

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KAYO KENNEDY ALBERNAS

VIABILIDADE AGRONÔMICA DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS  
DE CRESCIMENTO NA CULTURA DO MILHO

CURITIBA-PR

2019

KAYO KENNEDY ALBERNAS

VIABILIDADE AGRONÔMICA DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS  
DE CRESCIMENTO NA CULTURA DO MILHO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

Orientadora: Profa. Dra. Glaciela Kaschuk

Coorientador: Prof. Dr. Volnei Pauletti

CURITIBA

2019

A331v      Albernas, Kayo Kennedy  
Viabilidade agrônômica da inoculação de bactérias promotoras  
de crescimento na cultura do milho / Kayo Kennedy Albernas. -  
Curitiba, 2019.  
38 p.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor  
de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
do Solo.

Orientadora: Glaciela Kaschuk

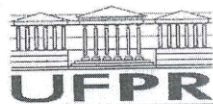
Coorientador: Volnei Pauletti

1. Milho. 2. Bactérias. 3. Nitrogênio - Fixação. 4. Fertilizantes  
nitrogenados. I. Kaschuk, Glaciela (Orientadora). II. Pauletti,  
Volnei (Coorientador). III. Título. IV. Universidade Federal do  
Paraná.

CDU 631.416.1:633.15

Sistema de Bibliotecas/UFPR, Biblioteca de Ciências Agrárias  
Paula Carina de Araújo - CRB9/1562

# TERMO DE APROVAÇÃO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRARIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS DO SOLO -  
40001016014P4

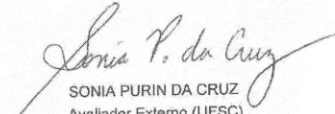
## TERMO DE APROVAÇÃO


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DO SOLO da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de KAYO KENNEDY ALBERNAS intitulada: VIABILIDADE AGRONÔMICA DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO NA CULTURA DO MILHO, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

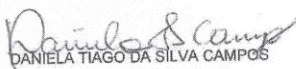
A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 15 de Fevereiro de 2019.

  
GLACIELA KASCHUK  
Presidente da Banca Examinadora

  
SONIA PURIN DA CRUZ  
Avaliador Externo (UFSC)

  
LYGIA VITÓRIA GALLI TERASAWA  
Avaliador Externo (DPTO. GENET)

  
DANIELA TIAGO DA SILVA CAMPOS  
Avaliador Externo (UFMT)

  
VOLNEI PAULETTI  
Avaliador Interno (UFPR)

À minha mãe, Lucia dos Santos Alves, minhas avós Joana Dark Moreira e Maria dos Santos Cruz, dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela perfeita e complexa criação, pela vida plena, saúde e possibilidade de estudar;

À minha mãe pelo apoio, amor, confiança, por entender que a saudade foi o preço pago para realizar um sonho;

Aos professores Cid Tacaoca Muraishi e Evandro Reina, que desde a graduação me apóiam e incentivam a fazer pesquisa, por mostrar que tudo vale a pena quando se faz com amor, quando se faz o que gosta;

À minha orientadora Glaciela Kaschuk, que me mostrou outras formas de estudar e interpretar os processos que ocorrem no solo, por me orientar, pelo amor em ensinar, apoio, incentivo, dedicação, amizade, paciência e pela oportunidade de trabalharmos juntos;

Ao meu co-orientador Volnei Pauletti pela orientação, incentivo, confiança, paciência, e o mais importante, pela amizade construída;

Aos Professores Marcelo Ricardo Lima, Vander de Melo Freitas, Danilo Eduardo Rozane, Juliana Domingues Lima e Renato Marques por contribuírem para a minha formação profissional durante as disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo;

À Professora Fabiane Machado Vezzani pela sugestão de aprimoramento e reflexões sobre a importância do trabalho durante os encontros do Grupo de Estudos em Qualidade do Solo;

Às técnicas de laboratório do Departamento de Solos e Engenharia Agrícola Carla Gomes Albuquerque, Fabiana Gavelaki, Josianne Meyer, Leticia Gonçalves Maduro, Heila Silva de Araújo e Maria Aparecida Carvalho Santos pelo auxílio nas análises laboratoriais e trabalhos administrativos;

Às secretárias Denise de Conti, do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, e Marla Cristina Becker Motta do DSEA pela assistência nos assuntos de secretaria acadêmica;

