



**VÍCTOR ÁLEF RODRIGUES**

**EFEITOS DA INOCULAÇÃO DE *Bacillus* SOLUBILIZADORES DE FOSFATO SOBRE A MORFOLOGIA E PRODUTIVIDADE DE MILHO**

**Sete Lagoas-MG  
2024**

**VÍCTOR ÁLEF RODRIGUES**

**EFEITOS DA INOCULAÇÃO DE *Bacillus* SOLUBILIZADORES DE FOSFATO SOBRE A MORFOLOGIA E PRODUTIVIDADE DE MILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, da Universidade Federal de São João del-Rei, *Campus* Sete Lagoas, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias, na área de concentração em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. André Thomazini  
Coorientadora: Dr.<sup>a</sup> Christiane Abreu de Oliveira Paiva  
Coorientador: Dr. Daniel Bini

**Sete Lagoas-MG  
2024**

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)  
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF)  
da UFSJ, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R696e

Rodrigues, Victor Alef . Efeitos da inoculação de *bacillus* solubilizadores de fosfato sobre a morfologia e produtividade de milho / Victor Alef Rodrigues ; orientador André Thomazini; coorientadora Christiane Abreu de Oliveira Paiva; Daniel Bini. -- Sete Lagoas, 2024.

73 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias) -- Universidade Federal de São João del-Rei, 2024.

1. Zea mays L - adubação fosfatada. 2. Zea mays L biofertilizantes. 3. Zea mays L - Bioinsumos. I. Thomazini, André , orient. II. Paiva; Daniel Bini, Christiane Abreu de Oliveira, co-orient. III. Título.

**VÍCTOR ÁLEF RODRIGUES**

**EFEITOS DA INOCULAÇÃO DE *Bacillus* SOLUBILIZADORES DE FOSFATO SOBRE A MORFOLOGIA E PRODUTIVIDADE DE MILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, da Universidade Federal de São João del-Rei, *Campus* Sete Lagoas, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias, na área de concentração em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. André Thomazini  
Coorientadora: Dr.<sup>a</sup> Christiane Abreu de Oliveira Paiva  
Coorientador: Dr. Daniel Bini

Sete Lagoas, 29 de agosto de 2024.

Banca examinadora:

Dr. Ubiraci Gomes de Paula Lana - Embrapa

Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel - UFSJ/Embrapa

Documento assinado digitalmente  
 ANDRE THOMAZINI  
Data: 17/01/2025 14:45:26-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. André Thomazini - UFSJ  
Orientador

*“A agricultura não é apenas uma ciência, mas também uma arte”.*  
(John Locke)

*Dedico a Deus, por proporcionar-me discernimento e capacidade para realização desta pesquisa, e à minha família, pelo apoio incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar presente, me abençoando e guiando meus passos.

Aos meus pais, Joana e Nilton, por terem me incentivado e me proporcionarem a chance de estudar, mesmo diante das dificuldades. Em especial, à minha mãe, por ter sido a primeira pessoa a me alfabetizar, ensinando-me a ler e a escrever.

Aos meus irmãos, pelo apoio incondicional.

Ao meu primo, Vaudeci Geraldo de Oliveira, e à sua esposa, Maria Angelina da Silva Oliveira, que são como meus pais, por me acolherem, dando-me a oportunidade de realização do curso de Mestrado; e também aos seus filhos, Jonas Ribeiro de Oliveira Neto e Gabriel Henrique Silva Oliveira, que são como meus irmãos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Thomazini, pelo suporte concedido e pela orientação do desenvolvimento à conclusão desta pesquisa.

À Dr.<sup>a</sup> Christiane Abreu de Oliveira Paiva, minha coorientadora, pela contribuição para realização dessa pesquisa, por todas as oportunidades incríveis de aprendizado, por todo carinho, pela atenção e pela paciência.

Ao Dr. Daniel Bini, meu coorientador, pelo auxílio durante todo percurso e execução da pesquisa.

Ao Dr. Ivanildo Evódio Marriel, por todo apoio e conhecimento fornecidos ao longo da minha permanência no laboratório.

À Fabiane, analista do laboratório, pela assistência e pela dedicação nas atividades desenvolvidas.

À toda equipe do laboratório, em especial à Fernanda de Cássia Batista, pela colaboração, pelos ensinamentos repassados, ao longo do desenvolvimento meu trabalho.

Ao pessoal de campo, Dênio e Reinaldo, por acompanharem todos os meus experimentos de campo e também pelos ensinamentos técnicos e práticos.

À Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias (PPGCA), pela oportunidade de realização desse curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Milho e Sorgo, pela estrutura fornecida.

À equipe do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo, pela colaboração.

A todos (as) que contribuíram, de forma direta ou indireta, para que este trabalho se tornasse possível.

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	I
GENERAL SUMMARY.....	II
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	14
2. REFERÊNCIAS .....	16
CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Bacillus</i> NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE MILHO: ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO RADICULAR E PARTE AÉREA.....	18
RESUMO .....	18
ABSTRACT .....	19
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	21
2.1 Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs).....	21
2.2 Gênero <i>Bacillus</i> e os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSP) .....	22
2.3 Mecanismos de promoção de crescimento de plantas (MPCPs).....	24
2.4 Mecanismos diretos .....	24
2.5 Mecanismos indiretos .....	26
2.6 Benefícios da inoculação das BPCPs aplicadas na agricultura .....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 Cepas de <i>Bacillus</i> .....	28
3.2 Teste de compatibilidade .....	29
3.3 Produção de sideróforos .....	30
3.4 Produção de ácido acético indol (AIA) .....	30
3.5 Produção de exopolissacarídeos (EPS).....	31
3.6 Produção de biofilme .....	31
3.7 Influência da inoculação de <i>Bacillus</i> sobre a morfologia radicular e a parte aérea de plântulas de milho .....	32
3.8 Análise estatística.....	32

4. RESULTADOS .....	33
4.1 Teste de compatibilidade .....	33
4.2 Produção de sideróforos .....	33
4.3 Produção de ácido indol acético (AIA) .....	34
4.4 Produção de exopolissacarídeos (EPS).....	34
4.5 Produção de biofilme.....	34
4.6 Influência da inoculação de <i>Bacillus</i> sobre a morfologia de plântulas de milho .....	34
5. DISCUSSÃO .....	37
6. CONCLUSÃO.....	40
7. REFERÊNCIAS .....	41
CAPÍTULO II - EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DA INOCULAÇÃO SIMPLES E MISTA DE <i>Bacillus sp.</i> SOBRE A PRODUTIVIDADE DE MILHO EM CAMPO.....	51
RESUMO .....	51
ABSTRACT .....	52
1. INTRODUÇÃO.....	53
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	55
2.1 Classificação botânica do milho ( <i>Zea mays</i> L.).....	55
2.2 Importância econômica.....	55
2.3 A cultura do milho e a demanda por fertilizantes fosfatados .....	56
2.4 Fósforo no solo .....	57
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
3.1 Cepas de <i>Bacillus</i> .....	58
3.2 Descrição das áreas experimentais .....	59
3.3 Delineamento experimental .....	60
3.4 Preparo e aplicação dos inoculantes .....	61
3.5 Características agronômicas avaliadas .....	62
3.6 Análise estatística.....	62

4. RESULTADOS .....	62
4.1 Produtividade de grãos de milho .....	62
5. DISCUSSÃO .....	64
6. CONCLUSÃO.....	66
7. REFÊNCIAS.....	67
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	73

## EFEITOS DA INOCULAÇÃO DE *Bacillus* SOLUBILIZADORES DE FOSFATO SOBRE A MORFOLOGIA E PRODUTIVIDADE DE MILHO

**RESUMO GERAL** – O uso de inoculantes microbianos à base de *Bacillus* se destaca como uma estratégia ecologicamente sustentável, favorecendo a disponibilização de nutrientes nos sistemas agrícolas. Isso resulta em melhorias no crescimento das plantas e no aumento da produtividade de diversas culturas, incluindo o milho (*Zea mays* L.). Este estudo teve como objetivo avaliar novas cepas de *Bacillus* quanto aos mecanismos envolvidos na promoção de crescimento de plantas, à compatibilidade entre si e à capacidade de estimular o desenvolvimento de plântulas de milho em hidroponia, além de aumentar a produtividade de milho em campo. Todas as cepas, testadas individualmente e provenientes do banco de microrganismos multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas/MG, demonstraram compatibilidade de crescimento em combinações e produziram sideróforos, AIA, EPS e biofilme, compostos fundamentais para a colonização microbiana e para a promoção do crescimento vegetal. Para avaliar a capacidade dessas cepas em promover o crescimento de plântulas de milho, o experimento em hidroponia incluiu nove tratamentos com quatro repetições: T1- (controle, não inoculado); T2- (BiomaPhos®); T3- (*B. thuringiensis* B116 + *B. megaterium* B119); T4- (*B. megaterium* B119 + *B. subtilis* B2084 + *B. thuringiensis* B116); T5- (*B. thuringiensis* B116); T6- (*B. megaterium* B2106), T7- (*B. subtilis* B1719); T8- (*B. subtilis* B1716) e T9- (*B. megaterium* B1734). A inoculação com os tratamentos T3, T4 e T5 resultou em maior comprimento médio de raiz em comparação aos controles T1 e T2. Os tratamentos T3, T5 e T9 apresentaram maior área superficial média de raiz, superando o controle T1. O tratamento T4 apresentou um incremento na área superficial de raízes com diâmetro entre 1 e 4,5 mm, em relação ao controle e aos demais tratamentos, evidenciando que as cepas foram capazes de remodelar e de favorecer o desenvolvimento do sistema radicular do milho. Os experimentos com a inoculação dos microrganismos nas sementes de milho em condições de campo foram conduzidos em duas áreas distintas: Sete Lagoas/MG e Santo Antônio de Goiás/GO. Foram avaliados 11 tratamentos com três repetições cada, sendo T1- sem aplicação de  $P_2O_5$  T2- dose de ( $50 \text{ kg ha}^{-1}$ ) e T3- dose de ( $100 \text{ kg ha}^{-1}$ ). Os demais tratamentos foram avaliados com adição de inoculantes mais  $50 \text{ kg ha}^{-1} P_2O_5$ , sendo T4- BiomaPhos®, T5- B119 + B2084 + B116, T6- B2106, T7- B1719, T8- B1716, T9- B1733, T10- B1734, T11- B116. Observou-se diferenças significativas para a produtividade em ambas as regiões, destacando-se em Sete Lagoas, os tratamentos T6 ( $8.129,26 \text{ kg há}$ ), T11 ( $7.902,14 \text{ kg ha}^{-1}$ ) e T10 ( $7.774,77 \text{ kg ha}^{-1}$ ), que superaram o controle T2 ( $6.729,45 \text{ kg ha}^{-1}$ ), promovendo incrementos de produtividade de até 12% em relação ao tratamento com  $100 \text{ kg ha}^{-1}$  de  $P_2O_5$ . Em Santo Antônio de Goiás, os tratamentos com inoculantes, exceto T7, apresentaram produtividade similar ao tratamento com  $100 \text{ kg ha}^{-1}$  de  $P_2O_5$ . Dessa forma, conclui-se que as cepas testadas demonstraram diversos mecanismos de promoção de crescimento de plantas, com destaque para as cepas B2106, B116 e B1734, que se mostraram eficazes na promoção do crescimento do milho em campo.

**Palavras Chaves:** *Zea mays* L. Bioinsumos. Inoculantes. Milho.

Comitê orientador: Prof. Dr. André Thomazini (orientador); Dr.<sup>a</sup> Christiane Abreu de Oliveira Paiva (coorientadora); Dr. Daniel Bini (coorientador).

## EFFECTS OF INOCULATION OF *Bacillus* PHOSPHATE SOLUBILIZING ON CORN MORPHOLOGY AND YIELD

**GENERAL SUMMARY** - The use of *Bacillus*-based microbial inoculants stands out as an ecologically sustainable strategy, favoring the availability of nutrients in agricultural systems. This results in improvements in plant growth and increased yields of several crops, including maize (*Zea mays* L.). This study aimed to evaluate new strains of *Bacillus* regarding the mechanisms involved in promoting plant growth, compatibility with each other and the ability to stimulate the development of maize seedlings in hydroponics, in addition to increasing maize yield in the field. All strains, tested individually and from the bank of multifunctional microorganisms of Embrapa Maize and Sorghum, Sete Lagoas/MG, demonstrated growth compatibility in combinations and produced siderophores, EIA, EPS and biofilm, fundamental compounds for microbial colonization and for the promotion of plant growth. To evaluate the ability of these strains to promote the growth of corn seedlings, the hydroponics experiment included nine treatments with four replications: T1- (control, not inoculated); T2- (BiomaPhos®); T3- (*B. thuringiensis* B116 + *B. megaterium* B119); T4- (*B. megaterium* B119 + *B. subtilis* B2084 + *B. thuringiensis* B116); T5- (*B. thuringiensis* B116); T6- (*B. megaterium* B2106); T7- (*B. subtilis* B1719); T8- (*B. subtilis* B1716) and T9- (*B. megaterium* B1734). Inoculation with treatments T3, T4 and T5 resulted in higher average root length compared to controls T1 and T2. The treatments T3, T5 and T9 showed the highest average root surface area, surpassing the T1 control. The T4 treatment showed an increase in the surface area of roots with diameter between 1 and 4.5 mm, in relation to the control and the other treatments, showing that the strains were able to remodel and favor the development of the maize root system. The experiments with the inoculation of microorganisms in maize seeds under field conditions were conducted in two different areas: Sete Lagoas/MG and Santo Antônio de Goiás/GO. A total of 11 treatments were evaluated with three replications each, being T1- without application of P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, T2- dose of (50 kg ha<sup>-1</sup>) and T3- dose of (100 kg ha<sup>-1</sup>). The other treatments were evaluated with the addition of inoculants plus 50 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, being T4- BiomaPhos®, T5- B119 + B2084 + B116, T6- B2106, T7- B1719, T8- B1716, T9- B1733, T10- B1734, T11- B116. Significant differences were observed for productivity in both regions, with T6 (8,129.26 kg ha<sup>-1</sup>), T11 (7,902.14 kg ha<sup>-1</sup>) and T10 (7,774.77 kg ha<sup>-1</sup>) treatments standing out in Sete Lagoas, which exceeded the T2 control (6,729.45 kg ha<sup>-1</sup>), promoting productivity increases of up to 12% in relation to the treatment with 100 kg ha<sup>-1</sup> of P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. In Santo Antônio de Goiás, the treatments with inoculants, except T7, showed productivity similar to the treatment with 100 kg ha<sup>-1</sup> of P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Thus, it is concluded that the strains tested demonstrated several mechanisms of plant growth promotion, with emphasis on the strains B2106, B116 and B1734, which proved to be effective in promoting corn growth in the field.

**Keywords:** *Zea mays* L. Bioinputs. Inoculants. Corn.

Comitê orientador: Prof. Dr. André Thomazini (orientador); Dr.<sup>a</sup> Christiane Abreu de Oliveira Paiva (coorientadora); Dr. Daniel Bini (coorientador).

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais importantes para agricultura global. Os Estados Unidos, a China e o Brasil são os principais produtores desse grão (COÊLHO, 2023), responsáveis por aproximadamente 65% da produção global na safra atual (2023/24), que totaliza 1,22 bilhões de toneladas (USDA, 2024).

No Brasil, a cultura do milho é caracterizada por sua presença abrangente em todo o território nacional, adaptando-se à diversas condições geográficas e climáticas. Essa ampla distribuição destaca a capacidade de adaptação do milho, tornando-o uma peça fundamental nas atividades agrícolas do país (EMBRAPA, 2021). Porém, para atender à demanda crescente na produção de grãos, é fundamental adotar boas práticas de manejo, com especial atenção ao manejo da adubação, particularmente no que diz respeito ao fósforo (P). Visto que, os solos brasileiros, como os do cerrado, possuem capacidade em fixar P e torná-lo indisponível às plantas, onerando ainda mais o custo de produção, devido ao aumento das quantidades de fertilizantes fosfatados que devem ser aplicados. A indisponibilidade desse nutriente para as plantas ocasiona alterações metabólicas, prejudicando o fluxo energético e consequentemente, a produtividade (RIBEIRO et al., 2018).

A importância desse nutriente é crucial para otimizar a produtividade agrícola. Contudo, a dependência de cerca de 50% dos fertilizantes fosfatados do mercado externo, expõe o agronegócio brasileiro à vulnerabilidades, comprometendo sua sustentabilidade e sua competitividade global (GLOBALFERT, 2022).

Por consequência, vem-se adotando novos estudos com alternativas sustentáveis que possam contribuir na eficiência de uso dos fertilizantes pelas plantas (de OLIVEIRA-PAIVA et al., 2020b). Dentre eles, as bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs) têm sido considerada uma estratégia relevante em termos ambientais e econômicos, apresentando resultados de ganhos de produtividade e de massa vegetal em várias culturas como milho e soja (de OLIVEIRA-PAIVA et al., 2020a).

As Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCPs) promovem o crescimento das plantas por meio de uma variedade de mecanismos indiretos e diretos, incluindo fornecimento de compostos, água, aumento na aquisição de nutrientes específicos às plantas, proteção contra patógenos, estresses hídricos e estímulo ao crescimento radicular (O'CALLAGHAN et al., 2022).

Entre as BPCPs, existem vários gêneros com a capacidade de promoção de crescimento de plantas, tais como *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* (ELHAISSOUFI et al., 2022; SILVA et al., 2023). Dentre estes, o gênero *Bacillus* tem se destacado, como um grupo de bactérias Gram-positivas amplamente distribuídas no ambiente, sendo uma espécie que apresenta características fisiológicas, metabólicas e fenotípicas distintas, de grande impacto para agricultura (SHARF et al., 2021).

Esse gênero também expõe a capacidade de colonizar a rizosfera de gramíneas, solubilização de fosfato por liberação de ácidos orgânico e inorgânico e por extrusão de prótons, por mineralização de fosfato pela produção de enzimas (fosfatase) e por produção de fitohormônios e sideróforos (VELLOSO et al., 2020; SILVA et al., 2023). Além disso, esse grupo é caracterizado por células em forma de bastonetes, por formação de endósporos, por atividades anaeróbica, aeróbica ou facultativa (SETIAWATI et al., 2022). A formação de endósporos aumenta sua adaptação à várias condições abióticas, como temperaturas extremas, níveis de pH ou exposição à radiação (BIEDENDIECK et al., 2021). Isso confere eficiência de uso, baixo custo na elaboração de inoculantes e menor impacto ambiental (KALAYU, 2019; de OLIVEIRA et al., 2020a; de OLIVEIRA-PAIVA et al., 2024).

A busca por cepas eficientes são alvo de pesquisas constantes do laboratório de Microbiologia da Embrapa Milho e Sorgo/Sete Lagoas/MG, sendo que avanços foram conquistados com os estudos das cepas B119 (*Bacillus megaterium*) e B2084 (*Bacillus subtilis*), que compõem o primeiro inoculante comercial do país para solubilização de fosfato (RIBEIRO et al., 2018; de OLIVEIRA-PAIVA et al., 2020a; de OLIVEIRA-PAIVA et al., 2020b; de OLIVEIRA-PAIVA et al., 2024). Agora, novas buscas e estudos por outras bactérias, com potencial equivalente às cepas B119 e B2084, estão sendo realizados com o intuito de aumentar as possibilidades de forma a trazer melhorias às diversas culturas agrícolas.

Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar novas cepas de *Bacillus* quanto aos mecanismos envolvidos na promoção de crescimento de plantas, de capacidade de estimular o desenvolvimento de plântulas, bem como de aumentar a produtividade de milho.

## 2. REFERÊNCIAS

BIEDENDIECK, R. et al. The “beauty in the beast” - the multiple uses of *Priestia megaterium* in biotechnology. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 105, n. 14–15, p. 5719–5737, 2021. DOI: 10.1007/s00253-021-11424-6.

