEREINER, J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by ¹⁵N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 23, p. 249-256, 1996.

GUIMARÃES, S. L.; GRAÇA, C. O. da; SILVA, R. A. da; SANTOS, C. C. R. dos; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas na cultura de arroz sob condições de campo. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 23., REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 7., SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 5., REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 2., 1998, Caxambu. **Resumos...** Lavras, UFLA / SBCS / SBM, 1998. p. 791.

DIDONET, A. D.; RODRIGUES, O.; KENNER, M. H. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, p. 645-651, 1996.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHES, A.; TRYS, A.; PTACEK, D.; OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 36, p. 284-297, 2002.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHES, A.; TRYS, A.; PTACEK, D.; VANDERLEYDEN, J.; DUTTO, F.; LABANDERA-GONZALEZ, C.; CABALLERO-MELLADO, J.; AGUIRRE, J. F.; KAPULNIK, Y.; BRENER, S.; BURDMAN, S.; KADOURI, D.; SARIG, S.; OKON, Y. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, p. 871-879, 2001.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHES, A.; TRYS, A.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.212, p. 155-164, 1999.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W. E.; NYMAN, C. T. (Ed.). **Nitrogen Fixation**. Pullman: Washington State University, 1976. p. 518-538. v. 2.

DOMMELEN, VAN A.; KEIJERS, V.; VANDERLEYDEN, J.; DE ZAMAROCZY, M. (Methyl)ammonium transport in the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 180, p. 2652-2659, 1998

FAGES, J. An industrial view on *Azospirillum* inoculants: formulations and application technology. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, p. 15-26, 1992.

Uso de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio como Inoculante para Aplicação em Gramíneas

Veronica Massena Reis

1. Introdução

Dentre os problemas da agricultura brasileira, um dos principais refere-se ao avanço desordenado da fronteira agrícola, uso inadequado de sistemas de rotação de culturas e não aproveitamento de resíduos dos plantios anteriores. Todas estas práticas agrícolas denominadas de conservacionistas, ao longo do tempo podem levar a exaustão das reservas de nutrientes do solo, desde que o manejo não seja eficiente. Alternativas que permitam aumentar a eficiência do uso dos insumos, diminuir o tempo de mineralização dos nutrientes e também, aumentar o sistema radicular por aumento da área de absorção das raízes, podem atuar de forma conjunta no crescimento vegetal. Dessa forma, existe um grande interesse em práticas alternativas que visem a redução na aplicação de insumos ou mesmo da melhoria da absorção destes, nas áreas de produção agrícola. Dentre os vários processos biológicos que ocorrem na natureza, a fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) é realizada por um grupo restrito de bactérias denominadas diazotróficas.

Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) são benéficas às plantas e possuem a capacidade de colonizar as raízes e outros tecidos internos do vegetal, sem causar sintomas de doenças. Este estímulo ao crescimento se dá através de diferentes mecanismos, tais como a fixação biológica de nitrogênio e a produção de hormônios de crescimento como auxinas e giberelinas, que favorecem o crescimento vegetal principalmente das raízes e que atuam na maior absorção de nutrientes e água (PEOPLES et al., 1995; FALLIK et al., 1988; DOBBELAERE et al., 1999; LAMBRECHT et al., 2000; LIN et al., 1983). Além disto, podem agir como solubilizadores de fosfatos ou mesmo este grupo pode