COÊLHO, J. D. Caderno setorial ETENE: Milho. Disponível em: <[https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/1895/1/2023\\_CDS\\_315.pdf](https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/1895/1/2023_CDS_315.pdf)>. 2023. Acesso em: 23 maio. 2024.

de OLIVEIRA, C. A. et. al. Recomendação agrônômica de cepas de *Bacillus subtilis* (CNPMS B2084) e *Bacillus megaterium* (CNPMS B119) na cultura do milho. **CIRCULAR TÉCNICA**, v. 260, p. 1-19, 2020a.

de OLIVEIRA, C. A. et. al. Viabilidade Técnica e Econômica do Biomaphos® (*Bacillus subtilis* CNPMS B2084 e *Bacillus megaterium* CNPMS B119) nas Culturas de Milho e Soja. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 210, p. 1-20, 2020b.

de OLIVEIRA-PAIVA, C. A. et al. Inoculation with *Bacillus megaterium* CNPMS B119 and *Bacillus subtilis* CNPMS B2084 improve P-acquisition and maize yield in Brazil. **Frontiers in microbiology**, v. 15, 2024. DOI:10.3389/fmicb.2024.1426166.

ELHAISSOUFI, W. et al. Phosphate bacterial solubilization: A key rhizosphere driving force enabling higher P use efficiency and crop productivity DOI: 10.1016/j.jare.2021.08.014. **Journal of advanced research**, v. 38, p. 13–28, 2022.

EMBRAPA. <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacaotecnologica/cultivos/milho/pre-producao/socioeconomica/importancia-socioeconomica>, 2021. Acesso em: 14 abr. 2023.

GLOBALFERT. <https://globalfert.com.br/boletins/principais-empresas-produtoras-de-fertilizantes-no-mundo-em-2022-globalfert.2022>. Acesso em: 10 de out. 2023.

**KALAYU, G.** Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. Microorganismos solubilizadores de fosfato: abordagem promissora como biofertilizante. Microorganismos solubilizadores de fosfato: enfoque prometedor como biofertilizantes. **International Journal of Agronomy**, v. 2019, 2019.

RIBEIRO, et al. As cepas de *Bacillus* endofíticos aumentam o crescimento do milho e a absorção de nutrientes sob baixo P. **Revista Brasileira de Microbiologia** [online]. 2018, v. 49, suppl 1(Acessado em 11 de junho de 2022), pp. 40-46. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.06.005>>. ISSN 1678-4405.

O'CALLAGHAN, M.; BALLARD, R. A.; WRIGHT, D. Soil microbial inoculants for sustainable agriculture: Limitations and opportunities. **Soil use and management**, v. 38, n. 3, p. 1340–1369, 2022. DOI:10.1111/sum.12811.

SETIAWATI, T. C. et al. Use of *Bacillus* as a plant growth-promoting rhizobacteria to improve phosphate and potassium availability in acidic and saline soils. **KnE life sciences**, 2022. DOI: 10.18502/kls.v7i3.11160.

SILVA, L. I. et al. Microrganismos solubilizadores de fósforo: uma chave para uma agricultura sustentável. **Agricultura**, v. 13, p. 1-30, 2023.

SHARF, W. et al. Induction of resistance in chili against *Sclerotium rolfsii* by plant-growth-promoting rhizobacteria and *Anagallis arvensis*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, n. 1, 2021. DOI: 10.1186/S41938-021-00364-Y.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Production, Supply and Distribution (PSD) on line. Disponível em:  
<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>. Acesso em: 15 mar. 2024a.

VELLOSO, C. C. V. et al. Genome-guided insights of tropical *Bacillus* strains efficient in maize growth promotion. **FEMS microbiology ecology**, v. 96, n. 9, 2020. DOI: 10.1093/femsec/fiaa157.

## CAPÍTULO I

### CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DE *Bacillus* NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE MILHO: ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO RADICULAR E PARTE AÉREA

**Resumo-** O uso de *Bacillus*, como inoculante, consiste numa estratégia para aumentar o crescimento das plantas e o rendimento das culturas nos sistemas agrícolas de forma mais sustentável. O objetivo desse estudo foi avaliar a compatibilidade entre cepas de *Bacillus* e a capacidade de produzir sideróforos, ácido indolacético (AIA), exopolissacarídeos (EPS), biofilme e seus efeitos na promoção do crescimento do milho em hidroponia. Os experimentos foram conduzidos com cepas pertencentes à Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo - Sete Lagoas/MG. Os tratamentos foram compostos por um controle negativo T1- (não inoculado); T2- inoculante comercial composto BiomaPhos<sup>®</sup>, composto por duas cepas *Bacillus megaterium* (B119) + *B. subtilis* (B2084); T3- *B. thuringiensis* (B116) + *B. megaterium* (B119); T4- *B. megaterium* (B119) + *B. subtilis* (B2084) + *B. thuringiensis* (B116); T5- *B. thuringiensis* (B116); T6- *B. megaterium* (B2106); T7- *B. subtilis* (B1719); T8- *B. subtilis* (B1716); T9- *B. megaterium* (B1734). Todas as cepas apresentaram sinergia entre si, produção de sideróforos do tipo carboxilato e produção significativa de AIA, de EPS e biofilme. Houve diferenças significativas entre os parâmetros de morfologia radicular, destacando-se o comprimento radicular total (CRT) e área superficial da raiz (AST) nos tratamentos T3, T4 e T5, que alcançaram o maior desenvolvimento e área radicular em comparação ao T1 (controle negativo sem inoculação) e T2 (controle positivo). Os tratamentos T3, T4, T5 e T9 apresentaram maior área superficial de raiz em relação ao controle não inoculado, semelhante ao inoculante comercial. Em relação ao peso seco da parte aérea, os tratamentos T3, T4, T5 e T8 foram significativamente superiores ao controle não inoculado. Assim, a utilização de cepas de *Bacillus*, como inoculantes, promove o crescimento das plântulas de milho em sistemas hidropônicos de maneira significativa. Todas as cepas demonstraram sinergia e capacidade de produzir compostos benéficos, como sideróforos, AIA, EPS e biofilme, que têm sido associadas com os principais mecanismos de promoção de crescimento de plantas. Os tratamentos com inoculação com as cepas B116 e dupla (B116 e B119) e tripla (B119, B2084 e B116) destacaram-se pelos aumentos significativos na área e comprimento radicular, além de melhorias na massa seca da parte aérea em comparação ao controle. Esses resultados reforçam o potencial dos *Bacillus* como bioinoculantes eficientes, oferecendo uma alternativa sustentável para aumentar a produtividade agrícola.

**Palavras-chave:** *Zea mays* L. Promoção de crescimento. Biofertilizantes.

## **IN VITRO CHARACTERIZATION OF *Bacillus* IN THE PROMOTION OF CORN SEEDLING GROWTH: ANALYSIS OF ROOT DEVELOPMENT AND SHOOT**

**Abstract-** The use of *Bacillus* as an inoculant is a strategy to increase plant growth and crop yields in agricultural systems in a more sustainable way. The objective of this study was to evaluate the compatibility between *Bacillus* strains and the ability to produce siderophores, indoleacetic acid (IAA), exopolysaccharides (EPS), biofilm and their effects on promoting corn growth in hydroponics. The experiments were conducted with strains belonging to the Collection of Multifunctional and Phytopathogenic Microorganisms of Embrapa Maize and Sorghum - Sete Lagoas/MG. The treatments were composed of a negative control T1- (not inoculated); T2- BiomaPhos® commercial inoculant compound, composed of two strains *Bacillus megaterium* (B119) + *B. subtilis* (B2084); T3- *B. thuringiensis* (B116) + *B. megaterium* (B119); T4- *B. megaterium* (B119) + *B. subtilis* (B2084) + *B. thuringiensis* (B116); T5- *B. thuringiensis* (B116); T6- *B. megaterium* (B2106); T7- *B. subtilis* (B1719); T8- *B. subtilis* (B1716); T9- *B. megaterium* (B1734). All strains showed synergy with each other, production of carboxylate-type siderophores and significant production of IAA, EPS and biofilm. There were significant differences between the root morphology parameters, especially total root length (CRT) and root surface area (AST) in treatments T3, T4 and T5, which achieved the highest development and root area compared to T1 (negative control without inoculation) and T2 (positive control). The treatments T3, T4, T5 and T9 showed higher root surface area compared to the non-inoculated control, similar to the commercial inoculant. Regarding shoot dry weight, the T3, T4, T5 and T8 treatments were significantly superior to the non-inoculated control. Thus, the use of *Bacillus* strains, as inoculants, promotes the growth of corn seedlings in hydroponic systems significantly. All strains have demonstrated synergy and the ability to produce beneficial compounds, such as siderophores, IAA, EPS, and biofilm, which have been associated with key plant growth promotion mechanisms. Treatments with inoculation with B116 and double (B116 and B119) and triple (B119, B2084 and B116) strains stood out for significant increases in root area and length, as well as improvements in shoot dry mass compared to control. These results reinforce the potential of *Bacillus* as efficient bioinoculants, offering a sustainable alternative to increase agricultural productivity.

**Keywords:** *Zea mays* L. Promotion of growth. Biofertilizers.

## 1. INTRODUÇÃO

O milho é um dos cereais mais produzidos, consumidos e exportados no mundo devido à sua aplicabilidade em alimentos, em rações e em indústrias de alta tecnologia (FAOSTAT, 2019). Além disso possui uma ampla variabilidade genética, o que possibilita seu cultivo em climas tropicais, subtropicais e temperados (SANTOS et al., 2019).

Os fertilizantes sintéticos estão entre os princípios básicos do manejo nutricional das grandes culturas agrícolas, e têm sido usados há décadas em todo o mundo para suprir a demanda de produção. Contudo, a sua utilização sistemática e descontrolada pode causar impactos ambientais negativos que vão desde efeito estufa, poluição das águas subterrâneas e superficiais, problemas de qualidade da água, desequilíbrio na microbiota do solo até impactos diretos à saúde humana (SCHINDLER e HECKY, 2009; RANA et al., 2020).

Os inoculantes microbianos são predominantemente, compostos por bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs), as quais são isoladas da endosfera e/ou rizosfera das plantas. Esses microrganismos podem ter a capacidade de disponibilizar nutrientes e reguladores de crescimento vegetal, como auxinas, giberelinas e citocininas. Tal estímulo pode resultar em um aumento no crescimento vegetativo e radicular (FUKAMI et al., 2017; SANTOS et al., 2019).

Entre as cepas bacterianas, particularmente conhecidas como BPCPs, estão os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSP), do gênero *Bacillus*, que apresentam grande versatilidade por promover o crescimento das plantas, por aumentar a produtividade, por solubilizar fosfato e potássio e por proteger as plantas contra patógenos e insetos-praga (WU et al., 2015; FERREIRA et al., 2019; PEREIRA et al., 2020). Esse gênero também pode produzir auxinas (AIA), fitormônios que desempenham um papel importante na regulação do desenvolvimento de raízes e promovem mudanças no crescimento vegetativo das plantas (WAGI & AHMED, 2019). De maneira geral, as BPCPs podem induzir ou inibir fatores primários de crescimento radicular, aumentar o número e/ou o comprimento das raízes laterais e alongar os pelos radiculares, o que aumenta a capacidade das plântulas de se sustentarem ao solo, melhora a aquisição de água e de nutrientes e, conseqüentemente, o crescimento das plantas (COMBES-MEYNET et al., 2011; CHAMAN et al., 2013; VACHERON et al., 2013).

Na literatura há pouca informação sobre a influência da inoculação de *Bacillus*, na arquitetura radicular do milho na fase de plântula (de SOUSA et al., 2021), incluindo o aumento do volume radicular e da ramificação, o que beneficia a planta um maior acesso aos nutrientes do solo e a da água, principalmente em estágios iniciais de desenvolvimento, como já demonstrado para outros gêneros de bactérias, como *Azospirillum* (CÁSSAN & DIAZ-

ZORITA, 2016). No milho, o sistema radicular é compreendido de raízes nodais e laterais, sendo que a maior parte do seu desenvolvimento é controlado por sinais ambientais e intrínsecos, nos quais os fitormônios são elementos-chave para sua regulação (DEPUYDT & HARDTKE, 2011; GARAY-ARROYO et al., 2012; VANSTRAELEN & BENKOVÁ, 2012).

A análise detalhada das possíveis modificações na morfologia radicular em plantas de milho inoculadas, pode ser realizada por meio de sistemas de fenotipagem por imagem. Isso é especialmente relevante, uma vez que o crescimento radicular é um dos principais benefícios das BPCPs. Compreender como as características morfológicas das raízes mudam após a inoculação é crucial para entender o modo de ação e facilitar o monitoramento das linhagens que colonizam as raízes e verificar, nos estágios iniciais do crescimento do milho, se as linhagens são benéficas as plantas (de SOUSA et al., 2021).

Nesse estudo o objetivo foi caracterizar os mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal relacionados com a produção de sideróforos, de ácido indo acético (AIA), de exopolissacarídeos (EPS), de biofilme e com teste de compatibilidade entre as cepas, além disso, avaliou-se a morfologia radicular, o crescimento de plântulas e a massa seca de milho inoculado com diferentes cepas de *Bacillus*.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs)**

As Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) desempenham um papel crucial na agricultura sustentável, oferecendo uma alternativa ecológica aos fertilizantes e pesticidas químicos. Elas atuam em várias frentes, melhorando o crescimento e a saúde das plantas (AFZAL et al., 2019).

As rizobactérias, um grupo importante dentro das (BPCPs), são microorganismos que vivem na rizosfera, a região do solo diretamente influenciada pelas raízes das plantas. Elas agenciam uma variedade de efeitos benéficos no crescimento de espécies vegetais, por meio de mecanismos diretos ou indiretos, como secretar hormônios e enzimas, ou promover a absorção e o acúmulo de N e de P (AHEMAD e KIBRET, 2014).

As BPCPs têm sido encontradas em associação com grande número de espécies de cereais e de gramíneas forrageiras, tendo uma vasta gama do gênero descritos (HUNGRIA et al., 2010; VIDEIRA et al., 2012). Na literatura, entre as principais destacam-se: *Bacillus*,

*Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Streptomyces* e *Enterobacter* (de OLIVEIRA et al., 2024; GIRIO et al., 2015).

## **2.2 Gênero *Bacillus* e os microrganismos solubilizadores de fosfato**

Bactérias do gênero *Bacillus* desempenham um papel importante no ciclo do P, no solo e na liberação e na imobilização de nutrientes (CARDOSO; ESTRADA-BONILLA, GERMAN ANDRÉS, 2019). Entre elas estão os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSP), que são organismos benéficos que hidrolisam o P orgânico, quando solubilizam o P inorgânico, insolúvel do solo. Podem incluir bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* ou fungos pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Actinobactérias* (KALAYU, 2019).

Nesse contexto, diversos estudos estão avançando em busca de cepas com potencial de solubilização de fosfato, ao serem inoculados nas sementes em larga escala, em diversas culturas, visando concentrar a presença desses organismos no solo para obter um incremento significativo na disponibilidade do P retido no solo, e do P acrescentado pela adubação. Entre os principais gêneros há destaque para os *Bacillus*, com espécies reconhecidas na capacidade de solubilização, de mineralização de fosfato e de promoção de crescimento vegetal (KALAYU, 2019).

O gênero *Bacillus* compreende ao grupo de bactérias Gram-positivas, aeróbios ou aeróbios facultativos, com formato de bastonetes retos, móveis por flagelos peritríquios, além disso, possuem endósporos que os permitem a resistir às condições adversas, como altas temperaturas, radiação, e ambientes secos (BHANDARI et al., 2013). Para tanto, são as rizobactérias que apresentam o maior potencial para solubilização de fosfato inorgânico (AHMAD et al., 2008). É importante ressaltar que o gênero *Bacillus*, em especial, representa um grupo de rizobactérias endofíticas ou de vida livre, que habitam o rizoplasma ou espaços entre as células do córtex radicular, e se mostram altamente hábeis na colonização das raízes (AHMAD e KIBRET, 2014). Alguns dos benefícios da utilização de *Bacillus* são o aumento da biomassa de plantas e a produção de AIA e de amônia. Além disso, também apresenta atividade enzimática e produção de compostos ativos importantes para o desenvolvimento vegetal e para a ciclagem de nutrientes (MENG et al., 2018). Diversos trabalhos corroboram que o gênero *Bacillus* se destacam na promoção de crescimento em diversas culturas (RIBEIRO et al., 2018; VELLOSO et al., 2020; de SOUSA et al., 2021; de OLIVEIRA-PAIVA et al., 2024).

O trabalho de Szilagyi-Zecchin et al. (2015), mostra o desempenho da estirpe FZB42 de *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* em produzir compostos indólicos (auxinas) e sideróforos, e em aumentar os teores totais de clorofila a e b no tomateiro. De maneira similar, Babu et al. (2015) verificaram a promoção do crescimento do tomateiro quando inoculado com tratamentos usando bactérias, dentre estas as estirpes de *B. subtilis* e *B. cereus*, com capacidade de produção de AIA, de solubilização de fosfato e de atividade antagonista à *Alternaria solani* devido à produção de ácido cianídrico HCN, de quitinase e de glucanase, além de ser observada a presença de enzimas antioxidantes de peroxidase e de polifenol oxidase. De fato, a utilização do gênero *Bacillus* se destaca na promoção crescimento pela sua capacidade de multiplicação rápida e fácil, e de manter-se viável em bioformulados devido à produção de endósporos, facilitando o manuseio junto a outros produtos (LANNA FILHO et al., 2010). E ainda, por apresentar capacidade de produção de antibióticos (YASEEN et al., 2016).

Essa capacidade vem sendo elucidada com as cepas de *B. megaterium* e de *B. subtilis*, revelando efeitos benéficos para a inoculação de milho, tanto em trabalhos *in vitro* como em pesquisas a campo (RIBEIRO et al., 2018; de OLIVEIRA et al., 2020; VELLOSO et al., 2020, de SOUSA et al., 2021; RIBEIRO et al., 2022; de OLIVEIRA-PAIVA et al., 2024). Efeitos promissores de diferentes cepas de bactérias em milho vem sendo testadas em condições hidropônicas e a campo, trazendo como respostas o aumento da matéria seca da parte aérea, da área superficial de raízes e a concentração de P no grão (de SOUSA et al., 2021). Resultados de pesquisas *in vitro* mostram a possibilidade da inoculação destas bactérias devido a inúmeros mecanismos de promoção de crescimento vegetal (VELLOSO et al., 2020; RIBEIRO et al., 2022).

A cepas de *B. megaterium* CNPMS B119 e de *B. subtilis* CNPMS B2084 são pioneiras no mercado brasileiro, compondo os primeiros inoculantes solubilizadores de P. Em vários trabalhos de campo foram confirmadas a viabilidade da inoculação de sementes de milho com essas cepas (de OLIVEIRA et al., 2020; de OLIVEIRA-PAIVA et al., 2024). Essas cepas aumentaram significativamente, a produtividade de milho em diferentes anos de cultivo e em duas condições de solo, sendo um incremento de 13,7% na produtividade média do solo, com baixo teor de P e de 6,5% em solo com alto teor de P. Nesse mesmo estudo, foram avaliadas a inoculação de *B. megaterium* com o *B. subtilis* em mistura com diferentes doses de P em Santa Maria RS e em Palotina-PR, e o tratamento com 50% da dose recomendada de P mais a inoculação das bactérias, aumentaram 27,7% a produtividade do milho em Santa Maria ,e

28,7% em Palotina, em comparação com a mesma dose de P, superando até mesmo o tratamento com a dose de P total recomendada.

O uso da mistura das cepas de *B. megaterium* B119 e de *B. subtilis* B2084 é um exemplo de sucesso para o incremento produtivo de milho e de soja no Brasil. Estima-se que na safra 2020/2021, 1,49 milhões de hectares de milho e de soja foram inoculados com *B. megaterium* e com *B. subtilis*, e as projeções para as próximas safras é que mais de 3 milhões de hectares sejam inoculadas (VIANA, 2021). Circunstância que reforça a relevância de novas pesquisas com cepas inéditas, afim de avaliar quais os seus efeitos sob as diferentes culturas e condições do solo, podendo selecionar novas estipes com potencial e que sejam viáveis para inoculação.

### **2.3 Mecanismos de promoção de crescimento de plantas (MPCPs)**

Os MPCPs são uma categoria peculiar de cada microrganismo que estabelecem relações benéficas com os vegetais, procedendo em avanços significativas no crescimento e no desenvolvimento plantas. As bactérias apresentam diferentes mecanismos de ação, podendo atuar de diversas formas (LOPES et al., 2021).

Em linhas gerais, os microrganismos demonstram a habilidade de aumentar consideravelmente a germinação de sementes e o vigor das plântulas (BABU et al., 2015), de facilitar o estabelecimento de plantas em condições adversas (PEREIRA et al., 2016), de potencializar o crescimento das plantas (SUWANNARACH et al., 2015) e de favorecer o incremento na produção (GOPALAKRISHNAN et al., 2014).