acelerar processos biológicos como a mineralização (PERSELLO-CARTINEAUX et al., 2003). Também podem agir no crescimento vegetal de forma indireta, protegendo a planta de fungos patógenos do solo ou de bactérias patogênicas através de vários mecanismos como a produção de sideróforos, antibiose, chitinases e glucanases que podem lisar células bacterianas (WHIPPS, 2001). Vários gêneros são conhecidos como BPCV, tais como: *Azospirillum*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Serratia*, e mesmo os rizóbios são incluídos neste grupo (REIS et al., 2000; SOMERS et al., 2004). Estima-se que aproximadamente 5% das bactérias procarióticas carregam os genes responsáveis pelo processo biológico de fixação de nitrogênio (RAYMOND et al., 2004) sendo estes distribuídos nos cromossomos ou em plasmídeos. Novos sistemas fixadores também foram descritos como o caso da nitrogenase dependente da super-óxido dismutase em *Streptomyces thermoautotrophicus* (GADKARI et al., 1992), o que pode abrir um novo caminho de descobertas de espécies que o utilizam. Dentre estas, as do gênero *Azospirillum* principalmente a espécie *A. brasilense*, tem sido usada como inoculante em diversas culturas tais como: cereais, algodão, tomate, banana, cana-de-açúcar, café, forrageiras do gênero *Brachiaria*, etc (REIS et al., 2000). Produtos a base de *A. brasilense* tem sido preconizados para co-inoculação de soja, juntamente com *Bradyrhizobium* tanto na Argentina como na África do Sul. Dessa forma, existe um grande interesse em práticas alternativas, que visem à redução na aplicação de insumos (fertilizantes, etc) ou mesmo da melhoria da absorção destes, nas áreas de produção agrícolas.

2. Uso na agricultura

Mas o que é este inoculante: neste caso o produto refere-se à utilização de microrganismos vivos, capazes de promover o crescimento vegetal de forma direta ou indireta, através de diferentes mecanismos sendo denominados mundialmente de biofertilizantes, sendo que no Brasil o produto mais famoso é o inoculante para a soja, campeão de venda nesta categoria (estimativa em torno de 99% do mercado atual). Produtos que

BALDANI, V. L. D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** 1996. 234 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, p. 924-929, 1983.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 4, p. 37-40, 1987.

BODDEY, R. M.; POLIDORO, J. C.; REZENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Use of the ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to grasses and cereals. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, p. 889-895, 2001.

BOUTON, J. H.; ALBRECHT, S. L.; ZUBERER, D. A. Screening and selection of pearl millet for root associated bacterial nitrogen fixation. **Field Crop Researcher**, Amsterdam, v. 11, p. 131-139, 1985.

BURDMAN, S.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture. In: SUBBA RAO, N. S.; DOMMERGUES, Y. R. (Ed.). **Microbial interaction in agriculture and forestry**. Enfield: Science Publishers, 2000. V. 3. p. 229-250.

BURDMAN, S.; JURKEVITCH, E.; SCHWARTSBURD, B.; HAMPEL, M.; OKON, Y. Aggregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. **Microbiology**, New York, v. 144, p. 1989-1999, 1998.

CABALLERO-MELLADO, J.; CARCANO-MONTIEL, M.; MASCARUA-ESPARZA, M. A. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, p. 243-253, 1992.

4. Considerações finais

O maior obstáculo para a utilização desta tecnologia é a chamada “inconsistência” de resultados em experimentos de campo. Esta inconsistência está ligada a fatores tais como condições edafoclimáticas e a interações com a biota do solo. Estes mesmos dados inconsistentes são encontrados quando se avalia a inoculação de soja com *Rhizobium* ou mesmo para o feijão, amendoim etc. Estes dados também são observados quando se testa um novo pesticida. Os resultados de sucesso também estão ligados a fatores relacionados a bactéria tais como o número ideal de células por semente e a fisiologia desta célula. Outro fator que impede o sucesso maior está relacionado ao estabelecimento de um programa de seleção de estirpes que deve ser testado em vários locais e variedades, visando estabelecer as condições ideais de uso da tecnologia (experimentos em rede). Esta sintonia bactéria-hospedeiro pode indicar que algumas linhagens são mais receptivas do que outras e buscar neste material genético o diferencial de seleção para que possa ser incorporado em novos programas de melhoramento.

Entretanto, a utilização de bactérias que promovam o crescimento vegetal através de diversos mecanismos e que auxiliem na maior absorção de água e nutrientes, fixe nitrogênio do ar, atuem no controle biológico entre outros efeitos, não poderá ser descartado. Desenvolver um produto, baseado no conhecimento acumulado e no parque industrial já instalado no Brasil, só depende de um ajuste no processo tecnológico para que o produto gerado atenda as necessidades da agricultura.