A aplicação de BPCPs é uma alternativa promissora para a prática da agricultura sustentável. Isso se deve à crescente demanda por insumos químicos, impulsionada pela necessidade de aumentar a produção de alimentos diante do crescimento populacional. O que as torna como agentes importantes a serem integradas às práticas agrícolas, desempenhando papéis tanto na fertilização quanto no controle químico de fitopatógenos (GLICK, 2012).

Elas podem agir de forma direta ou indiretamente, promovendo o crescimento em plantas por meio de diferentes mecanismos, aos quais podem agir individualmente ou em sinergia (PII et al., 2015).

### **2.4 Mecanismos diretos**

Dentre os mecanismos diretos, as BPCPs podem aumentar a disponibilidade de nutrientes ao converter formas insolúveis em formas acessíveis para as plantas. Essas ações

incluem a solubilização ou a mineralização de fosfatos, a solubilização de potássio, além da fixação de nitrogênio pelas bactérias diazotróficas e do aumento da solubilidade de micronutrientes, como a produção de sideróforos para a quelação de ferro. Elementos considerados limitantes para o desenvolvimento e a produtividade das culturas são destacados nesse contexto (GLICK, 2014; SCAGLIOLA et al., 2016).

A maior parte do P no solo encontra-se em formas insolúveis, o que limita sua disponibilidade para as plantas. Além disso, até 75% do fósforo aplicado como fertilizante pode se ligar ao solo e tornar-se indisponível para as plantas. As bactérias promotoras de crescimento de plantas podem aumentar a sua disponibilidade para as plantas por meio da solubilização de fosfatos precipitados. Elas utilizam mecanismos como, acidificação (produção de ácidos que reduzem o pH do solo, aumentando a solubilidade do P), quelação (liberam compostos que se ligam a cátions, facilitando a liberação de P, como a quelação de ferro), troca iônica (substituem íons de fósforo ligados a partículas do solo por outros íons), e, produção de ácidos orgânicos (excretam ácidos que solubilizam o fósforo mineral). Elas também secretam enzimas como fosfatase ácida, que mineralizam o fósforo orgânico, e podem prevenir a fixação do fosfato no solo (AFZAL, I. et al., 2019).

Ademais, as BPCPs apresentam habilidade de produção de hormônios vegetais, como auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico (RYBEL et al., 2010; SPAEPEN, 2015). Esses compostos estimulam o desenvolvimento vegetal, ajustam todas as funções fisiológicas, morfológicas e reprodutivas dos vegetais e também podem ter a função de regulação fisiológica, em meio à situações de estresse ambiental (MARIANO et al., 2004; CASTIGLIONI et al., 2008; KUNDAN et al., 2015; XU et al., 2016).

Dentre os fitormônios, o ácido indol-3-acético (AIA) é a auxina mais simples de ser encontrado como produto da associação no metabolismo microbiano, e participa dos processos de divisão celular, de diferenciação dos tecidos e de respostas ao estímulo luminoso e à gravidade. A sua produção pode ocorrer por isolados de *Bacillus* spp., sendo realizada inicialmente, pelo estímulo no vegetal pela presença de molécula chamada de triptofano, efetuada tanto pelos microrganismos ou pelas plantas quando estimuladas ou não (SPAEPEN, 2015). Zihalirwa Kulimushi et al. (2017), relatam que isolados de *Bacillus* spp. podem ser úteis à plantas de milho pela produção de auxinas. Por outro lado, o etileno é uma molécula gasosa, produzido em células em divisão, com efeitos no amadurecimento de frutos, na germinação e no alongamento de estruturas, sintetizado em momentos de stress, tendo como principal rota de

produção a molécula 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), produzida também pelos microrganismos (RANA et al., 2020).

Existem relatos de isolados de diversos microrganismos, inclusive espécies de *Bacillus*, que produzem esse composto e que permitem que as plantas sejam mais eficientes na absorção de nutrientes, por conta do aumento do número de radículas provocado pela ação deste fitohormônio. Há ainda, as citocininas e as giberelinas, que são hormônios vegetais que promovem a divisão celular em raízes e na parte aérea; as citocininas têm efeito regulador da senescência e auxilia no crescimento e na expansão foliar, controlam também a dominância apical proposta pelas auxinas, já as giberelinas estão envolvidas nos processos de germinação, de respiração celular, de crescimento e de controle da senescência (WOODWARD e BARTEL, 2005; CHANG et al., 2013).

## **2.5 Mecanismos indiretos**

Os mecanismos indiretos podem envolver a competição com os fitopatógenos por nutriente e por produção de metabolitos antifúngicos (VALIDOV et al., 2009). Mecanismo de liberação de substâncias com potencial quelantes, acidificação do microambiente influencia nas mudanças no potencial redox, afetam a biodisponibilidade de metais nos solos, que são requeridos muitas das vezes como micronutrientes essenciais para a maioria das reações redox e para a função celulares primordiais desses organismos, como produção de sideróforos, e, protegem a auxina microbiana de danos oxidativos (LASAT, 2002; TRIPATHI et al., 2005; AHMEDAD, 2012; AHMEDAD, 2014).

Os sideróforos são compostos com função quelante do  $Fe^{3+}$ , disponíveis na solução do solo, caracterizados por apresentarem baixo peso molecular e por permitirem que haja uma competição entre os microrganismos, desfavorecendo os fitopatógenos e as condições limitantes de ferro (XU et al., 2016). Esses microrganismos têm a capacidade de solubilizar as formas não disponíveis de P fixados nas moléculas de ferro por meio da quelação dos cátions (SHARMA et al., 2013; SANTOS et al., 2014; LI et al., 2023; LIU et al., 2023).

## **2.6 Benefícios da inoculação das BPCPs aplicadas na agricultura**

Em sistemas agrícolas, os microrganismos benéficos desempenham um papel crucial na promoção do crescimento vegetal e na melhoria da qualidade do solo, com destaque para

bactérias e para fungos que estabelecem relações simbióticas com as plantas (JAÉN-CONTRERAS et al., 2022).

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs), inicialmente descritas por Kloepper e Schroth (1980), têm sido amplamente estudadas devido aos seus mecanismos multifacetados de ação, que incluem a produção de fitormônios, a solubilização de nutrientes e a indução de resistência sistêmica. Desde então, o interesse científico tem crescido exponencialmente, resultando em avanços significativos na compreensão de sua fisiologia e de sua bioquímica. Essas descobertas têm contribuído para o desenvolvimento de práticas agrícolas mais sustentáveis, que visam reduzir o uso de insumos químicos e maximizar a produtividade das culturas, por meio de interações benéficas entre microrganismos e plantas.

As BPCPs atuam de várias maneiras para favorecer o crescimento das plantas, incluindo a fixação de nitrogênio, a solubilização de fosfatos, a produção de fitohormônios, e a proteção contra patógenos. Esse conhecimento tem impulsionado o uso dessas bactérias como uma alternativa promissora aos fertilizantes químicos, ajudando a reduzir a dependência de insumos externos e a melhorar a saúde do solo e das plantas (GOSWAMI et al., 2016; PATERSON et al., 2017).

A intensificação das pesquisas em biotecnologia de inoculantes tem se mostrado uma estratégia fundamental para aumentar o uso de insumos biológicos na agricultura. Essa abordagem possibilitou a aplicação prática de BPCPs, em forma de produtos formulados, que são cada vez mais utilizados no manejo agrícola sustentável (ANDRADE et al., 2023; LOPES, 2023; SINGH et al., 2023).

O Brasil tem se destacado significativamente nos estudos sobre *Azospirillum*, uma bactéria importante para a agricultura devido à sua capacidade de promover o crescimento das plantas. Os estudos começaram com a Dr.<sup>a</sup> Johanna Döbereiner, que focou na capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) dessa bactéria, enquanto o Dr. Yakov Okon, de Israel, evidenciou sua habilidade em sintetizar auxinas. A eficiência das primeiras estirpes comerciais de *Azospirillum* foi comprovada pela Embrapa Soja, em 2004, e o primeiro inoculante comercial foi lançado em 2009 (HUNGRIA, 2016).

Diante desses avanços, os produtos biológicos vêm ganhando espaços na agricultura brasileira. Nos últimos anos, cerca de 130 milhões de doses de inoculantes foram utilizadas. Além disso, o número de produtos registrados, apontou 531 produtos disponíveis no mercado nacional (ANPII, 2023; MAPA, 2023). Os fixadores de nitrogênio representam cerca de 80%

desse mercado, seguido pelos solubilizadores de P (15%), enquanto os outros inoculantes promotores de crescimento representam cerca de 5% (SOUMARE, 2020).

Entre as BPCP, os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* são amplamente utilizados para a fixação de nitrogênio atmosférico, especialmente em culturas como soja e milho. No Brasil, cerca de 78% da área plantada (aproximadamente 36,5 milhões de hectares) utiliza inoculantes microbianos para a fixação de nitrogênio, o que substitui a necessidade de aplicação de ureia. Essa prática não só reduz os custos com fertilizantes químicos, mas também diminui o impacto ambiental associado à sua produção e ao seu uso. A utilização desses inoculantes é um exemplo significativo de como a biotecnologia agrícola pode contribuir para a sustentabilidade e para a eficiência das práticas agrícolas (HUNGRIA et al., 2013; SANTOS et al., 2019).

No entanto, com avanços das pesquisas nessas linhas em 2019, a Embrapa Milho e Sorgo - Sete Lagoas/MG lançou o primeiro inoculante brasileiro para a solubilização de P. Nesse inoculante foram utilizadas as cepas de *Bacillus subtilis* e *B. megaterium*, que auxiliam na liberação do fósforo retido nos coloides do solo (de OLIVEIRA-PAIVA et al., 2024).

Essas cepas passaram por validação em diversos testes por avaliações em casa de vegetação e de campo, para inoculação na cultura do milho, demonstrando mecanismos de promoção de crescimento, de solubilização de fosfato, de incremento de produtividade. Como por exemplo, o aumento significativamente a produtividade de milho em duas condições de solo, sendo um incremento de 13,7%, na produtividade média do solo, com baixo teor de P, e de 6,5, em solo com alto teor de P. No mesmo estudo, foram avaliados a inoculação de *B. megaterium* com o *B. subtilis* com diferentes doses de P, em Santa Maria RS e em Palotina-PR, e o tratamento com 50% da dose recomendada de P, mais a inoculação das bactérias aumentou 27,7% a produtividade do milho em Santa Maria e 28,7% em Palotina, em comparação com a mesma dose de P, superando até mesmo o tratamento com a dose de P total recomendada (RIBEIRO et al., 2018, VELLOSO et al., 2020; de SOUSA et al., 2021; de OLIVEIRA-PAIVA et al., 2024).

### **3. MATERIAS E MÉTODOS**

#### **3.1 Cepas de *Bacillus***

Todas as oitos cepas usadas pertencem à Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatógenos da Embrapa Milho e Sorgo - Sete Lagoas /MG. As cepas B116 e B119 foram isoladas da rizosfera, e a cepa B2084 da endosfera foliar de genótipos de milho. Essas cepas

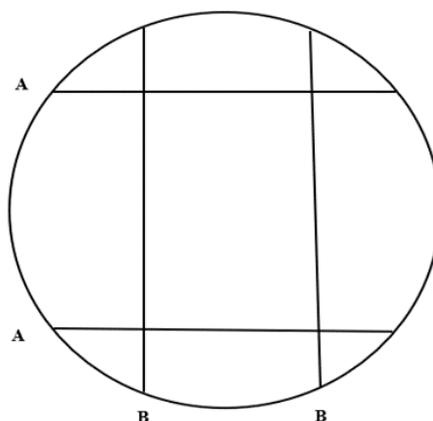
são bem caracterizadas quanto aos mecanismos relacionados à solubilização de P e à promoção de crescimento de plantas, e foram identificadas como *Bacillus thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2009; de ABREU et al., 2017; VELLOSO et al., 2020; de OLIVEIRA-PAIVA et al., 2024).

As cepas B1719, B1716, B1733 e B1734 foram isoladas da compostagem orgânica, de uma área de produção de hortaliças monitorada pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do estado de Minas Gerais, EMATER/MG, caracterizadas como termofílicos e termotolerantes. Foram identificadas como *B. subtilis* (B1719, B1716 e 1733) e *B. megaterium* (B1734) (COTTA et al., 2023). O isolado endofítico B2106 foi isolado do milho e identificado como *B. megaterium* (de ABREU et al., 2017).

### 3.2 Teste de compatibilidade

Para testar a compatibilidade das cepas de *Bacillus* foi empregado o método Cross-Streak, com riscos verticais e horizontais das cepas em meio de cultura sólida (Ágar Nutriente), por 48 horas. Após o crescimento, cada cepa foi reinoculada com um risco horizontal e uma segunda cepa foi riscada perpendicularmente a primeira linha, formando um ângulo de 90° (Figura 1). Em seguida, foram incubadas a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , por 3 dias, e a presença de antagonismo foi verificada pela zona de inibição nas interseções, sendo que as cepas que não apresentarem zonas de inibição foram consideradas compatíveis (MT MADIGAN e MARTIKO, 1997).

**Figura 1** - Representação esquemática do método Cross-Streak, Cepa A estriada horizontalmente e Cepa B estriada verticalmente.



### **3.3 Produção de sideróforos**

Para avaliar a produção de sideróforos, as cepas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio ágar nutriente e incubadas a  $30\pm 2^\circ\text{C}$ , por 16h, em triplicata. Posteriormente, foi aplicado sobre as placas o meio overlay CAS (SCHWYN e NEILANDS, 1987), modificado, conforme a metodologia proposta por PÉREZ-MIRANDA et al. (2007), como descrito a seguir:  $60,5\text{ mgL}^{-1}$  de cromoazurol S;  $72,9\text{ mgL}^{-1}$  de brometo de cetil trimetil amônio (CTAB);  $30,24\text{ gL}^{-1}$  de piperazina-1,4-bis (ácido 2-etanosulfônico) (PIPES); e 1 mM de  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  diluído em 10 mL de HCl 10 mM. Como agente gelificante, foi utilizada agarose 0,9% (m/v). As placas foram mantidas no escuro a  $25^\circ\text{C}$ .

A presença de sideróforos foi revelada após um período de quatro dias. Foram considerados produtores de sideróforos, as cepas capazes de promover mudança de coloração no meio de cultura, classificadas em: catecol (azul para rosa); hidroxamato (azul para laranja); carboxilato (azul para amarelo claro).

### **3.4 Produção de ácido indol acético (AIA)**

A quantificação AIA produzida pelas bactérias foi realizada utilizando a metodologia proposta por BRIC et al. (1991). Cada cepa foi cultivada em 50 mL de meio de cultura líquido de TSB suplementado com  $1,0\text{ mg mL}^{-1}$  de triptofano e incubada a  $30\pm 2^\circ\text{C}$ , por 5 dias, a 100 rpm no escuro (PATTEN & GLICK, 1996). Após incubação, o meio de cultura foi centrifugado, por 10 minutos, a 6000 rpm, e o sobrenadante obtido foi utilizado para a quantificação da produção de AIA. Para isso, a mistura de reação de cada cepa, constituída de 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante da cultura, e 100  $\mu\text{L}$  da solução de Salkoviski (LOPER & SCHROTH, 1986) (500  $\mu\text{L}$ , da solução aquosa de  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , na concentração de  $0,136\text{ g mL}^{-1}$ , e 24,5 mL de solução aquosa, de ácido perclórico 35% v/v) foi adicionada às microplacas de 96 poços, e mantidas à temperatura de  $28\pm 2^\circ\text{C}$ , no escuro. Para o controle negativo utilizou-se meio líquido estéril, sem inoculação. Após 20 minutos de incubação, a absorbância foi determinada a 530 nm. A produção de AIA foi estimada a partir de curva padrão de AIA, com as concentrações 0, 10, 20, 40, 80 e 100, e os resultados, expressos em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (GORDON & WEBER, 1951).

### **3.5 Produção de exopolissacarídeos (EPS)**

A determinação da produção de EPS foi realizada seguindo a metodologia preconizada por Paulo et al. (2012). Utilizou-se meio de cultura sólido, composto por  $50\text{ g L}^{-1}$  de sacarose;

20 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura; 20 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>; 0.01 g L<sup>-1</sup> de NaCl; 0.01 g L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub>; 0.01 g L<sup>-1</sup> de Mn SO<sub>4</sub>; 0.02 g L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> e 20 g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 15g de ágar, e o pH do meio, foi ajustado para 7,5 e, autoclavado, por 20 minutos, a 121°C (GUIMARÃES et al., 1999). Discos de 5 mm de diâmetro de papel filtro (Whatman 42) esterilizados foram transferidos para a superfície do meio, e tratados com 5 µL da cultura bacteriana, enriquecida em TSB na concentração de 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. Após incubação (30± 2°C/24 h), a produção de EPS foi avaliada pela ausência ou pela presença de colônia mucosa (material translúcido ou mucoso), ao redor dos discos. Por fim, avaliou-se a presença de precipitado, formado pela adição de colônia em etanol absoluto (resultado positivo), ou em presença de turbidez (resultado negativo), para a confirmação da produção de EPS.

### 3.6 Produção de biofilme

A produção de biofilme foi determinada usando o método espectrofotométrico proposto por Stepanović et al. (2007), com modificações. Inicialmente, 2 µL de cultura bacteriana (10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>; OD<sub>540nm</sub> = 1,0) foram inoculadas em 200 µL em meio de cultura líquido *Tryptic Soy Broth* (TSB) com 1% (m/v) de glicose em microplaca de poliestireno em triplicata, com inclusão de um controle (branco) contendo apenas o meio de cultura. As amostras foram incubadas a 30±2°C, por 48 h. Após o período de incubação, o líquido foi removido por inversão, cada poço foi lavado três vezes com 200 µL de água deionizada e, posteriormente, a placa foi vertida sobre papel absorvente. Em seguida, foram adicionados 200 µL de metanol em cada amostra para fixação do biofilme, seguido de incubação à temperatura ambiente, por 20 min. Posteriormente, o metanol foi descartado e a placa seca à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução de cristal violeta 0,5% (m/v) e as amostras incubadas por 15 min. Após remoção da solução por inversão, a placa foi lavada com água deionizada corrente, e incubada à temperatura ambiente até secagem. Por fim, foram adicionados 200 µL de etanol absoluto às amostras incubadas, por 30 min., sendo realizada a leitura em espectrofotômetro UV/VIS (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Alemanha) a 570 nm. As bactérias foram categorizadas em quatro classes em relação à produção de biofilme, em função da capacidade de retenção da coloração violeta, com base nos valores de densidade óptica (STEPANOVIĆ et al., 2007): (i) não formadoras ( $Doa \leq Docn$ ); (ii) fracamente formadoras ( $Docn \leq doa \leq 2x Docn$ ); (iii) moderadamente formadoras ( $2x Docn < Doa \leq 4x Docn$ ); e (iv) fortemente formadoras ( $4x Docn < Doa$ ). Sendo, Doa = densidade óptica da absorbância e Docn = densidade óptica do controle negativo).

### 3.7 Influência da inoculação de *Bacillus* sobre a morfologia radicular e parte aérea de plântulas de milho

Para a preparação dos inoculantes, as cepas foram reativadas previamente em meio sólido ágar nutriente, em seguida foram inoculadas e cultivadas em meio de cultura líquido *Tryptic Soy Broth* (TSB), por três dias a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ , sob agitação de 100 rpm. Após o período de incubação, as culturas foram centrifugadas por 10 minutos, a 6000 rpm, e ressuspensas em solução salina [0,85% (m/v) NaCl]. As suspensões bacterianas foram ajustadas à absorbância igual a 1, em comprimento de onda de 540 nm, correspondente a uma densidade aproximada de  $4 \times 10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$ . As duas cepas de *Bacillus* (B119 e B2084) integram o inoculante comercial BiomaPhos<sup>®</sup> que contém a tecnologia Embrapa, e que foram inoculadas seguindo as recomendações do fabricante, na concentração de  $4 \times 10^9$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ , na dose de 100 mL  $\text{ha}^{-1}$ .