5. Referências Bibliográficas

BALDANI, J. I.; CARUSO, L. V.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, London, v. 29, p. 911-922, 1997.

contém bactérias capazes de controlar patógenos são conhecidos como biopesticidas ou inseticidas biológicos (VESSEY, 2003).

Mas o que se tem disponível de tecnologia neste setor, que pode ser a base tecnológica para a venda de outros produtos? A história da FBN no Brasil teve grande impulso na década de 80, baseado nos estudos de inoculação com bactérias diazotróficas, publicados pela Dra Johanna Döbereiner e colaboradores (DÖBEREINER & DAY, 1976). Estes estudos foram realizados principalmente com as bactérias do gênero *Azospirillum*, que eram as mais conhecidas naquela época, sendo a estirpe Cd pertencente à espécie *A. brasilense* a mais utilizada nos diversos estudos (VANDE BROEK & VANDERLEYDEN 1995; OKON & VANDERLEYDEN, 1997). Fazendo um balanço dos resultados de experimentos de inoculação com *Azospirillum*, verificou-se uma grande variabilidade nos resultados em culturas como o trigo, arroz, milho e sorgo, onde a média de incremento no rendimento das culturas estava em torno de 20 a 30%. SUMNER (1990) descreveu um levantamento de dados sobre a aplicação de estirpes de *Azospirillum* em cereais e observou que 32 ensaios apresentaram respostas positivas à inoculação enquanto que outros 7 (a maioria com trigo) mostraram resultados negativos na produção de grãos (dados do período de 1983 a 1985). De uma maneira geral, 60 a 70% dos experimentos citados por OKON & LABANDERA-GONZALEZ (1994), mostraram incrementos de produção com a inoculação, no entanto, somente 5-30% apresentaram respostas estatisticamente significativas. Esta variabilidade pode estar relacionada a várias fases do processo bem como ao limitado conhecimento sobre o potencial de uso destes organismos. Neste processo, um dos complicadores é a transferência do N fixado para a planta, que ocorre muito lentamente e apenas uma pequena parte torna-se disponível para o vegetal (DOMMELEN et al., 1998). DOBBELAERE et al. (2001) apresentam um sumário de experimentos envolvendo a inoculação de *Azospirillum* conduzidos na década de 90 em diversos países tais como: Israel, França, Bélgica, Argentina, Uruguai, México e África do Sul. Na Bélgica a inoculação de *A. brasilense* estirpe Sp245 e *A. irakense* KBC1 aumentaram a biomassa seca de plantas de trigo em 62 e 46% respectivamente ($P=0,05$). Outras revisões, mais

recentes, também apresentam resultados do uso destes produtos para a agricultura (BURDMAN et al., 2000; KENNEDY et al., 2004; LUCY et al., 2004). Mas sem dúvida, o maior esforço governamental para a utilização de inoculante para gramíneas foi feito no México. Os resultados mostraram incrementos da ordem de 26% em média na produção avaliando-se 171 locais de plantio em 678 ha. O maior efeito foi observado principalmente em locais onde o uso de fertilizante foi menor, em solos arenosos e usando cultivares domésticos. Este esforço foi desenvolvido pela Universidade Autônoma do México, vinculado à Secretaria de Desenvolvimento Rural, no Estado de Puebla e em 2002 produziu inoculante a base de *Azospirillum* para uso em 15.000 hectares de milho, trigo e cevada. Atualmente, a empresa ASIA (Assessoria Integral Agropecuária S.A.) no México, vende um produto para milho e sorgo e outro para trigo e cevada contendo uma mistura de estirpes de *Azospirillum brasilense*. Outras companhias na América do Sul também estão desenvolvendo produtos novos contendo *Azospirillum* como por exemplo a Lage & Co no Uruguai e a Nitrasoil e Nitragin na Argentina.

Outro fator ligado ao sucesso da inoculação refere-se à escolha da estirpe e o estágio fisiológico desta por ocasião da inoculação. Embora o termo especificidade hospedeira não seja usado para caracterizar estas associações, tem-se demonstrado que existe certa afinidade entre estirpes e cultivares (WANI et al., 1985) ou entre a bactéria e espécies de plantas (PENOT et al., 1992). Estudos mostrando que o genótipo da planta interfere na resposta à inoculação, foram demonstrados para trigo (KAPULNIK et al., 1987; CABALLERO-MELLADO et al., 1992), milho (GARCIA DE SALOMONE et al., 1996) e milheto (BOUTON et al., 1985). Usando a metodologia de diluição isotópica de ¹⁵N, URQUIAGA et al., (1992) mostraram claramente a diferença entre variedades de cana-de-açúcar quanto ao ganho de N derivado da FBN, embora neste caso as plantas não foram inoculadas (URQUIAGA et al., 1992).

Estudos prévios de seleção de estirpes mostraram que o uso de estirpes homólogas pode promover aumentos de produção, porém este conceito não tem sido aplicado com muita frequência nos trabalhos de inoculação de gramíneas a campo. BALDANI et al.

grãos (FAGES & MULARD, 1988). A companhia Soygro, na África do Sul, produziu de 1998 a 2001, um inoculante de *Azospirillum* para 150.000 ha de milho, 12.000 ha de trigo e experimentalmente para 500 ha de sorgo. Foi observado efeito de 10-30% sobre o controle não inoculado durante 5 anos (1998-1999). Aproximadamente 15% da área de 150.000 ha de leguminosas foram co-inoculados com *Azospirillum brasilense* neste país (DOBBELAERE et al., 2001). No México, foi desenvolvido pela Universidade de Puebla, um inoculante a base de *Azospirillum*, denominado “Fertilizante para Milho”, que tem sido usado com sucesso visto a sua aplicação em 5.000 ha no ano de 1993 (OKON & LABANDERA-GONZALEZ, 1994). Na Índia, várias indústrias produzem biofertilizantes contendo *Azospirillum* tais como: “Manufacturers of Biofertilizers”, “Pro Solutions”, “Nikita Agro Industries”, “Madras Fertilizers Ltda” e “International Panacea Limited”, além de outros contendo *Gluconacetobacter* para cana-de-açúcar, solubilizadores de fosfato e micorrizas. A Argentina lançou produtos contendo *Azospirillum* produzidos pela EcoFértil que visam estimular o crescimento de raízes através de efeito hormonal. Além disto se recomenda também a inoculação de *A. brasilense* estirpe Sp7 para soja, junto com o *Bradyrhizobium*.

Diversos autores têm observado variações na resposta a inoculação com *Azospirillum* em função do tipo e forma de aplicação do inoculante. FALLIK & OKON (1996) por exemplo, obtiveram um aumento de 15% na produção de grãos de milho quando fizeram uso da turfa granulada em comparação com a pulverização no sulco e semente peletizada que aumentaram a produção em 11 e 3%, respectivamente. Já a pulverização pós-emergência das sementes, teve um efeito negativo de 2% na produção de grãos. BALDANI et al. (1983), também obtiveram um maior aumento na produção de grãos de trigo usando turfa granulada (35%) em comparação com inoculante oleoso (19%).

encapsulamento das células e só a liberam após a degradação do polímero, e assim previnem as células de estresses ambientais (JUNG et al., 1982). Este processo tem como desvantagem a necessidade de mão de obra especializada e, conseqüentemente, o custo é mais elevado.

Quanto a aplicação do inoculante, geralmente o produto é aplicado diretamente sobre a semente, com a ajuda de um adesivo. Outras formas também foram desenvolvidas como a peletização, uso de inoculante líquido, granulado, etc.