O experimento foi conduzido na câmara de crescimento da Embrapa Milho e Sorgo - Sete Lagoas/MG. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com nove tratamentos (Tabela 1) e quatro repetições, e o genótipo de milho utilizado foi o KWSRB9006VTPRO2. Para o plantio, as sementes de milho foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 0,5% (v/v), por cinco minutos sob agitação constante, em seguida, lavadas em água deionizadas, inoculadas todos com as mesmas concentrações de  $4 \times 10^9$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ , e transferidas para papel de germinação. Após a germinação das sementes por três dias, as plântulas uniformes foram selecionadas e transplantadas para um sistema composto de bandejas plásticas e opacas com oito litros de solução nutritiva *Hoagland* meia força pH 5,65 (LIU et al., 1998).

**Tabela 1** - Tratamentos utilizados para avaliar a eficiência da inoculação de *Bacillus* sobre o crescimento das plântulas de milho em condições de hidroponia.

Tratamentos	Descrição
T1	Controle sem inoculação
T2	Produto comercial BiomaPhos: <i>Bacillus megaterium</i> (B119) + <i>B. subtilis</i> (B2084)
T3	<i>B. thuringiensis</i> (B116) + <i>B. megaterium</i> (B119)
T4	B119 + B2084 + B116
T5	<i>B. thuringiensis</i> (B116)
T6	<i>B. megaterium</i> (B2106)
T7	<i>B. subtilis</i> (B1719)
T8	<i>B. subtilis</i> (B1716)
T9	<i>B. megaterium</i> (B1734)

Após quinze dias de crescimento, o sistema radicular foi separado da parte aérea e o sistema radicular fotografado com uma câmera digital (Nikon D300S SLR). As imagens obtidas

foram analisadas com o auxílio dos softwares RootReader2D e WinRhizo v.4.0 (Regent Systems, Quebec, Canadá), sendo quantificadas as características relacionadas à morfologia radicular: comprimento total (cm) (CRT); superfície total (cm<sup>2</sup>) (AST) área de superfície de raízes, com diâmetro entre 0,0 e 1,0 mm, 1,0 e 2,0 mm e 2,0 e 4,5 mm (de SOUSA et al., 2012). Além das características do sistema radicular, foi determinado o peso seco da parte aérea e da raiz. A raiz e a parte aérea foram colocadas separadamente em sacos de papel, e secos em estufa com circulação forçada a 65 °C, e pesados em balança de precisão após a obtenção do peso constante. O peso seco total (PST) foi calculado somando-se o peso seco da parte aérea e da raiz.

### **3.8 Análises estatísticas**

Os dados foram submetidos ao teste de variância ANOVA e, quando detectada a significância, foi realizado o teste de comparação de médias (SCOTT-KNOTT, 1974) ( $p \leq 0,05$ ) pelo programa computacional SISVAR versão 5.8 (FERREIRA, 2019).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Teste de compatibilidade**

Pelo método utilizado de confrontação direta foi possível identificar a predominância de interações sinérgicas, entre todas as cepas testadas, pois não houve formação da zona de inibição, indicando a possibilidade de uso dessas estirpes de forma conjunta em um inoculante (Tabela 2).

### **4.2 Produção de sideróforos**

Neste trabalho as oito cepas de *Bacillus* avaliadas quanto à produção de sideróforos foram positivas. As amostras apresentaram alteração de cor do meio de azul para amarelo claro, indicando a produção sideróforos do tipo carboxilato.

### 4.3 Produção de ácido indol acético (AIA)

Os resultados da produção de AIA, apresentados na (Tabela 2), indicaram que houve uma variação 4,52 a 63,18  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo a cepa B1734 com a maior produção, seguida das cepas B1719 e B116.

### 4.4 Produção de exopolissacarídeos (EPS)

Quanto a quantificação de EPS, todas as cepas testadas apresentaram respostas positivas para a produção de exopolissacarídeos (EPS) (Tabela 2).

### 4.5 Produção de biofilme

Verificou-se que todas as cepas bacterianas avaliadas produziram biofilme, onde 28% foram moderadamente produtoras, e 72% fortemente formadoras. As cepas B2106, B1734, B1719, B119 e B2084 foram as que apresentaram a maior formação de biofilme, sendo classificadas com fortemente formadoras, seguidas das cepas B116, B1716, classificadas como moderadamente formadoras (Tabela 2).

**Tabela 2** - Característica *in vitro* de promoção do crescimento de plantas das cepas de *Bacillus*.

Características “ <i>In vitro</i> ”*	B119	B2084	B116	B1719	B1716	B1734	B2106
Teste de compatibilidade	+	+	+	+	+	+	+
Produção EPS	+	+	+	+	+	+	+
Produção biofilme**	+++	+++	++	+++	++	+++	+++
Ácido indol acético ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	6,85	11,53	22,03	33,25	9,44	63,18	4,52

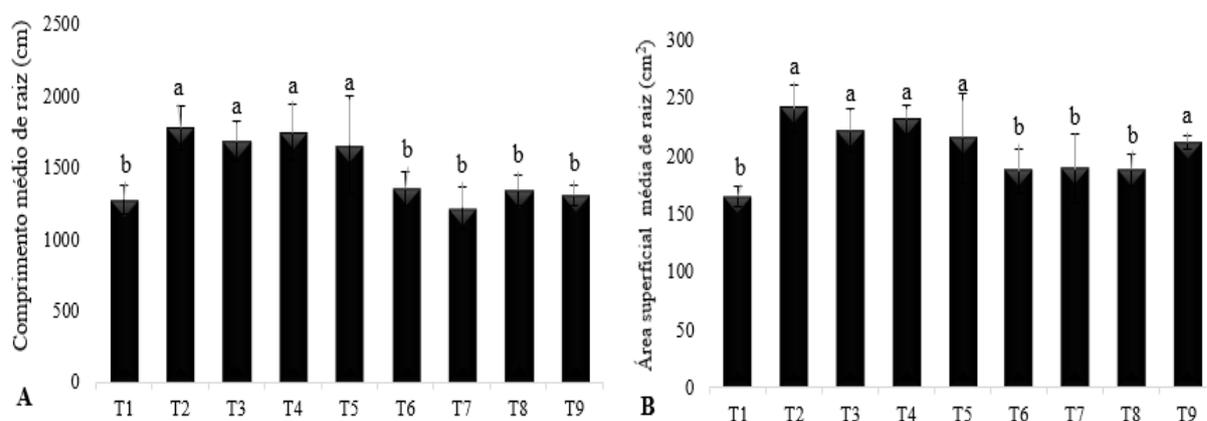
\*Os sinais positivos (+) e negativo (-) significam resultado positivo e negativo para a característica avaliada.

\*\*Classificação para produção de biofilme: moderadamente formadoras (++) e fortemente formadoras (+++).

### 4.6 Influência da inoculação de *Bacillus* sobre a morfologia de plântulas de milho

A análise estatística detectou que houve diferenças significativas entre os tratamentos e os parâmetros quantificados, destacando: Comprimentos médio de raiz (cm) (CMR) e área superficial média de raiz ( $\text{cm}^2$ ) (ASMR) (Figura 2A), nos tratamentos T3, T4 e T5, que alcançaram o maior desenvolvimento e área radicular, em comparação ao T1 (controle negativo sem inoculação) e ao T2 (controle positivo). Os tratamentos T3, T4, T5 e T9 evidenciaram maior área superficial de raiz, igualando-se aos valores de T2 e T1 (Figura 2B).

**Figura 2** - Comprimentos médio de raiz (cm) (CMR) e aérea superficial média de raiz (cm<sup>2</sup>) (ASMR). T1 - Sem inoculação; T2 - BiomaPhos (controle positivo *B. megaterium* B119 + *B. subtilis* B2084); T3- *B. thuringiensis* (B116) + *B. megaterium* (B119); T4- *B. megaterium* (B119) + *B. subtilis* (B2084), + *B. thuringiensis* (B116), T5- *B. thuringiensis* (B116); T6- *B. megaterium* (B2106); T7- *B. subtilis* (B1719); T8- *B. subtilis* (B1716); T9- *B. megaterium* (B1734). Média seguida pela mesma letra minúscula, não diferem entre-se pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).



Os tratamentos T3, T5 e T9 apresentaram maior área superficial de raízes com diâmetro entre 1,0 e 2,0 mm. Por outro lado, o tratamento T4 obteve incremento superior em área superficial de raízes com diâmetro entre 1 e 4,5 mm. Para a massa seca da parte aérea, os tratamentos T3, T4, T5 e T8 obtiveram o maior incremento comparando com os controles sem inoculação e ao produto comercial (Tabela 3).

O tratamento T4 apresentou o maior incremento na área superficial de raízes com diâmetro entre 1 e 4,5 mm, quando comparado ao controle não inoculado e aos demais tratamentos. Em relação à massa seca da parte aérea, os tratamentos T3, T4, T5 e T8 foram significativamente superiores, com destaque para o tratamento T4, que demonstrou um aumento de 0,8 g em comparação ao controle (T1- 0,16 g). Entretanto, para a massa seca das raízes, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. É importante ressaltar que os tratamentos de inoculação dupla (T3- *B. thuringiensis* B116 + *B. megaterium* B119) e tripla (T4- *B. megaterium* B119 + *B. subtilis* B2084 + *B. thuringiensis* B116) se destacaram por seus efeitos positivos no crescimento das raízes, comprimento médio de raiz (cm) e aérea superficial média de raiz (cm<sup>2</sup>), (Figura 3), além de promoverem um aumento considerável na massa seca da parte aérea (Tabela 3).

**Tabela 3** - Características de área e massa seca de raiz e de parte aérea de plântulas de milho cultivadas em condições hidropônicas 15 dias após a inoculação com as estirpes bacterianas T1- Sem inoculação; T2- BiomaPhos (controle positivo *B. megaterium* B119 + *B. subtilis* B2084); T3- *B. thuringiensis* (B116) + *B. megaterium* (B119); T4- *B. megaterium* (B119) + *B. subtilis* (B2084), + *B. thuringiensis* (B116); T5- *B. thuringiensis* (B116); T6- *B. megaterium* (B2106) *megaterium* (B2106); T7- *B. subtilis* (B1719); T8- *B. subtilis* (B1716); T9- *B. megaterium* (B1734).

Tratamentos	AS1 (cm <sup>2</sup> )	AS2(cm <sup>2</sup> )	AS3(cm <sup>2</sup> )	PSPA(g)	PSPR(g)
T1-B0	94,22 b*	25,93 b	28,47 b	0,16 b	0,09 a
T2-BiomaPhos	152,36 a	29,75 b	30,76 b	0,19 b	0,10 a
T3-B116+B119	144,31 a	32,91 b	13,93 d	0,21 a	0,10 a
T4-B119+B2084+B116	133,70 a	34,98 a	45,43 a	0,24 a	0,09 a
T5-B116	138,84 a	35,96 a	17,08 c	0,23 a	0,09 a
T6-B2106	113,35 b	36,97 a	16,62 c	0,17 b	0,08 a
T7-B1719	118,83 b	39,03 a	16,89 c	0,17 b	0,09 a
T8-B1716	127,20 a	41,42 a	11,38 d	0,22 a	0,09 a
T9-B1734	133,48 a	41,97 a	18,17 c	0,19 b	0,08 a
Media Geral	128,47	35,43	22,13	0,2	0,09
CV (%)	11,63	14,11	13,89	14,92	14,06

Parâmetros: AS1 – área de superfície das raízes com diâmetro entre 0-1 mm; AS2 – área de superfície das raízes com diâmetro entre 1-2 mm; AS3 – área de superfície das raízes com diâmetro > 2 mm, PSPA (g) – peso seco da parte aérea, PSR(g).

\*As médias seguidas pelas mesmas letras indicam que os tratamentos não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

**Figura 3** - Plântulas de milho submetidas a tratamento com inoculantes microbianos cultivadas por 15 dias em condições hidropônicas. T1- Sem inoculação; T2- BiomaPhos; T3- *B. thuringiensis* (B116) + *B. megaterium* (B119); T4- *B. megaterium* (B119) + *B. subtilis* (B2084), + *B. thuringiensis* (B116); T5- *B. thuringiensis* (B116); T6- *B. megaterium* (B2106); T7- *B. subtilis* (B1719); T8- *B. subtilis* (B1716); T9- *B. megaterium* (B1734).



## 5. DISCUSSÃO

Os resultados indicaram que as inoculações em sementes de milho, com cepas individuais de *Bacillus*, foram eficientes em aumentar a área superficial radicular e a massa seca, resultando em maior desenvolvimento e arquitetura radicular devido ao estímulo para a produção de raízes finas e laterais. Isso pode estar relacionado com a alta capacidade de produção de fitormônios e de biofilmes, o que pode ser verificado no cultivo de milho e na triagem *in vitro* com as respostas obtidas nessa pesquisa. Diversos estudos na literatura corroboram com essa observação, demonstrando alterações morfológicas nas raízes de diferentes plantas após a inoculação. Um exemplo notável é o trabalho de López-Bucio et al. (2007), onde a inoculação com *B. megaterium* em *Arabidopsis* resultou em um aumento no crescimento das raízes laterais e alongamento da raiz principal; e outra cepa de *B. siamensis* endofítica, isolada de raízes de arroz (HOSSAIN et al., 2019). Neste caso, as bactérias produziram um composto orgânico volátil que promove o desenvolvimento radicular independente da via da auxina ou do etileno/ácido jasmônico. Outros exemplos incluem a inoculação de *Bacillus* em mudas de algodoeiro (IRIZARRY & WHITE, 2017) e em plantas de ervilha (SCHWARTZ et al., 2013). Além do trabalho de Sousa et al. (2021), que mostrou que o sistema hidropônico é uma estratégia eficiente para analisar cepas de *Bacillus* promotoras de crescimento vegetal, em estádios iniciais de desenvolvimento do milho.

O aumento superficial radicular está diretamente ligado à eficiência das plantas em adquirir nutrientes e água do solo. Raízes finas (< 2 mm) desempenham um papel fundamental na ciclagem de água, de nutrientes e de carbono, e um importante investimento de fotossíntese e de recursos vegetais. Essas raízes também são capazes de interagir e de modificarem o ambiente do solo circundante através da exsudação de carbono, que estimulam a atividade microbiana e medeiam a dinâmica de nutrientes do solo, a curto e longo prazo, e a simbiose, com fungos micorrízicos (MCCORMACK et al., 2015).

A avaliação de novas cepas no sistema hidropônico mostrou-se uma estratégia eficiente para avaliar a promoção de crescimento vegetal, em estádios iniciais de desenvolvimento do milho. Para tanto, foi possível testar as inoculações simples e combinadas das cepas devido à compatibilidade entre elas. Dentre os resultados, a inoculação tripla com *B. megaterium* (B119), *B. subtilis* (B2084) e *B. thuringiensis* (B116) (T4) resultou no maior AST de raízes com diâmetro entre (1 e 4,5 mm). A presença de múltiplas cepas pode ter um efeito sinérgico, melhorando a colonização das raízes e a interação com o sistema radicular da planta, possivelmente devido à produção de uma gama mais ampla de compostos bioativos e à

interação com diferentes nichos ecológicos na rizosfera (PANDEY et al., 2017; GOMES et al., 2019). Por outro lado, a inoculação simples com a cepa de B116 (T5) aumentou o CRT, a AST, AS1, AS) e PSPA, enquanto com a cepa B1734 (T9) aumentou a AST, a AS1 e a AS2. O aumento significativo do CRT e da AST em plântulas de milho inoculadas com *Bacillus* corrobora com os resultados de diversos estudos anteriores (SILVA et al., 2018; SOUSA et al., 2018; GOMES et al., 2019; de SOUSA et al., 2021). Esses efeitos positivos ao papel dos *Bacillus* podem estar relacionados na promoção da absorção de nutrientes e da água pelas raízes, na produção de fitormônios que estimulam o crescimento radicular e na indução de resistência a patógenos (YAHIAOUI et al., 2014; SANTOYO et al., 2016; RAJKUMAR et al., 2017).

Resultados semelhantes foram obtidos por de Sousa et al. (2021), que observaram que plantas inoculadas com as linhagens de *Bacillus* B2084, B32 e B119 apresentaram maior sistema radicular e aumento na biomassa total e nos teores de nutrientes. Entretanto, as plantas inoculadas com B2084 e B32 apresentaram sistema radicular mais fino, enquanto as plantas inoculadas com B119 apresentaram raízes mais espessas quando comparadas ao controle não inoculado. Os aumentos significativos na massa seca da parte aérea notados nos T4, T3, T5 e T8 indicam que a inoculação com *Bacillus* pode também favorecer o crescimento vegetativo. Estudos demonstram que pode melhorar a resistência a estresses abióticos, como seca e salinidade, o que resulta em maior produção de biomassa (WANG et al., 2003). A maior biomassa aérea está associada a um maior rendimento de grãos, o que é particularmente relevante para a produtividade agrícola (ADESEMOYE et al., 2009).

Nesse contexto, as novas estirpes testadas, sobretudo as cepas *B. megaterium* B2106 e *B. megaterium* B1734, foram grandes produtoras de biofilme sendo similares às cepas B119 e B2084. Além do que, a formação de biofilme desempenha papéis importantes na fixação e colonização das superfícies das plantas por bactérias benéficas, como as rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCV), e também por bactérias fitopatogênicas (PRIMO et al., 2015; de OLIVEIRA-PAIVA et al., 2024; LI et al., 2024).

A alta produção de AIA pela cepa B1734, pode ter relação com os resultados obtidos para o aumento da área superficial radicular do experimento hidropônico. Por outro lado, as inoculações mistas apresentaram maior crescimento radicular, porém as cepas envolvidas apresentaram baixa produção de moléculas do tipo AIA. Nesse caso, é importante destacar que as cepas de *Bacillus* possuem diferentes genomas, o que pode levar à variação na expressão de genes relacionados à produção desse hormônio (LOPER et al., 2010). Além disso, outros

fitormônios têm efeito sobre o sistema radicular, que pode aumentar o comprimento e o crescimento radicular, como o ácido giberélico, as citocininas e a produção de aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase, que reduz os níveis de etileno (RUZICKA et al., 2007; BINENBAUM et al., 2018; WAIDMANN et al., 2019). A ampla variação na produção de AIA observada entre as cepas de *Bacillus*, neste estudo, se assemelham com os resultados de outras pesquisas (GIRI et al., 2011, EL-KOMY et al., 2019). Essa variação pode ser explicada por diversos fatores, como por exemplo meio de cultura, temperatura, pH e disponibilidade de precursores do AIA e podem influenciar a produção dessa auxina pelos *Bacillus* (GLICK, 2012b).

Todas as cepas avaliadas apresentaram capacidade de produzir sideróforos, compostos que se ligam ao ferro. O ferro, por sua vez, é um micronutriente essencial para as plantas, obtido do solo, e compõe enzimas envolvidas em reações de transporte de elétrons, na constituição dos citocromos e ferropoteínas, além de participar da fixação biológica de nitrogênio, da respiração e da fotossíntese. O ferro também integra alguns complexos clorofila-proteína. No entanto, no solo, ele está predominantemente na forma  $Fe^{3+}$ , que é indisponível para as plantas (TAIZ & ZEIGER, 2013; GROBELAK & HILLER, 2017; GARZÓN-POSSE et al., 2019).

A produção de sideróforos é fundamental, de acordo KULIMUSHI et al. (2017), uma vez que diante restrição de Fe os microrganismos são capazes de sintetizar esse nutriente através da produção de sideróforos. Além disso, pode ter efeitos sobre a disponibilidade de P, uma vez que as bactérias dissolvidas em fosfato produzem sideróforos que quelam  $Fe^{3+}$ ,  $Al^{3+}$  e  $Ca^{2+}$  no solo, liberando íons fosfato para dissolução de fosfato (FENG et al., 2021; RIBEIRO et al., 2023). Em consequência desse mecanismo, as plantas aumentam seu desenvolvimento, seu crescimento vegetal, e outro destaque é atuação no controle de microrganismo patogênicos presentes no solo, privando-os de Fe (AHMED & KIBRET, 2014; SAHA et al., 2016).

Os tratamentos submetidos à inoculação mista, mostraram efeitos positivos superiores, o que pode ser atribuído à ação sinérgica entre as diferentes espécies de *Bacillus*. Essa abordagem pode otimizar a colonização da rizosfera e a promoção de crescimento de plantas através de mecanismos complementares, como a produção de antibióticos, de sideróforos e de enzimas líticas (COMPANT et al., 2010). Também a presença de múltiplas cepas pode proporcionar uma maior resiliência contra patógenos do solo, melhorando a saúde geral da planta (GLICK, 2012a).