Diversos autores têm observado variações na resposta a inoculação com *Azospirillum* em função do tipo e forma de aplicação do inoculante. FALLIK & OKON (1996) por exemplo, obtiveram um aumento de 15% na produção de grãos de milho quando fizeram uso da turfa granulada em comparação com a pulverização no sulco e semente peletizada que aumentaram a produção em 11 e 3%, respectivamente. Já a pulverização pós-emergência das sementes, teve um efeito negativo de 2% na produção de grãos. BALDANI et al., (1983), também obtiveram um maior aumento na produção de grãos de trigo usando turfa granulada (35%) em comparação com inoculante oleoso (19%).

Inoculantes comerciais contendo *A. brasilense* foram lançados no mercado mundial. Nos Estados Unidos um produto com o nome de Azo-Green™ foi produzido pela companhia Gênese Turfs Forages e recomendado para aumentar o vigor da semente, estabelecimento do sistema radicular, resistência a geada e uma melhoria geral da saúde da planta. Na Itália, Alemanha e Bélgica foi desenvolvido um produto contendo uma mistura de *A. brasilense* (estirpe Cd) e *A. lipoferum* (estirpe Br17) comercializado na forma de mistura com vermiculita ou em forma líquida. O nome comercial do produto é Zea-Nit™, produzido pela companhia Heligenetics. Segundo os fabricantes, este produto reduziria em 30 a 40% a aplicação do nitrogênio necessário à cultura. Na França foi lançado um produto outro produto a base de *Azospirillum* contendo a estirpe CRT1 e produzido pela indústria Liphá. O uso deste inoculante, em um experimento com milho na Estação de Agbasar, no nordeste de Togo, na África, promoveu o aumento de 100% na produção de

(1983; 1987) sugeriram que a superioridade da estirpe Sp 245 de *A. brasilense* nos estudos de inoculação em trigo deve estar relacionada com a seleção inicial e uso de estirpes homólogas. O estágio fisiológico da bactéria também pode influenciar a sobrevivência do inóculo.

A inoculação de *Azospirillum* na presença de pequenas doses de fertilizantes nitrogenados tem mostrado uma maior eficiência para o sistema planta/bactéria quando comparado com o uso isolado da bactéria. DIDONET et al. (1996), observaram que a produção de grãos de trigo inoculado com a estirpe JA04 de *A. brasilense*, e complementado com 15 kg de N ha⁻¹, não diferiu estatisticamente do tratamento controle que recebeu a adubação equivalente a 45 kg N ha⁻¹, feita em cobertura. DOBELAERE et al. (2002) observaram ganhos com a inoculação de *A. brasilense*, estirpe Sp 245 e *A. irakense*, estirpe KBC 1, em plantas de trigo (4 experimentos) e milho sob condições de casa de vegetação. O efeito da inoculação foi mais pronunciado na menor concentração de células (10⁵-10⁶ ufc planta⁻¹) estimulando o desenvolvimento radicular e a biomassa vegetal do trigo. Também foi observado que a dose de N mais baixa (150 mg planta⁻¹) e intermediária (250 mg planta⁻¹) foram responsáveis pelos maiores ganhos de massa de raiz, da planta e dos grãos além de uma maior eficiência da absorção de N pelas plantas de trigo. Já no caso do experimento de milho, o número de células não interferiu. Neste caso a estirpe KBC 1 obteve melhores resultados que a SP 245, ao inverso do trigo.

Examinando-se a literatura, observa-se que o número de trabalhos que investigaram a inoculação de *Azospirillum* em condições de campo diminuiu muito nos últimos 5 anos. O mesmo não se pode dizer quanto à descoberta de novas espécies de bactérias promotoras de crescimento, tais como *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *B. tropica*. Estas novas espécies possuem um modo de colonização diferente, já que são espécies consideradas endofíticas obrigatórias. Estas espécies podem colonizar o tecido interno das plantas sem causar sintomas de doenças e possuem baixa sobrevivência no solo (BALDANI et al., 1997). Alguns estudos de inoculação em arroz mostraram resultados promissores para a inoculação de plantas com estirpes

de *Herbaspirillum seropedicae* (aumentos de 17-19% do N derivado de FBN) e *Burkholderia* sp. (11 a 20%) em experimento de vasos (BALDANI, 1996). Já no campo, dependendo da variedade de arroz plantada, o incremento na produção pode chegar a 50% quando a inoculação é efetuada com estirpes selecionadas (GUIMARÃES et al., 1998).