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo, confirmam o potencial de diferentes cepas de *Bacillus* em promover o crescimento de plântulas de milho, com destaque para as inoculações simples e múltiplas, especialmente os tratamentos T3 (*B. thuringiensis* B116 + *B. megaterium* B119), T4 (*B. megaterium* B119 + *B. subtilis* B2084 + *B. thuringiensis* B116), T5 (*B. thuringiensis* B116), T6 (*B. megaterium* B2106) e T9 (*B. megaterium* B1734), que promoveram melhorias significativas no desenvolvimento radicular e na biomassa da parte aérea. Mecanismos como a produção de AIA, de sideróforos, de EPS e de biofilme foram fundamentais nesse processo, reforçando a viabilidade do uso de *Bacillus* como bioinoculante para uma agricultura sustentável. Essas cepas apresentam grande potencial para futuras pesquisas e para o desenvolvimento de inoculantes comerciais eficazes.

## 7. REFERÊNCIAS

- ADESEMOYE, A. O.; TORBERT, H. A.; KLOEPPER, J. W. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. **Microbial ecology**, v. 58, n. 4, p. 921-929, 2009. Doi:10.1007/s00248-009-9531-y.
- ANDRADE, L. A. et al. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Sustainable Agricultural Production. **Microorganisms**, p. 1-16, 2023.
- AFZAL, I. et al. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. **Microbiological Research**, v. 221, p. 3649, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>.
- AHMAD, F. AHMAD, I. KHAN, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research** 163: 173-181. 2008.
- AHEMAD, M. Implicações da resistência bacteriana a metais pesados na biorremediação: uma revisão. **Revista do Instituto de Ômica Integrativa e Biotecnologia Aplicada**, n. 3, 2012.
- AHEMAD, M., KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University – Science** 26: 1-20. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>.
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES E IMPORTADORES DE INOCULANTES (ANPII). Brasil utiliza mais de 130 milhões de doses de inoculantes biológicos nas lavouras e os benefícios ambientais ganham destaque. 2023. Disponível em: <https://www.anpii.org.br/brasil-utiliza-destaque>. Acessado em: 16 jun. 2024.
- BABU, A. N; SUDISHA J; SHIN-ICHI I; AMRUTHESH, K. N; LAM-SON, P. T. Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenol oxidase. **Plant Science** 231: 62-73. 2015.
- BIEDENDIECK, R. et al. The “beauty in the beast” the multiple uses of *Priestia megaterium* in biotechnology. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 105, n. 14-15, p. 5719–5737, 2021.
- BINENBAUM, J.; WEINSTAIN, R. Localização e transporte de Giberelina em plantas. **Tendências Planta Sci**, v. 23, p. 410-421, 2018.
- BHANDARI, V. et al. Molecular signatures for *Bacillus* species: demarcation of the *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* clades in molecular terms and proposal to limit the placement of new species into the genus *Bacillus*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. Pt\_7, p. 2712-2726, 2013. 10.1099/ij.s.0.048488-0.
- BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S. E. Rapid in situ assay for indoleacetic Acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and environmental microbiology**, v. 57, n. 2, p. 535-538, 1991.

CARDOSO, ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA; ESTRADA-BONILLA, GERMAN ANDRÉS. Inoculantes agrícolas. **Biociencia Industrial**, v. 3 p. 305, 2019.

CÁSSAN, F & DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil biology & biochemistry**, v. 103, p. 117-130, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.020>>.

CASTIGLIONI, P. et al. Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. **Plant physiology**, v. 147, n. 2, p. 446–455, 2008.

CHANG, L.; RAMIREDDY, E.; SCHMÜLLING, T. A formação da raiz lateral e o crescimento da *Arabidopsis* são redundantemente regulados pelo metabolismo da citocinina e pelos genes de sinalização. **J Exp Bot**, v. 64, p. 5021-5032, 2013.

COMBES-MEYNET, E. et al. O metabólito secundário de *Pseudomonas* 2,4-diacetilfloroglucinol é um sinal indutor da expressão rizoplanar de genes *Azospirillum* envolvidos na promoção do crescimento vegetal. **Micróbio da planta mol interagir** 24:271-284. 2011.

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 & biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669-678, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>.

COTTA, S. P. M. et al. Thermo-resistant enzyme-producing microorganisms isolated from composting. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, 2023.

de ABREU, C. S. et al. Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 16, n. 1, 2017.

de OLIVEIRA-PAIVA, C. A. et al. Inoculation with *Bacillus megaterium* CNPMS B119 and *Bacillus subtilis* CNPMS B2084 improve P-acquisition and maize yield in Brazil. **Frontiers in microbiology**, v. 15, 2024. Doi: 10.3389/fmicb.2024.1426166.

de OLIVEIRA, C. A. et al. Recomendação agrônômica de cepas de *Bacillus subtilis* (CNPMS B2084) e *Bacillus megaterium* (CNPMS B119) na cultura do milho. **CIRCULAR TÉCNICA**, v. 260, p. 1-19, 2020.

de SOUSA, S.M.; et al. Um papel para a morfologia radicular e genes candidatos relacionados na eficiência de aquisição de P em milho. **Planta Funct Biol** 39(11):925-935. 2012.

de SOUSA, S. M. et al. Tropical *Bacillus* strains inoculation enhances maize root surface area, dry weight, nutrient uptake and grain yield. **Journal of plant growth regulation**, v. 40, n. 2, p. 867–877, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10146-9>.

DEPUYDT, S. & HARDTKE, C.S. Crosstalk de sinalização hormonal na regulação do crescimento vegetal. **Curr Biol** 21:365-373. 2011.

EL-KOMY, H. S.; IBRAHIM, M. E.; FATTAH, M. M. Efeitos promotores do crescimento vegetal de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* em tomateiro sob condições de estresse salino. **Fronteiras em Microbiologia**, v. 10, 2019.

FAOSTAT - Food and Agricultural Organization Statistical Databases. (31 March 2019, date last accessed).

FERREIRA, D. F. Sisvar: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs: Sisvar. **Revista Brasileira de Biometria**, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.  
doi: <https://doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450>.

FERREIRA, M.H. et al. Gêneros bacterianos promissores para práticas agrícolas: uma visão sobre propriedades promotoras de crescimento vegetal e aspectos de segurança microbiana. **Sci Total Meio Ambiente** 682:779-799. 2019.

FENG, Q. et al. Iron coupling with carbon fiber to stimulate biofilms formation in aerobic biological film systems for improved decentralized wastewater treatment: Performance, mechanisms and implications. **Bioresource technology**, v. 319, n. 124151, p. 124151 (aqui não seria 124-151?), 2021. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124151>>.

FUKAMI, J. et al. Fitohormônios e indução de genes de tolerância e defesa ao estresse de plantas por inoculação foliar e de sementes com células e metabólitos de *Azospirillum brasilense* promovem o crescimento do milho. **AMB Express** 7:153-163. 2017.

GARAY-ARROYO, A. Sinfonia hormonal durante o crescimento e desenvolvimento da raiz. **Dev Dyn**, v. 241, p. 1867-1885, 2012.

GARZÓN-POSSE, F. et al. Recent progress in the synthesis of naturally occurring siderophores: Recent progress in the synthesis of naturally occurring siderophores. **European journal of organic chemistry**, v. 2019, n. 48, p. 7747-7769, 2019.

GIRI, B. et al. Papel do *Bacillus subtilis* como agente de biocontrole e seu impacto na saúde do solo em campos agrícolas. **Revista Asiática de Microbiologia e Biotecnologia**, v. 1, n. 2, p. 117-125, 2011.

GÍRIO, L. A. et.al. Bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada no crescimento inicial de cana-de-açúcar proveniente de mudas pré-brotadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 50, 33-43. 2015.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications, **Scientifica**, v. 2012, p. 1-15, 2012a. Doi: 10.6064/2012/963401.

GLICK, B. R. **Phytohormones in microbial and plant interactions**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2012b.

GLICK, BR. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research** 169: 30-39. 2014.

- GOMES, E. A. et al. Efeito da inoculação de *Bacillus subtilis* e *Azospirillum* sobre o crescimento e absorção de nutrientes de plantas de milho cultivadas em hidroponia. **Scientia Agricola**, v. 76, n. 4, p. 567-575, 2019.
- GOPALAKRISHNAN, S. et al. Evaluation of Streptomyces strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. **Microbiological research**, v. 169, n. 1, p. 40-48, 2014.
- GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indole-acetic acid. **Plant Physiol**, v. 26, p. 192-195, 1951.
- GOSWAMI, D.; THAKKER, J. N.; DHANDHUKIA, P. C. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. **Cogent food & agriculture**, v. 2, n. 1, 2016.
- GROBELAK, A.; HILLER, J. Bacterial siderophores promote plant growth: Screening of catechol and hydroxamate siderophores. **International journal of phytoremediation**, v. 19, n. 9, p. 825-833, 2017.
- GUIMARÃES, D. P. et al. Optimization of dextran synthesis and acidic hydrolysis by surface response analysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 16, n. 2, p.129-139, 1999.
- HOSSAIN, M. T. et al. A volatile producing endophytic *Bacillus siamensis* YC7012 promotes root development independent on auxin or ethylene/jasmonic acid pathway. **Plant and soil**, v. 439, n. 1-2, p. 309-324, 2019.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Tecnologia de coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*: incrementos no rendimento com sustentabilidade e baixo custo. In Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso (ALICE). **Reunião de pesquisa de soja da região central do Brasil**, v. 33, 2013.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M. E.; 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, MARIANGELA. *Azospirillum*: um velho novo aliado. **Fertbio**, 2016.
- IRIZARRY, I.; WHITE, J. F. Aplicação de bactérias de plantas não cultivadas para promover o crescimento, alterar a arquitetura radicular e aliviar o estresse salino do algodão. **J Appl Microbiol**, v. 122, p. 1110-1120, 2017.
- JAÉN-CONTRERAS, D. et al. Quality of floral stems of lisianthus (*Eustoma grandiflorum* Raf.) inoculated with *Bacillus subtilis* and *Glomus intraradices*. **Ornamental Horticulture**, p. 414-422, 2022.
- KALAYU, GIRMAY. Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. Microorganismos solubilizadores de fosfato: abordagem promissora como biofertilizante. Microorganismos solubilizadores de fosfato: enfoque prometedor como biofertilizantes. **International Journal of Agronomy**, v. 2019, 2019.

KLOEPPER, J. W., SCHROTH, M. N., & Miller, T. D. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. **Phytopathology**, **70**(11), 1078-1082.1980.

KULIMUSHI, Z. et al. Stimulation of fengycin-type antifungal lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of the maize fungal pathogen *Rhizomucor variabilis* **Frontiers in Microbiology**. Lausanne, v. 15, 2017.

KUNDAN, R. et al. Plant growth promoting rhizobacteria: Mechanism and current prospective. **Journal of Fertilizers & Pesticides**, v. 06, n. 02, 2015.

LANNA FILHO, R; FERRO, H.M; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas** 4: 12-20. 2010.

LASAT, M. M. Fitoextração de metais tóxicos: Uma revisão dos mecanismos biológicos. **Revista de Qualidade Ambiental**, v. 31, n. 1, p. 109-120, 2002.

LI, Y. et al. Biofilms formation in plant growth-promoting bacteria for alleviating agro-environmental stress, **The Science of the total environment**, v. 907. 2024. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167774>>.

LI, H. P. et al. Papel de bactérias solubilizadoras de fosfato na mediação da disponibilidade de fósforo legado no solo. **Pesquisa microbiológica**, v. 272. 2023.

LIU, C. et al. Os genes transportadores de fosfato de tomate são regulados diferencialmente no tecido vegetal pelo fósforo. **Planta Fisiol** 116:91-99. 1998.

LIU, Y. Inoculations of phosphate-solubilizing bacteria alter soil microbial community and improve phosphorus bioavailability for moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) growth. **Applied Soil Ecology**, v. 189. 2023.

LOPES, B. D. M. **Aspectos biológicos da promoção de crescimento vegetal por *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 com enfoque na adubação fosfatada (Doctoral dissertation)**. [s.l: s.n.]. 2023.

LOPES, M. J. S.; SANTIAGO, B. S.; SILVA, I. N. B.; GURGEL, E. S. C. Microbial biotechnology: inoculation, mechanisms of action and benefits to plants **Biocología microbiana: inoculación, mecanismos de acción y beneficios de las plantas**. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, e356101220585, 2021a. Doi: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd.v10i12.205851>.

LOPER, J. E.; FINLAY, R. J.; RYAN, M. J. Multifaceted roles of *Bacillus subtilis* in the rhizosphere: a review. **Journal of Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 181-193, 2010.

LOPER, J. E.; SCHROTH, M. N. Influência da fonte bacteriana de ácido indol-3-acético no alongamento radicular da beterraba sacarina. **Fitopatologia**, v. 76, p. 386-389, 1986.

LÓPEZ-BUCIO, J. et al. *Bacillus megaterium* rhizobacteria promovem o crescimento e alteram a arquitetura do sistema radicular através de um mecanismo de sinalização

independente de auxina e etileno em *Arabidopsis thaliana*. **Micróbio da planta mol interagir**, v. 20, p. 207–217, 2007.

MARIANO, R. L. R. et al. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 1, p. 89–111, 2004.

MENG, X.; DAI, J.; ZHANG, Y.; WANG, X.; ZHU, W.; YUAN, X.; CUI, Z. Composted biogas residue and spent mushroom substrate as a growth medium for tomato and pepper seedlings. **Journal of environmental management**, v. 216, p. 62-69, 2018.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA (MAPA). Programa Nacional de Bioinsumos. 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos>>. Acesso em: 15 abr. de 2024.

MCCORMACK, M. L. et al. Redefinir raízes finas melhora a compreensão das contribuições abaixo do solo para os processos da biosfera terrestre. **Novo Phytol**, v. 207, p. 505–518, 2015.

MT MADIGAN, J. M.; MARTIKO, J. **Antibiotics: Isolation and Characterization**. **Em: Brock Biology of Microorganisms**. New Jersey: Prentice-Hall International Inc, 1997. p. 440-442.

OLIVEIRA, C. A. et al. Microrganismos solubilizadores de fosfato isolados da rizosfera do milho cultivado em um latossolo do Bioma Cerrado brasileiro. **Biol do Solo Bioquímico**, v. 41, p. 1782-1787, 2009.

PANDEY, R.; SHARMA, C. P.; TYAGI, R. K. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs): Mechanism and role in crop productivity and soil health. Em: PGPRs in agriculture and environment. **Singapore: Springer**, p. 1-24. 2017.

PAULO, E. M. et al. An alternative method or screening lactic acid bactéria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 32, 710-714. 2012.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of microbiology**, v. 42, n. 3, p. 207-220, 1996.

PATERSON, J., JAHANSHAH, G., LI, Y., WANG, Q., MEHNAZ, S., & GROSS, H. The contribution of genome mining strategies to the understanding of active principles of PGPR strains. **FEMS microbiology ecology**, 93(3), fiw249.2017.

PEREIRA, N.C. M. et al. A produtividade do milho e a eficiência do uso do fósforo respondem a doses de fósforo associadas a bactérias promotoras de crescimento vegetal. **Front Environ Sci.** v. 8, 07 abr. 2020. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00040>.

PEREIRA SIA; MOREIRA H; ARGYRAS K; CASTRO PML; MARQUES APCG. Promotion of sunflower growth under saline water irrigation by the inoculation of beneficial microorganisms. **Applied Soil Ecology** 105: 36-47. 2016.

PÉREZ-MIRANDA, S. et al. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. **Journal of microbiological methods**, v. 70, n. 1, p. 127-131, 2007.

PII Y; MIMMO T; TOMASI N; TERZANO R; CESCO S; CRECCHIO C. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. **Biology and Fertility of Soils** 51: 403- 415. Maio, 2015.

PRIMO, E. D. et al. Biofilm formation and biosurfactant activity in plant-associated bacteria. Em: **Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem**. Cham: Springer International Publishing, p. 337-349. 2015. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24654-3\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24654-3_13).

RAJKUMAR, M.; NANDAKUMAR, R.; VANAVARAYANA, P. Potential of *Bacillus* spp. in enhancing nutrient uptake and plant growth: A review. **Agricultural and Biological Sciences**, v. 43, n. 3, p. 566-589, 2017.

RANA, K. L. et al. Endophytic microbes: biodiversity, plant growth-promoting mechanisms and potential applications for agricultural sustainability. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 113, n. 8, p. 1075-1107, 2020.

RIBEIRO, L.; CAI, B. Bactérias solubilizadoras de fosfato: avanços em sua fisiologia, mecanismos moleculares e efeitos na comunidade microbiana. **Microrganismos**, v. 11, n. 12, p. 2904, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122904>.

RIBEIRO, et al. As cepas de *Bacillus* endofíticos aumentam o crescimento do milho e a absorção de nutrientes sob baixo P. **Revista Brasileira de Microbiologia [online]**. 2018, v. 49, suppl 1 (Acessado em 11 de junho de 2022), pp. 40-46. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.06.005>>. ISSN 1678-4405. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.06.005>.

RIBEIRO, V. P. et al. Co-inoculation with tropical strains of *Azospirillum* and *Bacillus* is more efficient than single inoculation for improving plant growth and nutrient uptake in maize. **Archives of microbiology**, v. 204, n. 2, p. 143, 2022.

RICHARDSON, A. E. et al. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and soil**, v. 321, n. 1-2, p. 305-339, 2009.

RUZICKA, K. et al. O etileno regula o crescimento radicular através de efeitos na biossíntese de auxinas e distribuição de auxinas dependente do transporte. **Célula Vegetal**, v. 19, p. 2197-2212, 2007.

RYBEL, B. et al. A novel Aux/IAA 28 signaling cascade activates GATA23-dependent specification of lateral root founder cell identity. **Current Biology** 20: 1697-1706. 2010.

SAHA, Maumita; SARKAR, Subhasis; SARKAR, Biplab; *et al.* Microbial siderophores and their potential applications: a review. **Environmental science and pollution research international**, v. 23, n. 5, p. 3984–3999, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11356-015-4294-0>>.

SANTOS, M.S. et al. Inoculantes microbianos: revendo o passado, discutindo o presente e prevendo um futuro excepcional para o uso de bactérias benéficas na agricultura. **AMB Express**, 9:1-22. 2019.

SANTOS, S. et al. Siderophore production by *Bacillus megaterium*: effect of growth phase and cultural conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 549-560, 2014.

SANTOS, M. S., NOGUEIRA, M. A., & HUNGRIA, M. Outstanding impact of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 on the Brazilian agriculture: Lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 45. 2021.

SANTOYO, G. et al. Growth and nutrient uptake by maize plants inoculated with *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* under drought stress conditions. **Plant Growth Regulation**, v. 80, n. 1, p. 127-134, 2016.

SCAGLIOLA M. et al. Characterization of plant growth promoting traits of bacterial isolates from the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.) and tomato (*Solanum lycopersicon* L.) grown under Fe sufficiency and deficiency. **Plant Physiology and Biochemistry** 107: 187-196. Junho, 2016.

SCHINDLER, D. W.; HECKY, R. Eutrofização: mais dados de nitrogênio necessários. **Ciência**, v. 324, p. 721-722, 2009.

SCHWARTZ, A. R. et al. *Bacillus simplex* - um PGPB pouco conhecido com atividade antifúngica - altera a arquitetura da raiz da leguminosa de ervilha e a morfologia do nódulo quando coinoculado com *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*. **Agronomia**, v. 3, p. 595-620, 2013.

SCHWYN, B., AND NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Biochem.** 160, 47-56. Anal. 1987.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SHARMA, S. B. et al. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. SpringerPlus, v. 2, p. 587, 2013.

SILVA, J. P. et al. Efeito da inoculação de *Bacillus subtilis* e *Azospirillum* sobre o crescimento e absorção de nutrientes de plantas de milho cultivadas no solo. **Scientia Agrícola**, v. 75, n. 1, p. 103-110, 2018.

SINGH, S.; PRASANNA, R. **Bioinoculants: Biological Option for Mitigating global Climate Change**. [s.l.] Springer Nature, 2023.

SOUMARE, A. et al. Exploiting biological nitrogen fixation: A route towards a sustainable agriculture. **Plants**, v. 9, n. 8, p. 1011, 2020. <https://doi.org/10.3390/plants9081011>.

SOUSA, E. M. et al. Effect of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum* inoculation on growth and nutrient uptake of maize plants grown in vermiculite. **Scientia Agrícola**, v. 75, n. 6, p. 1072-1080, 2018.

SPAEPEN S. Plant Hormones Produced by Microbes. In: Principles of plant-microbe interactions – microbes for sustainable agriculture. **Springer International Publishing Switzerland**. p. 247-256. 2015.