OLIVEIRA et al. (2002) utilizaram uma mistura de estirpes dos gêneros inoculados em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar (*G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *Burkholderia* spp) e observaram que este tratamento foi superior aos demais tratamentos inoculados com um número menor de estirpes representativas de cada espécie. Os autores usaram a técnica de delta ¹⁵N (marcação natural do solo) e testaram 7 tipos de inoculante. Houve aumento significativo da biomassa seca total em relação ao controle não inoculado aos 200 e 400 dias após o plantio. Também foi quantificada a contribuição da FBN mostrando que a mistura obteve 29,2% do N via o processo biológico. Estudos recentes utilizando plantios comerciais de cana-de-açúcar foram usados para verificar a variabilidade dos ganhos de N via FBN utilizando a metodologia de abundância natural do ¹⁵N do solo. Os resultados mostraram que em 9 dos 11 sítios testados, ocorreram contribuições do N do ar que variaram de 25 a 60% do N assimilado (BODDEY et al., 2001).

3. O Inoculante

Das bactérias diazotróficas associativas, o gênero *Azospirillum* foi o mais usado para a produção de inoculantes comerciais ou experimentais para a agricultura (FAGES 1992, 1994) e estes resultados foram posteriormente apresentados por outros autores (CABALLERO-MELLADO et al., 1992; PAREDES-CARDONA et al., 1988). Dentre as várias características que um inoculante deve possuir podemos destacar: o estado fisiológico da célula; o número elevado de células no produto, o número de células por semente e a longevidade do produto (VANDE BROEK et al., 2000; OKON & LABANDERA-GONZALEZ, 1994).

Diversos estudos foram feitos no sentido de multiplicar células de forma a melhorar a sobrevivência da bactéria nos inoculantes (BURDMAN et al., 1998; FALLIK & OKON, 1996). Os estudos têm mostrado que o inoculante de *Azospirillum* pode apresentar uma queda no número de células abaixo de 10⁶ células por g de turfa (ou mL se for líquido) após quatro meses de estocagem. O ideal seria que este número se mantivesse em torno de 10⁹ células por grama de veículo (turfa ou líquido) por seis meses, sendo este tempo alcançado para o rizóbio nas mesmas condições de estocagem. Desta forma, estruturas de reserva podem ajudar a manter a viabilidade celular. Bactérias do gênero *Azospirillum* são capazes de acumular poli-β-hidroxibutirato (PHB), um material de reserva que permite às bactérias resistirem às condições de estresses ambientais (TAL & OKON, 1985). Esta substância pode acumular de forma diferenciada de acordo com o meio de cultivo utilizado e diversos estudos foram feitos para que a estirpe apresentasse um conteúdo elevado de PHB por ocasião do preparo do inoculante, visando maior longevidade celular (BURDMAN et al., 1998).

A competitividade com outras estirpes nativas ou mesmo outros componentes da microbiota do solo, pode prevenir a colonização radicular por bactérias usadas como inoculante, sendo este outro fator de importância para o sucesso da inoculação. De uma forma geral busca-se selecionar estirpes competitivas em condições de solo natural e utilizá-las em número elevado por ocasião da inoculação, permitindo que esta população introduzida seja favorecida em detrimento de outras indesejáveis e em menor número no solo.

O veículo de inoculação (sólido e líquido) é outro aspecto que deve ser considerado nos experimentos de inoculação em gramíneas. O substrato sólido mais usado é a turfa esterilizada, baseado no conhecimento já adquirido com o inoculante desenvolvido para rizóbio e também devido ao seu baixo custo. A mesma pode ser usada pura, na forma de pó ou granulada, e em mistura com argilas (vermiculita) ou com carvão. No caso dos inoculantes líquidos, tem-se feito uso de óleo mineral (década de 80-90) e de polímeros como, por exemplo, o alginato e a goma xantana que promovem o