STEPANOVIĆ, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.

SUWANNARACH N; KUMLA J; MATSUI K; LUMYONG S. Characterization and efficacy of *Muscodor cinnamomi* in promoting plant growth and controlling *Rhizoctonia* root rot in tomatoes. **Biological Control** 90: 25-33. 2015.

SZILAGYI-ZECCHIN VJ; MÓGOR AF; RUARO L; RODER C. Crescimento de mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) estimulado pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 em cultura orgânica. *Revista de Ciências Agrárias* 38: 26-33.2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed. 918p. 2013.

TRIPATHI M; MUNOT HP; SHOUCHE Y; MEYER JM; GOEL R. Isolation and Functional Characterization of Siderophore-Producing Lead- and Cadmium-Resistant *Pseudomonas putida* KNP9. **Current Microbiology** 50: 233-237. 2005.

VALIDOV SZ; KAMILOVA F; LUGTENBERG BJJ. *Pseudomonas putida* strain PCL1760 controls tomato foot and root rot in stonewool under industrial conditions in a certified greenhouse. **Biological Control** 48: 6-11. 2009.

VANSTRAELEN, M & BENKOVÁ, E. Interações hormonais na regulação do desenvolvimento vegetal. **Annu Rev Célula Dev Biol** 28:463-487. 2012.

VACHERON, J. et al. Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal e funcionamento do sistema radicular. **Planta Frontal Sci** 4:1-19. 2013.

VELLOSO, C. C.V. et al. Genome-guided views of tropical *Bacillus* strains efficient in maize growth promotion, **FEMS Microbiology Ecology**, Volume 96, Issue 9, September 2020, f1aa157, <https://doi.org/10.1093/femsec/f1aa157>.

VIANA, GUILHERME. BiomaPhos rendeu R\$ 105 milhões ao País em 2020 com aumento de produtividade de soja e milho. **EMBRAPA**, maio. 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/61084904/biomaphos-rendeu-r105-milhoes-ao-pais-em-2020-com-aumento-de-produtividade-de-soja-e-milho>. Acesso em: 08 mai. 2022.

VIDEIRA, S. S.; DE OLIVEIRA, D. M.; DE MORAIS, R. F.; BORGES, W. L.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1, p. 51-66, 2012.

WAIDMANN, S. et al. A citocinina funciona como um sinal assimétrico e antigravitropico nas raízes laterais. **Nat Commun**, v. 10, p. 1-14, 2019.

WAGI, S.; AHMED, A. *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. **PeerJ**, v. 7, 2019. <https://doi.org/10.7717/peerj.7258>.

WANG, Wangxia; VINOCUR, Basia; ALTMAN, Arie. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, n. 1, p. 1-14, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00425-003-1105-5>>.

WOODWARD, A. W.; BARTEL, B. Um receptor para auxina. **Célula Vegetal**, v. 17, p. 2425-2429, 2005.

WU, L. Novas rotas para melhorar a atividade de biocontrole de bioinoculantes à base de bacilos, **Microbiol frontal**, v. 6, n. 1395, 2015.

XU, S. J. et al. Biological control of gray mold and growth promotion of tomato using *Bacillus* spp. isolated from soil. **Tropical plant pathology**, v. 41, n. 3, p. 169-176, 2016.

YAHIAOUI, K.; WAHBI, F. Z.; GHOUL, M., Effect of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* inoculations on growth and nutrient uptake of maize plants grown under water stress conditions, **Journal of Plant Interactions**, n. 9, p. 223-228, 2014.

YASEEN Y GANCEL F DRIDER D BÉCHET M, J. P. Influence of promoters on the production of fengycin in *Bacillus* spp. **Research in Microbiology**, v. 167, p. 272-281, 2016.

ZIHALIRWA KULIMUSHI, P. et al. Stimulation of Fengycin-Type Antifungal Lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* in the Presence of the Maize Fungal Pathogen *Rhizomucor variabilis*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, 2017.

## CAPÍTULO II

### EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DA INOCULAÇÃO SIMPLES E MISTA DE *Bacillus* sp. SOBRE A PRODUTIVIDADE DE MILHO EM CAMPO

**Resumo** - Os solos brasileiros possuem limitações em disponibilizar fósforo (P) para as plantas, afetando a competitividade, a sustentabilidade e a produtividade agrícola. Isso onera a produção, uma vez que agricultura brasileira depende da importação de fertilizantes fosfatados. Os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSP) são uma alternativa promissora para melhorar a utilização desse nutriente no solo. O objetivo desta pesquisa consistiu em avaliar o efeito das inoculações simples e mista de cepas de *Bacillus* sp. e doses de adubação fosfatada sobre a produtividade do milho, em dois ambientes distintos. Todas as cepas testadas pertencem à Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas/MG. Os experimentos foram conduzidos na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas/MG e na Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás/GO. Foi utilizado delineamento em blocos casualizados, com onze tratamentos e três repetições, sendo T1- sem aplicação de fósforo; T2- dose de 50 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e T3- dose de 100 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; e os demais com adição de inoculantes e 50 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, sendo: T4- produto comercial BiomaPhos<sup>®</sup> composto pelas cepas *Bacillus megaterium* (B119) + *B. subtilis* (B2084); T5- *B. megaterium* (B119) + *B. subtilis* (B2084) + *B. thuringiensis* (B116); T6- *B. megaterium* (B2106); T7- *B. subtilis* (B1719); T8- *B. subtilis* (B1716); T9- *B. subtilis* (1733); T10- *B. megaterium* (B1734); T11- *B. thuringiensis* (B116). Foram avaliadas a produtividade, kg ha<sup>-1</sup>, e a produtividade relativa (%) em função do tratamento T3 (sem inoculação com dose de 100 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). Os dados foram submetidos ao teste de variância e às médias comparadas pelo teste de Scott-Knott (P≤0,05). Houve diferenças significativas entre os tratamentos, em ambas as regiões. A produtividade dos tratamentos com inoculação mista T4 e T5 foi semelhante aos valores observados no tratamento com 100 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (T3), em Sete Lagoas. Considerando os tratamentos com inoculação simples, a produtividade dos tratamentos T6, T11 e T10 foi significativamente superior aos dos tratamentos T2 e T3, em Sete Lagoas, com incremento médio de produtividade em torno de 12%, 9%, 7%, respectivamente, em comparação à dose usada de adubação fosfatada para a cultura do milho (100 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). Em Santo Antônio de Goiás, a produtividade de todos os tratamentos inoculados, com exceção do tratamento T7, foi estatisticamente semelhante à adubação com 100 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e superior à dose de 50 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Os resultados indicaram que a inoculação com *Bacillus* com adição de 50 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> promoveu um efeito positivo significativo na produtividade do milho. Os resultados demonstraram que mesmo com a aplicação reduzida da adubação fosfatada, as cepas de *Bacillus* foram capazes de aumentar a produtividade do milho de maneira equivalente ou superior às práticas de convencionais.

**Palavras-chave:** Inoculante. Bactéria. Adubação fosfatada. *Zea mays* L.

## AGRONOMIC EFFICIENCY OF SINGLE AND MIXED INOCULATION OF *Bacillus* sp. ABOUT CORN PRODUCTIVITY IN THE FIELD

**Abstract-** Brazilian soils have limitations in making phosphorus (P) available to plants, affecting competitiveness, sustainability and agricultural productivity. This burdens production, since Brazilian agriculture depends on the import of phosphate fertilizers. Phosphate-solubilizing microorganisms (PHM) are a promising alternative to improve the use of this nutrient in the soil. The objective of this research was to evaluate the effect of single and mixed inoculations of *Bacillus* sp. strains. and phosphate fertilization doses on corn yield, in two different environments. All the strains tested belong to the Collection of Multifunctional and Phytopathogenic Microorganisms of Embrapa Maize and Sorghum, Sete Lagoas/MG. The experiments were conducted at Embrapa Maize and Sorghum, Sete Lagoas/MG and at Embrapa Rice and Beans, Santo Antônio de Goiás/GO. A randomized block design was used, with eleven treatments and three replications, with T1- no phosphorus application; T2- dose of 50 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and T3- dose of 100 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; and the others with the addition of inoculants and 50 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, being: T4- commercial product BiomaPhos® composed of the strains *Bacillus megaterium* (B119) + *B. subtilis* (B2084); T5- *B. megaterium* (B119) + *B. subtilis* (B2084) + *B. thuringiensis* (B116); T6- *B. megaterium* (B2106); T7- *B. subtilis* (B1719); T8- *B. subtilis* (B1716); T9- *B. subtilis* (1733); T10- *B. megaterium* (B1734); T11- *B. thuringiensis* (B116). Yield, kg ha<sup>-1</sup>, and relative yield (%) were evaluated as a function of treatment T3 (without inoculation with a dose of 100 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). The data were submitted to the test of variance and the means were compared by the Scott-Knott test (P≤0.05). There were significant differences between treatments in both regions. The yield of the treatments with mixed inoculation T4 and T5 was similar to the values observed in the treatment with 100 kg ha<sup>-1</sup> of P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (T3), in Sete Lagoas. Considering the treatments with simple inoculation, the productivity of the T6, T11 and T10 treatments was significantly higher than those of the T2 and T3 treatments, in Sete Lagoas, with an average yield increase of around 12%, 9%, 7%, respectively, compared to the dose of phosphate fertilization used for the corn crop (100 kg ha<sup>-1</sup> of P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). In Santo Antônio de Goiás, the yield of all inoculated treatments, except for the T7 treatment, was statistically similar to fertilization with 100 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and higher than the dose of 50 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. In Santo Antônio de Goiás, the yield of all inoculated treatments, except for the T7 treatment, was statistically similar to fertilization with 100 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and higher than the dose of 50 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. The results indicated that inoculation with *Bacillus* with the addition of 50 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> promoted a significant positive effect on corn yield. The results showed that even with the reduced application of phosphate fertilization, the *Bacillus* strains were able to increase corn yield in an equivalent or superior way to conventional practices.

**Keywords:** Inoculant. Bacterium. Phosphate fertilization. *Zea mays* L.

## 1. INTRODUÇÃO

O milho é um dos cereais essenciais para a nutrição global, sendo amplamente utilizado na alimentação humana e animal, devido ao seu elevado valor nutricional (NOGUEIRA, 2021). O Brasil destaca-se como o terceiro maior produtor e o quarto maior consumidor mundial de milho (FIESP, 2023). Na safra 2022/2023, o país alcançou uma produção recorde de 125,71 milhões de toneladas, cultivadas em 22,152 milhões de hectares, com uma produtividade média de 5.675 kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2023).

No entanto, a produção global de alimentos enfrenta diversos desafios, como variações climáticas, altos custos de produção, tensões geopolíticas entre grandes fornecedores de fertilizantes e o crescimento populacional, que pode alcançar 9,7 bilhões de pessoas até 2050, com um pico estimado de 11 bilhões em 2100 (ONU, 2019). Diante da previsão de um aumento de 20% na demanda por alimentos, nos próximos 10 anos, a cultura do milho torna-se ainda mais estratégica, sendo o Brasil considerado o "celeiro do mundo", com potencial para suprir 40% dessa demanda (FAO, 2022).

Contudo, para manter altos níveis de produção, o Brasil depende da importação de fertilizantes, sendo responsável por 80% do nitrogênio, 60% do fósforo e mais de 90% do potássio utilizados, posicionando-se como o maior importador global de fertilizantes, consumindo 8,3% da produção mundial, ficando atrás apenas da China (24%) e dos Estados Unidos (10,3%) (OGINO et al., 2023). Ademais, a guerra entre Rússia e Ucrânia, iniciada em fevereiro de 2022, intensificou a elevação dos preços de fertilizantes, uma vez que a Rússia é um dos maiores produtores e exportadores de fertilizantes nitrogenados e potássicos (OGINO et al., 2023).

Os solos agricultáveis brasileiros são predominantes tropicais, onde um limitante para o cultivo está diretamente ligado com a fertilidade do solo. Esses solos apresentam alto grau de intemperização, os quais são identificados pelo baixo teor de nutrientes, pela alta fixação de fósforo (P), pela alta acidez e pela toxicidade por alumínio (CARDOSO & KUYPER, 2006). Diante dessas limitações é essencial o investimento em adubação, para que haja aumento de produtividade agrícola (ZONTA et al., 2021). De fato, sem uso de fertilizantes não há como aumentar a produção em uma mesma área, visto que não terá nutrientes para o desenvolvimento das culturas (BECKMAN & RICHE, 2015).

Perante o exposto, diversas empresas e grupos de pesquisa têm buscado desenvolver novas tecnologias, com o propósito de minimizar o uso de insumos químicos, para uso de forma mais eficiente, buscando aumentar a produtividade e amenizar os custos com a produção. Nesse

sentido, práticas de manejo da nutrição e da adubação com ênfase no P e novas tecnologias são bem vindas. O P é um macronutriente primário e se destaca por ser exigido em maior quantidade nos sistemas agrícolas, por ser quimicamente reativo e facilmente convertido em outras formas menos solúveis, dependendo da acidez do solo, da temperatura, da umidade e outros fatores. A maior parte do P no solo é imóvel e pouco solúvel, tornando-o inacessível para as plantas. (OLIVEIRA & COLE, 1999).

Assim, novas tecnologias voltadas para o aproveitamento do P do solo vêm surgindo como alternativas sustentáveis e eficientes para a agricultura moderna, incluindo o estudo e aplicação de microrganismos benéficos em formulação de inoculantes, como as bactérias do gênero *Bacillus*. Diversas pesquisas comprovam os benefícios das inoculações simples e mistas com esse gênero na produção agrícola, especialmente no cultivo do milho (RIBEIRO et al., 2018; OLIVEIRA-PAIVA et al., 2020b; de SOUSA et al., 2021; de OLIVEIRA-PAIVA et al., 2024). Essa prática, que consiste na introdução de cepas selecionadas de *Bacillus* nas sementes, tem demonstrado potencial para aumentar significativamente a produtividade do milho e da soja, além de promover benefícios adicionais para o solo e para a planta (OLIVEIRA-PAIVA et al., 2020a; de OLIVEIRA-PAIVA et al., 2024).

As bactérias dos gêneros *Azospirillum* (Gram-negativo) e *Bacillus* (Gram-positivo) são amplamente utilizadas em inoculantes devido à sua capacidade de promover o crescimento vegetal. Esses microrganismos contribuem para o desenvolvimento da parte aérea e das raízes das plantas, além de desempenharem um papel relevante na mitigação dos efeitos de estresses bióticos e abióticos, favorecendo a resiliência das culturas agrícolas (HUNGRIA et al., 2016; SANTOS et al., 2019; AYDINOGLU et al., 2020; GUIDINELLE et al., 2024). Adicionalmente, os inoculantes que utilizam essas bactérias são caracterizados pelo baixo custo de produção e pelos reduzidos impactos ambientais, tornando-se uma alternativa sustentável para a agricultura moderna (KALAYU, 2019; OLIVEIRA et al., 2020a).

A busca por cepas eficientes na solubilização do P no solo são alvo de investigações persistentes do laboratório de Microbiologia da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas/MG. Avanços significativos vêm sendo conquistados com os estudos das cepas B119 (*Bacillus megaterium*) e B2084 (*Bacillus subtilis*). Com inúmeros trabalhos publicados (RIBEIRO et al., 2018, OLIVEIRA-PAIVA et al., 2020b), essas cepas compõem o primeiro inoculante comercial do país para solubilização de fosfato. Agora, novas investigações por novas cepas, com potencial equivalente ou superior às cepas B119 e B2084, estão sendo realizadas com o intuito de aumentar as possibilidades de forma a trazer melhorias às diferentes culturas agrícolas.

Nessa conjuntura, o objetivo desta pesquisa consistiu em avaliar o efeito das inoculações simples e mista de cepas de *Bacillus* sp. e doses de adubação fosfatada sobre a produtividade do milho em dois ambientes distintos.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Classificação botânica do milho (*Zea mays* L.)**

O milho é uma monocotiledônea, classificado botanicamente como: Família: Poaceae; Subfamília: Panicoideae; Tribo: Andropogoneae; Subtribo: Tripsacinae; Gênero: *Zea*; Espécie: *Zea mays*. É uma planta herbácea, com ciclo que se completa entre quatro e cinco meses, sendo caracterizada como anual, monóica, do grupo das plantas C-4, ou seja, tem uma alta taxa de fotossíntese líquida e elevada afinidade com o CO<sub>2</sub> (SOUZA et al., 2013; LOBO, 2018). O centro de origem é no México e apresenta grande variabilidade, uma vez que atualmente existem em torno de 250 raças distintas descritas.

A alta demanda por este grão para múltiplos usos, como ração animal, alimentos, combustíveis, bebidas e processamento de subprodutos, faz com que ele seja bastante utilizado em indústrias químicas e de fermentação. O cultivo amplamente difundido dessa cultura se deve à sua capacidade de adaptação a diversas condições adversas, como estresses bióticos e abióticos, climas desfavoráveis e solos de baixa fertilidade. (OLIVEIRA et al., 2011; RANUM et al., 2014; TESTA et al., 2016; JIAO et al., 2022).

### **2.2 Importância econômica**

Atualmente, o milho é a segunda maior cultura do Brasil (GLOBALFERT, 2021) e tem grande relevância no cenário mundial devido ao amplo consumo e à versatilidade de nutrientes (VELLOSO, 2019; SANTOS et al., 2021). Na classificação global, o Brasil aparece como terceiro produtor desse cereal e segundo exportador depois dos Estados Unidos e da China, com uma produção total de milho de aproximadamente 102 milhões de toneladas em 2020/2021 (CONAB, 2021). A produção brasileira de milho é dividida em três safras, sendo 22% produzido na primeira safra, 75,9% na segunda safra e 1,7% na terceira safra.

O maior consumidor desse grão é o Estados Unidos, seguidos pela China, pela União Europeia e pelo Brasil. Esses quatro representam em conjunto 65,15% da demanda mundial.

Em relação à produção brasileira, na primeira safra de 2022/2023, foram colhidas 26,46 milhões de toneladas, um aumento de 5,7% em comparação ao ano anterior (CONAB, 2023).

O agronegócio é o setor que vem mantendo a economia do país, sendo fundamental para a balança comercial, gerando emprego e renda. Impulsionado pela demanda global, o país vem investindo em tecnologia, desde a produção agrícola até o consumidor final. Diante de tal procura, e visando manter a produção agrícola sustentável, as instituições de pesquisa vêm estudando diversas linhas como, desenvolvimentos de novos pesticidas, resistências à doenças, máquinas, técnicas de plantio, colheita, irrigação e aumento da eficiência de absorção de nutrientes pelas plantas (de SOUSA et al., 2021; CONAB, 2021; GLOBALFERT, 2021).

### **2.3 A cultura do milho e a demanda por fertilizantes fosfatados**

A agricultura brasileira é um pilar fundamental para garantia da segurança alimentar mundial, contribuindo para a criação de indústrias, e para a geração de empregos e de renda (LAMAS, 2023). Hoje, o Brasil está classificado como o quarto maior consumidor de fertilizantes em nível global (FARIAS et al., 2021). Com a trajetória ascendente da produtividade agrícola nas últimas décadas, a produção interna de fertilizantes minerais para atender à crescente demanda não é o suficiente, ocasionando na importação significativa desses insumos (ANDA, 2021).

Essa dependência crescente de fertilizantes importados representa um desafio significativo para o setor agrícola brasileiro, afetando tanto a segurança alimentar quanto a economia do país (SEIXAS, 2022). A necessidade de adquirir a maior parte dos nutrientes essenciais para as culturas agrícolas no mercado internacional, expõe o Brasil às flutuações de preços e de volatilidades que podem impactar tanto os produtores quanto os consumidores (OGINO et al., 2021).

Assim, para atender à demanda crescente na produção de grãos, é fundamental adotar boas práticas de manejo, com especial atenção ao manejo da adubação, particularmente no que diz respeito ao fósforo (P). A importância desse nutriente é crucial para otimizar a produtividade agrícola. Contudo, a dependência de cerca de 50% dos fertilizantes fosfatados do mercado externo deixa o agronegócio brasileiro vulnerável, comprometendo sua sustentabilidade e sua competitividade global. Essa preocupação se intensifica diante de eventos recentes, como a crise econômica mundial desencadeada pela pandemia e o atual cenário de conflito entre Rússia e Ucrânia. A Rússia, principal exportadora de fertilizantes, torna-se um elo crítico na cadeia de suprimentos desse consumo. Essa interdependência expõe o agronegócio brasileiro a riscos

econômicos e logísticos, ressaltando a necessidade de estratégias para garantir a segurança no abastecimento de fertilizantes (GLOBALFERT, 2021; COELHO, 2023).

Além de questões geopolíticas, a capacidade dos solos brasileiros, como os do Cerrado, em fixar P pode torná-lo indisponível às plantas, onerando ainda mais o custo de produção, devido ao aumento das quantidades de fertilizantes fosfatados que devem ser aplicados. Dessa forma, a indisponibilidade de P às plantas ocasiona alterações metabólicas, prejudicando o fluxo energético e, conseqüentemente, a produtividade (RIBEIRO et al., 2018).

## **2.4 Fósforo no solo**

O fósforo (P) é o segundo elemento mineral de maior importância para um bom desenvolvimento vegetal, sendo fundamental para chegar a níveis adequados de produtividade, principalmente para cultura do milho. Embora seja abundante na natureza, é pouco móvel no solo, tornando-o inacessível, principalmente devido à fixação ou à adsorção de P nos solos com alto grau de intemperismo e com elevados teores de óxidos de ferro e alumínio, presentes nos minerais de argila que são capazes de reter o fósforo, na fração sólida do solo, por meio dos seus sítios de adsorção (PELEJA et al., 2020; VIEIRA, 2021; YAHYA et al., 2021). Em suma, os solos brasileiros agricultáveis têm alto grau de intemperismo e são ácidos, tornando as formas de P no solo indisponíveis para as plantas (OLIVEIRA et al., 2009; ABREU, 2014).

O P é um nutriente primordial, pois faz parte de diversos compostos nos vegetais, como, na constituição de ácidos nucleicos (DNA e RNA), de fosfolípidios das membranas celulares e dos componentes de ADP e de ATP, que são moléculas relacionadas aos fenômenos de armazenamento e de transferência de energia nas células, da maior parte dos seres vivos (TAIZ et al., 2017).

As plantas bem supridas de P apresentam uma resistência aprimorada contra doenças, baixas temperaturas e déficit hídrico (PENATTI, 2013). Em geral, os níveis adequados de fósforo nas plantas variam de 0,5 a 3,0 g kg<sup>-1</sup> de matéria seca, com uma faixa considerada ideal para o crescimento normal, situando-se entre 1,0 e 1,5 g kg<sup>-1</sup> (DECHEN e NACHTIGALL, 2006). A deficiência de fósforo nas plantas se manifesta através de um leve arroxeadado nas extremidades e na nervura central das folhas, resultando em um porte limitado das plantas. Essa condição ocorre devido ao papel crucial nas funções estruturais, nos processos de transferência e no armazenamento de energia. Essa escassez afeta principalmente plantas com caules finos, com folhas pequenas e com crescimento lateral reduzidos (SICHOCKI et al., 2014). Como se

desloca rapidamente dos tecidos mais antigos para os mais jovens, a falta de P se manifesta inicialmente nas partes mais baixas da planta, ou seja, nas folhas mais antigas.

No caso do milho, embora a necessidade de P seja menor em comparação com o nitrogênio (N) e o potássio (K), as doses recomendadas são elevadas devido à eficiência reduzida. Cerca de 20 a 30% do P, aplicado como forma de adubação em solos considerados argilosos, é realmente utilizado pela cultura. Essa ocorrência é por causa da alta capacidade de adsorção do P adicionado ao solo, o que reduz sua disponibilidade para as plantas (CORRÊA et al., 2004; FANCELLI, 2004; CORRÊA et al., 2008).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Cepas de *Bacillus*

Seis cepas de microrganismos do gênero *Bacillus* sp. foram reativadas e avaliadas quanto à sua pureza. Entre elas, a cepa B116, que foi isolada da rizosfera de genótipos de milho. Essa cepa é amplamente caracterizada por seus mecanismos de solubilização de fósforo (P) e pela promoção do crescimento vegetal, sendo identificada como *Bacillus thuringiensis*. Estudos anteriores demonstraram sua eficácia na melhoria do desenvolvimento de plantas, principalmente em relação à disponibilidade de nutrientes e ao aumento da produtividade agrícola (OLIVEIRA et al., 2009; de ABREU et al., 2017; VELLOSO et al., 2020).

As cepas B1719, B1716, B1733 e B1734 foram isoladas de compostagem orgânica, proveniente de uma área de produção de hortaliças monitorada pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais (EMATER/MG). Essas cepas foram caracterizadas como termofílicas e termotolerantes, sendo identificadas como *Bacillus subtilis* (B1719, B1716 e B1733) e *Bacillus megaterium* (B1734) (COTTA et al., 2023). O isolado endofítico B2106, proveniente de milho, foi identificado como *Bacillus megaterium* (de ABREU et al., 2017). Além disso, o produto comercial BiomaPhos®, registrado sob o número PR 000497-9.000045, composto por duas cepas, *Bacillus megaterium* B119 e *Bacillus subtilis* B2084, foi utilizado como controle positivo (de OLIVEIRA-PAIVA et al., 2024).

Todas as bactérias testadas pertencente a Coleção Microbiana Multifuncional e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas/MG. As cepas foram reativadas e incubadas a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ , durante 3 dias, em placas de petri contendo meio de cultura Agar Nutriente: Extrato de Carne ( $1,0\text{ g L}^{-1}$ ), extrato de levedura ( $2,0\text{ g L}^{-1}$ ), peptona ( $5,0\text{ g L}^{-1}$ ),

cloreto de sódio ( $5,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e ágar ( $15,0 \text{ g L}^{-1}$ ), utilizando-se o método de estrias para obtenção de colônia pura dos isolados.

### **3.2 Descrição das áreas experimentais**

Os experimentos foram conduzidos durante as safras de 2023/2024 no campo experimental da Embrapa Milho e Sorgo, localizado em Sete Lagoas/MG, nas coordenadas geográficas  $19^{\circ} 27' 14.65''$  de latitude sul,  $44^{\circ} 10' 39.61''$  de longitude oeste e altitude de 739 metros. O solo da região é classificado como Latossolo Vermelho típico, fase cerrado, com baixo teor de fósforo. De acordo com Köppen e Geiger o clima é classificado como Aw, caracterizado por ser tropical semiúmido, com verões chuvosos e com invernos secos (ALVARES et al., 2013). A segunda região experimental foi a Embrapa Arroz e Feijão, em Santo Antônio de Goiás/GO (latitude  $16^{\circ}28' \text{ S}$ , longitude  $49^{\circ}17' \text{ W}$  e altitude de 766 metros), onde o clima também é classificado como Aw, típico do cerrado tropical. A precipitação na região ocorre principalmente entre outubro e abril, com temperaturas médias de  $24^{\circ}\text{C}$  e precipitação de 194 mm, enquanto o período seco se estende de maio a setembro, com temperaturas médias de  $22^{\circ}\text{C}$  e precipitação de 21 mm (CARDOSO et al., 2014).

Em Sete Lagoas, os experimentos foram conduzidos em solo agrícola de baixo fósforo, do tipo Latossolo Vermelho distrófico típico, fase cerrado. Em Santo Antônio de Goiás, os experimentos foram realizados em solo agrícola de fertilidade construída, classificado como Latossolo Vermelho-Escuro, textura argilosa, fase cerradão subperenifólio (EMBRAPA, 2013).

A correção do solo foi recomendada de acordo com a análise química do solo, de cada região (Tabela 1). A adubação de plantio efetuou-se uma adubação básica aplicada via sulco de plantio, constituída de  $300 \text{ kg ha}^{-1}$  do formulado 20-00-20 (NPK), sendo que a adubação de cobertura foi aplicada parcelada com o N (ureia), aos 15 e aos 30 dias após a semeadura ( $150 \text{ kg ha}^{-1}$  por aplicação). Já a adubação fosfatada foi dividida em 3 níveis: sem aplicação adicional de  $\text{P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$ ;  $50 \text{ kg P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$ ) e  $100 \text{ kg P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$ . A fonte empregada foi super fosfato triplo com teores de 41% de  $\text{P}_2\text{O}_5$  e 7 a 12% de Ca. As características químicas dos solos estão representadas na Tabela 1.

**Tabela 1** - Análise química do solo dos locais onde foram conduzidos os experimentos.

<b>Local</b>	<b>Sete Lagoas/MG</b>	<b>Santo Antônio de Goiás/GO</b>
pH H <sub>2</sub> O	5,63	6,0
P <sub>Mehlich-1</sub> (mg dm <sup>-3</sup> )	10,03	15,9
K (mg dm <sup>-3</sup> )	107,08	257,3
Ca (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	3,85	3,89
Mg (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,77	1,67
Al (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,13	0,01
H+Al (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	3,0	9,68
SB (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	4,89	6,22
V (%)	62,07	64,3
MO (dag kg <sup>-1</sup> )	2,03	3,42

pH: potencial hidrogeniônico; P: fósforo; K: potássio; Ca: cálcio; Mg: manganês; Al: alumínio; H+Al: acidez potencial; SB: soma de bases; V: saturação de bases; M.O.: matéria orgânica. (Embrapa,2013).

### **3.3 Delineamento experimental**

Os experimentos foram organizados em delineamento experimental, em blocos casualizados (DBC), composto por 11 tratamentos, sendo oito cepas bacterianas, três doses de fertilização fosfatada e três repetições. Os tratamentos indicados como B0 não receberam inoculação, conforme indicado na Tabela 2. Cada parcela foi composta por seis linhas de plantio, com espaçamento de 0,7 m entre linhas e 0,20 m entre plantas. A semeadura foi realizada com as sementes de Milho o híbrido KWS, RB9006 VT PRO. O controle de pragas e de doenças e os demais tratos culturais foram realizados conforme recomendação para a cultura (ALVARENGA et al., 2010).

**Tabela 2** - Descrição dos tratamentos usados nos experimentos em campo.

Tratamentos	Inoculantes	Doses de P
1	B0	Sem adição de P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
2	B0	50 kg ha <sup>-1</sup> P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
3	B0	100 kg ha <sup>-1</sup> P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
4	BiomaPhos <sup>®</sup>	
5	B119+B2084+B116	
6	B2106	
7	B1719	
8	B1716	50 kg ha <sup>-1</sup> P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
9	B1733	
10	B1734	
11	B116	

Descrição dos tratamentos utilizados: T1- Sem inoculação e P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; T2- Sem inoculação + 50 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; T3- Sem inoculação + 100 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; T4- Controle positivo produto comercial BiomaPhos<sup>®</sup> composto pelas cepas *B. megaterium* (B119) + *B. subtilis* (B2084); T5- *B. megaterium* (B119) + *B. subtilis* (B2084), + *B. thuringiensis* (B116); T6- *B. megaterium* (B2106); T7- *B. subtilis* (B1719); T8- *B. subtilis* (B1716); T9- *B. subtilis* (1733); T10- *B. megaterium* (B1734); T11- *B. thuringiensis* (B116).

### 3.4 Preparo e aplicação dos inoculantes

Foi utilizado o inoculante comercial BiomaPhos<sup>®</sup>, cedido pela empresa Bioma. Esse inoculante é composto por duas cepas de *Bacillus* (*B. subtilis* CNPMS B2084 e *B. megaterium* CNPMS B119) que integram a Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatógenos (CMMF), da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas/MG.

Para o preparo dos inoculantes, os microrganismos foram crescidos em caldo nutritivo *Trypticase Soy Broth* (TSB) por três dias, a 28±2°C, sob agitação constante de 120 rpm. Após o período de desenvolvimento, as culturas foram centrifugadas por 10 minutos, a 8000 rpm e ressuspensas em solução salina [0,85% (m/v) NaCl]. As suspensões bacterianas foram ajustadas em espectrofotômetro, padronizando à absorvância igual a 1, em comprimento de onda de 540 nm, ajustando para a mesma concentração do inoculante comercial de 4x10<sup>9</sup> células mL<sup>-1</sup>. Os inoculantes foram aplicados na semente de milho antes do plantio e, para melhor aderência dos microrganismos nas sementes, foi usado o adesivo comercial no momento da inoculação, na dosagem de 100 g para 1,5 L de inoculante, de acordo com a dose recomendada pelo fabricante.

### **3.5 Características agronômicas avaliadas**

Para avaliar a produtividade de grãos, as espigas foram colhidas nas quatro linhas centrais de cada parcelas e tratamento, no final do ciclo da cultura (150 dias após o plantio). Retirou-se toda a palha das espigas, e procedeu-se a debulha dos grãos de cada parcela. Posteriormente foi determinado o peso de grãos, o qual foi corrigido para umidade 13% e sendo a produtividade expressa em  $\text{kg ha}^{-1}$ . O rendimento relativo para cada tratamento foi calculado como base no rendimento médio do tratamento dividido pelo rendimento médio do tratamento com  $100 \text{ kg P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$ . Os resultados foram convertidos em porcentagem (%) multiplicando-se o decimal por 100, variando de 0 a 100%. Valores acima de 100% indicaram rendimentos superiores aos controles (de OLIVEIRA-PAIVA et al., 2024).

### **3.6. Análise estatística**

Os dados foram analisados pelo teste de análise variância (ANOVA), em caso de significância as médias foram comparadas pelo teste de (SCOTT-KNOTT, 1974) ( $p \leq 0,05$ ), no software computacional Sisvar versão 5.8 (FERREIRA, 2019).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Produtividade de grãos de milho**

Os resultados obtidos para produtividade de grãos na região de Sete Lagoas/MG foram significativos, destacando os tratamentos com as cepas com inoculações simples T6-  $8129,26 \text{ kg ha}^{-1}$ ; T11-  $7902,14 \text{ kg ha}^{-1}$ ; T10-  $7774,77 \text{ kg ha}^{-1}$ , que superaram o controle T2-  $6729,45 \text{ kg ha}^{-1} \text{ P}_2\text{O}_5$  ( $50 \text{ kg ha}^{-1} \text{ P}_2\text{O}_5$ , sem inoculação). Em comparação com a dose recomendada de adubação com  $100 \text{ kg ha}^{-1}$  de  $\text{P}_2\text{O}_5$ , houve um incremento médio de produtividade relativa em torno de 12%, 9%, 7%, respectivamente (Tabela 3).

**Tabela 3** - Produção de grãos de milho (kg ha<sup>-1</sup>) em função da inoculação simples ou mista de *Bacillus* na região de Sete Lagoas/MG. Valores médios de três repetições.

<b>Tratamentos</b>	<b>* Produtividade média (kg ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>Produtividade relativa (%) **</b>
T1- B0 Sem adição de P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	5157,39 c	-
T2- B0 50 kg ha <sup>-1</sup> P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	6729,45 b	-
T3- B0 100 kg ha <sup>-1</sup> P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	7245,00 b	-
T4- BiomaPhos <sup>®</sup>	7244,18 b	-
T5- B119+B2084+B116	7140,08 b	-
T6- B2106 <i>B. megaterium</i>	8129,26 a	112
T7- B1719 <i>B. subtilis</i>	7167,06 b	-
T8- B1716 <i>B. subtilis</i>	7258,18 b	-
T9- B1733 <i>B. subtilis</i>	7300,68 b	101
T10- B1734 <i>B. megaterium</i>	7774,77 a	107
T11- B116 <i>B. thuringiensis</i>	7902,14 a	109

\*As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferiram significativamente pelo teste Scott- Knott (p≤0,05). \*\* Produtividade relativa (%) em relação ao controle com 100% de P.

A produtividade alcançada em Santo Antônio de Goiás/GO foi positiva entre os tratamentos T6; T8; T9; T10; e T11, destacando a inoculação simples, que não diferiu estatisticamente da dose 100 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, exceto o T7 que foi inferior. Entretanto, vale destacar o tratamento T10- B1734 como a maior produtividade entre as inoculações simples. Outro resultado evidente, foi a inoculação tripla do tratamento T5, que obteve um incremento de produtividade de 1175,20 kg ha<sup>-1</sup>, em relação ao controle T2, que apresentou produtividade de 8608,75 kg ha<sup>-1</sup>. Além disso, ao comparar o T4- (Controle positivo) com o tratamento T5, houve um acréscimo de produtividade de 183,24 kg ha<sup>-1</sup>, correspondente a 3 sc ha<sup>-1</sup> (Tabela 4).

**Tabela 4** - Produtividade de grãos de milho (kg ha<sup>-1</sup>) em função da inoculação simples ou mista de *Bacillus* na região de Santo Antônio de Goiás/GO. Valores médios de três repetições.

Tratamentos	* Produtividade média (kg ha <sup>-1</sup> )	Produtividade relativa (%) **
T1- B0 Sem adição de P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	7538,83 c	-
T2- B0 50 kg ha <sup>-1</sup> P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	8608,75 b	-
T3- B0 100 kg ha <sup>-1</sup> P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	10343,85 a	-
T4- BiomaPhos®	9600,71 a	-
T5- B119+B2084+B116	9783,95 a	-
T6- B2106 <i>B. megaterium</i>	9311,93 a	-
T7- B1719 <i>B. subtilis</i>	8902,14 b	-
T8- B1716 <i>B. subtilis</i>	9517,60 a	-
T9- B1733 <i>B. subtilis</i>	9484,81 a	-
T10- B1734 <i>B. megaterium</i>	9544,79 a	-
T11- B116 <i>B. thuringiensis</i>	9510,20 a	-

\*As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferiram significativamente pelo teste Scott- Knott (p≤0,05). \*\* Produtividade relativa (%) em relação ao controle com 100% de P.

## 5. DISCUSSÃO

A produtividade do milho inoculada com as cepas de *Bacillus*, na região de Sete Lagoas/MG, demonstram potencial significativo sobre o acréscimo na produção, uma vez que mesmo usando a dosagem reduzida de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, a produtividade foi equivalente a 100 kg ha<sup>-1</sup>. A análise dos dados revela que essa abordagem não só aumenta a produtividade, mas também pode contribuir para uma possível redução do uso de fertilizantes fosfatados, resultando em menor custo de produção e impacto ambiental. Além disso, as cepas de *B. thuringiensis* B116; *B. megaterium* B2106; e *B. megaterium* B1734, quando inoculadas individualmente, alcançaram produtividades superiores às obtidas com a inoculação mista (Tabela 4). Esses achados são consistentes com estudos anteriores que destacam a eficiência das cepas de *Bacillus* como promotoras de crescimento de plantas, capazes de aumentar a disponibilidade de nutrientes no solo e de melhorar a absorção pelas plantas por distintos mecanismos (VESSEY, 2003; IDRIS et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2021; de OLIVEIRA-PAIVA et al., 2024).

Em Santo Antônio de Goiás/GO, a inoculação das cepas de *Bacillus* com metade da dose recomendada de P para milho (50kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) obteve efeito positivo na produção, alcançando maiores rendimentos e sendo igual estatisticamente à dosagem recomendada (100 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). O uso de inoculantes compostos pelas cepas de *Bacillus*, como relatado no trabalho de Oliveira-Paiva et al. (2024), demonstraram que a inoculação e a coinoculação

aumentaram a solubilização do P, melhorando o aproveitamento do mesmo pela cultura do milho, resultando em elevado teor de P nos grãos. Em contrapartida, solos com a fertilidade construída, como é caso dessa região, apresentaram efeitos residuais cumulativos de fertilizantes que potencializam determinados atributos químicos de fertilidade.

Para a região de Sete Lagoas/MG, o solo apresentou baixo teor de P. Entretanto é possível notar que a eficiência das cepas nessa área foi maior. Essa observação está alinhada com a literatura, que relata uma maior resposta das plantas à inoculação em condições de baixa fertilidade do solo (RICHARDSON, 2001; RICHARDSON et al., 2009; LEGGETT et al., 2015; de OLIVEIRA-PAIVA et al., 2024). Outro fator relevante nessa área, é a dosagem recomendada de 100 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, tradicionalmente utilizada para assegurar alta produtividade, não foi estatisticamente superior à dose de 50 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> combinada com a inoculação das cepas de *Bacillus*.

Os resultados indicam que o uso das inoculações simples e mista, em sementes de milho, tem potencial de incrementar a produtividade dessa cultura, e possivelmente, maximizar a disponibilidade e a eficiência de uso de P que encontra indisponível no solo, possibilitando até mesmo, com avanços nessa linha de pesquisa, pensar na redução da quantidade de fertilizante aplicados, sem comprometer a produtividade. Estudos similares apontam a capacidade das bactérias solubilizadoras de fósforo em aumentar a disponibilidade desse nutriente para as plantas, promovendo o crescimento e o rendimento das culturas como por exemplo, milho e soja (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999; KHAN et al., 2009; de OLIVEIRA-PAIVA et al., 2024).

Os mecanismos de promoção do crescimento vegetal, expressos pelas cepas de *Bacillus* utilizadas nos experimentos de campo, corroboram para compreensão dos resultados no aumento da produtividade. A produção de ácido indol-3-acético (AIA) pelas cepas B1734 e B116, desempenha um papel crucial no estímulo ao crescimento radicular, promove a alongação celular e a formação de raízes laterais, resultando em um sistema radicular mais denso e extenso, o que aumenta a capacidade da planta de explorar o solo e de absorver água e nutrientes. (EGAMBERDIEVA et al., 2017). Essa resposta pode estar relacionada com o aumento médio de 8,8 e 10,9 sc ha<sup>-1</sup>, em comparação ao T3-100kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, na região de Sete Lagoas/MG.

Além disso, a formação de biofilme, observada de forma destacada na cepa B2106, está associada a um aumento médio expressivo de 14,7 sc ha<sup>-1</sup>, seguido pela cepa B116 com 10,9 sc ha<sup>-1</sup>, em comparação ao tratamento T3- 100 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Esse fenômeno pode estar relacionado à maior adesão das bactérias às raízes, o que intensifica a interação micróbio-planta

e seus mecanismos de promoção do crescimento, como a solubilização de fosfatos e a produção de fitohormônios. A produção de sideróforos e de exopolissacarídeos (EPS) por todas as cepas analisadas, desempenha um papel fundamental, facilitando a formação de biofilmes e oferecendo benefícios adicionais, como a criação de barreiras físicas contra patógenos, a retenção de água, e a mitigação da toxicidade de metais pesados no solo. Essas características tornam essas cepas superiores ao inoculante comercial, cuja formulação confere eficiência, mas ainda fica aquém dos resultados obtidos com as cepas testadas, que demonstraram maior eficácia nos mecanismos de promoção de crescimento (KNIGHTS et al., 2021; TIA et al., 2021; de OLIVEIRA-PAIVA et al., 2024).

## 6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a adoção da inoculação com cepas específicas de *Bacillus*, aliada à redução da adubação fosfatada, apresenta-se como uma estratégia eficaz para aumentar a produtividade do milho, ao melhorar a eficiência no uso de fertilizantes, reduzir custos de produção e minimizar o impacto ambiental. Os resultados demonstraram que, mesmo com a aplicação reduzida de  $P_2O_5$ , as cepas analisadas, como *Bacillus thuringiensis* B116, *Bacillus megaterium* B2106 e *Bacillus megaterium* B1734, foram capazes de aumentar a produtividade do milho de forma equivalente ou superior às práticas convencionais, especialmente em solos de baixa fertilidade. Na região de Santo Antônio de Goiás, a mistura das três cepas B119+B2084+B116 apresentou desempenho superior ao inoculante comercial, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa.

Os mecanismos de promoção do crescimento, como a produção de ácido indolacético (AIA), formação de biofilmes, produção de sideróforos e exopolissacarídeos (EPS), contribuíram para a melhoria da absorção de nutrientes, especialmente em condições de baixa disponibilidade de fósforo no solo. Esses resultados sugerem que o uso de inoculantes à base de *Bacillus* pode não apenas aumentar a produtividade agrícola, mas também reduzir a necessidade de fertilizantes químicos, promovendo uma agricultura mais sustentável e econômica. Assim, essas cepas apresentam grande potencial como inoculantes promissores, contribuindo para práticas agrícolas mais sustentáveis.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABREU, C. S. **Seleção e caracterização de bactérias endofíticas isoladas de plantas de milho com potencial para a biossolubilização de rochas fosfáticas**. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias) – Universidade Federal de São João del-Rei, Sete Lagoas, MG. p.47. 2014.
- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University. Science**, v. 26, n. 1, p. 1-20, 2014.
- ALVARES, C. A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>.
- ALVARENGA, R. C. et al. Cultivo do milho. Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**, 5226-2016. 2010.
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS (Brasil). Principais indicadores do setor de fertilizantes: janeiro de 2024. São Paulo: Anda, 2021. Disponível em: <https://anda.org.br/arquivos/.pdf>. Acesso em: 28 fev. 2024.
- AYDINOGLU, F.; ILTAS, O.; AKKAYA, O. Inoculation of maize seeds with *Pseudomonas putida* leads to enhanced seedling growth in combination with modified regulation of miRNAs and antioxidant enzymes. **Symbiosis (Philadelphia, Pa.)**, v. 81, n. 3, p. 271-285, 2020.
- BECKMAN, J.; RICHE, S. Changes to the natural gas, corn, and fertilizer price relationships from the biofuels era. **Journal of agricultural and applied economics**, v. 47, n. 4, p. 494-509, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s13199-020-00703-x>.
- CARDOSO, M. R. et al. Classificação climática de köppen-Geiger para o estado de Goiás e o Distrito Federal, **Acta Geografica**, v. 16, p. 40-55, 2014.
- CARDOSO, I.; KUYPER, T. Mycorrhizas and tropical soil fertility. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 116, n. 1-2, p. 72-84, 2006.
- COÊLHO, J. D. Caderno setorial ETENE: Milho. Disponível em: [https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/1895/1/2023\\_CDS\\_315.pdf](https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/1895/1/2023_CDS_315.pdf). 2023. Acesso em: 23 mai. 2024.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, Brasília, DF, v. 8, safra 2020/21, n. 12. 2021. Décimo segundo levantamento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira – grãos Décimo primeiro levantamento, julho 2023 – safra 2022/2023. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento. 2013. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: 04 out. 2023.

CORRÊA, J. C.; MAUAD, M.; ROSOLEM, C. A. Fósforo no solo e desenvolvimento de soja influenciados pela adubação fosfatada e cobertura vegetal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 12, p. 1231-1237, dez. 2004.

CORRÊA, R. M.; NASCIMENTO, C. W. A.; FREIRE, F. J.; SOUZA, S. K. S. C.; FERRAZ, G. B. Disponibilidade e níveis críticos de fósforo em milho e solos fertilizados com fontes fosfatadas. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.3, p. 218-224, 2008.

COTTA, S. P. M. et al. Thermo-resistant enzyme-producing microorganisms isolated from composting. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, 2023.

de ABREU, C. S. et al. Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 16, n. 1, 2017.

de OLIVEIRA-PAIVA, C. A. et al. Inoculation with *Bacillus megaterium* CNPMS B119 and *Bacillus subtilis* CNPMS B2084 improve P-acquisition and maize yield in Brazil. **Frontiers in microbiology**, v. 15, 2024. Doi: 10.3389/fmicb.2024.1426166. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2024.1426166>>.

de SOUSA, S. M. et al. Tropical *Bacillus* strains inoculation enhances maize root surface area, dry weight, nutrient uptake and grain yield. **Journal of plant growth regulation**, v. 40, n. 2, p. 867-877, 2021 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00344-020-10146-9>>.

DECHEN, ANTONIO ROQUE e NACHTIGALL, GILMAR RIBEIRO. Micronutrientes. Nutrição Mineral de Plantas. Tradução. Viçosa: **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo**, 2006. p. 328-354. Acesso em: 25 nov. 2023.

EMBRAPA SOLOS, E. **Sistema brasileiro de classificação de solos. Centro Nacional de Pesquisa de Solos: 2013.**

EGAMBERDIEVA, D. et al. Phytohormones and beneficial microbes: Essential components for plants to balance stress and fitness. **Frontiers in microbiology**, v. 8, 2017.

FANCELLI, A. L. **Fenologia do milho**. <http://www.faeg.com.br>. 15 mai. 2004.

FAO. Food and agriculture Organization of the United Nations. The statistic Division- FAOSTAT Paris. 2022. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/>> Acesso em: 30 jul. 2023.

FARIAS, P. I. V. et al. Input assurance for Brazilian food production. **Fertilizer Focus**, v. 38, p. 52-54, 2021.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs: Sisvar. **Revista Brasileira de Biometria**, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450>>.

FIESP. Safra Mundial de Milho 2022/23 - 10º Levantamento do USDA. Disponível em: <<https://www.fiesp.com.br/arquivo-download/?id=288086>>. Acesso em: 16 jun. 2024.

GUIDINELLE, R. B. et al. **Impact of historical soil management on the interaction of plant-growth-promoting bacteria with maize (*Zea mays* L.)**. *Heliyon*, v. 10, n. 7, 2024.

GLOBALFERT. Boletins Informativos. 2º Reporte anual do mercado de fertilizantes, 2021. Disponível em: <https://globalfert.com.br/outlook-globalfert/>. Acesso em: 05 mai. 2023.

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 & environment**, v. 221, p. 125-131, 2016.

IDRIS, E. E. et al. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Molecular plant-microbe interactions: MPMI**, v. 20, n. 6, p. 619-626, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1094/mpmi-20-6-0619>>.

JIAO, Y.; CHEN, H. D.; HAN, H., & CHANG, Y. Development and utilization of corn processing by-products: **A review**. *Foods*, 11(22), 3709. 2022.

KALAYU, G. Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. Microorganismos solubilizadores de fosfato: abordagem promissora como biofertilizante. Microorganismos solubilizadores de fosfato: enfoque prometedor como biofertilizantes. **International Journal of Agronomy**, 2019.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. (EDS.). **Microbial strategies for crop improvement**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009.

KNIGHTS, H. E. et al. Deciphering bacterial mechanisms of root colonization. **Environmental microbiology reports**, v. 13, n. 4, p. 428-444, 2021.

LAMAS, F. M. A evolução da agricultura do Brasil. Embrapa Agropecuária Oeste. Dourados: MS, 2023. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/noticia/81665485/artigo---a-evolucao-da-agricultura-do-brasil#:~:text=Em%202022%2C%20a%20agricultura%20participou,maior%20exportador%20mundial%20de%20algod%C3%A3o.> > Acesso em: 22 jun. 2024.

LEGETT, M. et al. Resposta da produtividade do milho a um inoculante microbiano solubilizador de fósforo em ensaios de campo. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 153, n. 8, p. 1464-1478, 2015.

LOBO, LAIANA LANA BENTES. Potencial de bactérias endofíticas na promoção do crescimento em plantas de milho. 2018. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/155924>>. Acesso em: 03 mar. 2023.

MARTINS, F. B et al. CLASSIFICAÇÃO CLIMÁTICA DE KÖPPEN E DE THORNTHWAITE PARA MINAS GERAIS: CENÁRIO ATUAL E PROJEÇÕES FUTURAS. **Revista Brasileira de Climatologia**, v. 1, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5380/abclima.v1i0.60896>>.

NOGUEIRA, V. S. Desempenho produtivo de híbridos de milho submetidos à aplicação foliar de magnésio. 2021. 23 f. tcc (doutorado) - Curso de Agronomia. **Instituto Federal Goiano**, 2022.

OGINO, C. M. et al. Relação dinâmica: Fertilizantes minerais e agricultura brasileira, Texto para Discussão, Nº. 2928, **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA)**, Brasília. 2023.

OGINO, C. M.; COSTA JUNIOR, G.; POPOVA, N. D.; MARTINES FILHO, J. G. Poder de compra, preço e consumo de fertilizantes minerais: uma análise para o centro-oeste brasileiro. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 59, n. 1, 2021. DOI 10.1590/1806-9479.2021.220367. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9479.2021.220367>.

OLIVEIRA, C. A. et al. Microrganismos solubilizadores de fosfato isolados da rizosfera do milho cultivado em um latossolo do Bioma Cerrado brasileiro. **Biol do Solo Bioquímico**, v. 41, p. 1782-1787, 2009.

OLIVEIRA, C. A. et al. Metodologia de aplicação de microrganismos solubilizadores de fósforo em sementes visando melhor aproveitamento deste nutriente pelas plantas. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 88, 2013.

OLIVEIRA, C. A. et al. Recomendação agrônômica de cepas de *Bacillus subtilis* (CNPMS B2084) e *Bacillus megaterium* (CNPMS B119) na cultura do milho. **CIRCULAR TÉCNICA**, p. 1-19, 2020a.

OLIVEIRA, C. A. et al. Viabilidade Técnica e Econômica do Biomaphos® (*Bacillus subtilis* CNPMS B2084 e *Bacillus megaterium* CNPMS B119) nas Culturas de Milho e Soja. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 210, p. 1-20, 2020b.

OLIVEIRA-PAIVA, C. et al. Validação da recomendação para o uso do inoculante BiomaPhos® (*Bacillus subtilis* CNPMS B2084 e *Bacillus megaterium* CNPMS B119) na cultura de soja. Sete Lagoas, MG: **CIRCULAR TÉCNICA**. v. 279. 2021.

OLIVEIRA, J. F.; COLE, M. A. **Ciclos dos Solos: Carbono, Nitrogênio, Fósforo, Enxofre, Micronutrientes**, 2ª edn. Hoboken, NJ: John Wiley e Filhos, 1999.

OLIVEIRA, J. J. et al. Extração de zein de milho, produtos de milho e coprodutos e modificações para várias aplicações: Uma revisão. **Cereais Chem.** 88, 159-173. 2011.

ONU. População mundial deve chegar a 9,7 bilhões de pessoas em 2050, diz relatório da. Disponível em: <<https://brasil.un.org/pt-br/83427-popula%C3%A7%C3%A3o-mundial-deve-chegar-97-bilh%C3%B5es-de-pessoas-em-2050-diz-relat%C3%B3rio-da-onu>>. 2019. Acesso em: 16 jun. 2024.

PELEJA, V. L.; REGO, A. K. C.; da SILVA JÚNIOR, M. L.; FURTADO, A. C. S.; FELSEMBURGH, C. A.; & TRIBUZY, E. S. Interferência do alumínio no crescimento radicular, absorção e acúmulo de fósforo em plantas de paricá. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 11, n. 1, p. 1-8, jan. 2020.

PENATTI, C. P. **Adubação da cana-de-açúcar: 30 anos de experiência**. Itui: Otoni, 347 p. 2013.

RANUM, P., PEÑA-ROSAS, J. P., & GARCIA-CASAL, M. N. Global maize production, utilization, and consumption. **Annals of The New York Academy of Sciences**, 1312, 105-112. 2014.

RIBEIRO, V. P. et al. Endophytic *Bacillus strains* enhance pearl millet growth and nutrient uptake under low-P. **Brazilian journal of microbiology**, v. 49, p. 40-46, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2018.06.005>>.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Functional plant biology: FPB**, v. 28, n. 9, p. 897, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1071/pp01093>>.

RICHARDSON, A. E. et al. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and soil**, v. 321, n. 1-2, p. 305-339, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2>>.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology advances**, v. 17, n. 4-5, p. 319-339, 1999. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0734-9750\(99\)00014-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0734-9750(99)00014-2)>.

SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **AMB express**, v. 9, n. 1, p. 205, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>>.

SANTOS, M. S., NOGUEIRA, M. A., & HUNGRIA, M. Outstanding impact of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 on the Brazilian agriculture: Lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 45. 2021.

SANTOYO, G. et al. Plant growth stimulation by microbial consortia. **Agronomy (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 2, p. 219, 2021.

SAHA, M. et al. Microbial siderophores and their potential applications: a review. **Environmental science and pollution research international**, v. 23, n. 5, p. 3984-3999, 2016.

SEIXAS, M. A. A crise dos fertilizantes e o aumento da insegurança alimentar global impactos do conflito Rússia-Ucrânia no mercado de commodities agrícolas. **Brasília: EMBRAPA**, 22 p 2022. Disponível em: <[https://www.embrapa.br/documents/10180/26187851/a+crise+dos+fertilizantes+e+o+aumento+da+inseguran%c3%87a+alimentar+global\\_impactos+do+conflito+russiaucrania+no+mercado+de+commodities+agricolas.pdf/0283733c-bf26-5f6f-6d7b-a971ff35dc53?download=true](https://www.embrapa.br/documents/10180/26187851/a+crise+dos+fertilizantes+e+o+aumento+da+inseguran%c3%87a+alimentar+global_impactos+do+conflito+russiaucrania+no+mercado+de+commodities+agricolas.pdf/0283733c-bf26-5f6f-6d7b-a971ff35dc53?download=true)>. Acesso em: abr. 2024.

SOUZA, A.W.A.; PIRES, G.A. Revisão de literatura: milho. Rio Branco, Acre, 2013.

SICHOCKID et al. Resposta do milho safrinha à doses de Nitrogênio e de Fósforo. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**. 13: 48-58-2014.

SILVA, E. R. et al. Can co-inoculation of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* alleviate adverse effects of drought stress on soybean (*Glycine max* L. Merrill). **Arch Microbiol**, v. 201, p. 325-335, 2019.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SHALINI; VIVEK; LATA, C. *Bacillus*: Plant Growth Promoting Bacteria for Sustainable Agriculture and Environment. Em: SINGH, J.; SHANKAR (Eds.). **Dp. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. Lucknow: Elsevier B.v, 2019. p. 43-55.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed. 918p. 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; Murphy, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TESTA, G.; REYNERI, A.; BLANDINO, M. Aumento da produtividade de grãos de milho através do cultivo de alta densidade de plantas com diferentes espaçamentos entre e intra-linhas. **Revista Europeia de Agronomia**, v. 72, p. 28-37, 2016.

TIAN, J. et al. Roles of phosphate solubilizing microorganisms from managing soil phosphorus deficiency to mediating biogeochemical P cycle. **Biology**, v. 10, n. 2, p. 158, 2021.

VELLOSO, C. C.V. Caracterização de cepas de *Bacillus* e avaliação do seu potencial de promoção de crescimento em genótipos de milho. Dissertação (Mestrado–Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia) – Universidade Federal de São João del Rei, C. C. V. Caracterização de cepas de *Bacillus* e avaliação do seu potencial del-Rei - MG. p. 127. 2019.

VELLOSO, C. C.V. et al. Genome-guided views of tropical *Bacillus* strains efficient in matize growth promotion, **FEMS Microbiology Ecology**, v.96, n.9, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/femsec/fiaa157>>.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1023/a:1026037216893>>.

VIEIRA, N. D. Resposta da soja a fontes e doses de fósforo em solos com diferentes teores de argila. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia / Londrina, 90f. 2021.

YAHYA, M. et al. Differential Root Exudation and Architecture for Improved Growth of Wheat Mediated by Phosphate Solubilizing Bacteria. **Frontiers in microbiology**, 12. 2021.

ZONTA, E. et al. Fertilizantes minerais, orgânicos e organominerais. In: BORGES, A. L. (Ed.). **Recomendações de calagem e adubação para abacaxi, acerola, banana, citros, mamão, mandioca, manga e maracujá**. Brasília: **Embrapa**, p. 263-303. 2021 <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1134679>>. Acesso em: 17 ago. 2024.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesta pesquisa são altamente promissores, indicando que as cepas bacterianas testadas possuem grande potencial como solubilizadoras de fósforo e como promotoras de crescimento vegetal. Os mecanismos de promoção de crescimento observados, como a produção de biofilme, ácido indolacético (AIA), sideróforos e exopolissacarídeos (EPS), sustentam o desempenho positivo dessas cepas tanto em condições controladas na câmara de crescimento, quanto em experimentos de campo. As cepas *Bacillus megaterium* B2106 e *B. megaterium* B1734, em particular, se destacaram pela robusta produção de biofilme, sendo que a B1734 também apresentou uma notável capacidade de produção de AIA.

Em termos de produtividade de grãos de milho, as cepas B2106, B116 e B1734 se sobressaíram, na região de Sete Lagoas/MG, apresentando as maiores produtividades. Na região de Santo Antônio de Goiás/GO, a mistura de três cepas (B119 + B2084 + B116) foi superior ao inoculante comercial, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Mesmo assim, essas cepas mostraram resultados comparáveis à aplicação de 100 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Entretanto, a alta fertilidade do solo na cidade de Goiás, especialmente os níveis elevados de fósforo disponível, pode ter influenciado a eficiência dos microrganismos, o que justifica a ausência de diferenças significativas. Por outro lado, a eficiência dos microrganismos foi notável em solos de baixa fertilidade, como na cidade de Minas Gerais, o que destaca seu potencial aplicação em regiões similares.

Assim, a inoculação com *Bacillus*, associada à redução da adubação fosfatada, surge como uma estratégia próspera para aumentar a produtividade do milho, para reduzir custos com fertilizantes e para promover uma agricultura mais sustentável, especialmente em solos pobres em fósforo.