Aos amigos Ricardo Ribeiro, Diego Rabel, Ederlan Magri, Cleiton Frigo e Mariana Vasconcelos Barroca, um presente do mestrado, Gustavo Pereira Valani, Tatiana Suzin Lazeris, Etienne Winagraski, Caroline Lima de Matos, Ana Eliza Rielli, Lucas Wagner, Isabelle Pansolin e Letícia Ripka e pela ajuda nos trabalhos de campo e de laboratório;

À Professora Lygia Vitoria Galli Terasawa por disponibilizar as bactérias utilizadas no experimento, pelo auxílio técnico na instalação e cuidado dos experimentos e pela contribuição intelectual na etapa de elaboração do experimento;

Ao Doutor Francisco Terasawa Junior por disponibilizar a equipe de sua empresa (Vertika Agropecuária Ltda) para trabalhar durante a instalação e condução dos experimentos, e por garantir o custeio de arrendamento da área e material utilizados no experimento em Campo Largo;

Ao Senhor André Floriani Kniphoff e sua empresa (Total Biotecnologia Indústria e Comércio S.A) pelo custeio de arrendamento da área e material utilizados no experimento em Lapa, e à sua equipe de trabalho Cesar Kersting, Juliana Marcolino Gomes, André Nakatani e Joatan Césare Andrades Clamer pelo auxílio técnico na instalação e condução do experimento e pela troca de experiência teórico-prática;

À Universidade Federal do Paraná, ao Departamento de Solos e Engenharia Agrícola e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pela infraestrutura e apoio laboral e, principalmente, pela oportunidade de cursar o Mestrado em Ciência do Solo;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida em doze meses de estudos;

Aos membros convidados para a banca de defesa por sugerirem modificações e proporem reflexões sobre o trabalho apresentado nessa dissertação;

A todos, muito obrigado!

Sou eu que estou mandando que você seja firme e corajoso. Portanto, não tenha medo e não se acovarde, porque Javé seu Deus está com você.

(Josué, 1-9)



## RESUMO

A cultura do milho demanda grande quantidade de fertilizantes, principalmente os nitrogenados, potencializando os danos ambientais e riscos dos prejuízos financeiros na produção agrícola. Uma alternativa para manter altas produtividades do milho sem aumentar as aplicações de fertilizantes nitrogenados minerais é a utilização de inoculantes bacterianos, que realizam a fixação biológica de nitrogênio, exsudam fitohormônios, estimulam o crescimento das raízes, aumentando a absorção de nutrientes pelas plantas e podem solubilizar fosfato do solo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência agrônômica da inoculação e coinoculação de dois gêneros de bactérias promotoras de crescimento vegetal, *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6) e *Bacillus* LGMB 319, e *Bacillus* LGMB 326 na cultura do milho cultivado em campo. Os experimentos foram realizados em duas estações de pesquisa no Estado do Paraná, uma localizada no município de Campo Largo e a outra, no município de Lapa. Os tratamentos testaram a aplicação de inoculantes bacterianos nas sementes e de fertilizante nitrogenado na forma de sulfato de amônio (21% N), aplicado no estágio vegetativo V4. Diâmetro do colmo e altura das plantas, massa seca da parte aérea e conteúdo de nutrientes nas folhas foram medidos no estágio da inflorescência feminina. Número de fileiras de grãos por espiga, comprimento das espigas, diâmetro das espigas, massa de mil grãos, rendimento de grãos e conteúdo de nutrientes nos grãos foram medidos no estágio da maturação fisiológica das plantas. Os isolados bacterianos *Bacillus* LGMB 319 e *Bacillus* LGMB 326 podem ser uma alternativa viável ao inoculante *A. brasilense*, ou podem ser coinoculados sem que tragam decréscimos nos componentes de produção, na produtividade de grãos ou no conteúdo de nutrientes da planta. A inoculação isolada de *Bacillus* LGMB 319 e *Bacillus* LGMB 326 ou em coinoculação com *A. brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6) pode aumentar em até 4,8% a produtividade de grãos das plantas inoculadas em relação às plantas não-inoculadas. Porém, a coinoculação das duas estirpes de *Bacillus* (LGMB 319 e LGMB 326) sem *A. brasilense* reduz a produtividade em relação aos outros tratamentos inoculados ou às plantas que receberam fertilizante nitrogenado. Considerando os critérios da legislação vigente no Brasil, os inoculantes de *Bacillus* LGMB 319 e *Bacillus* LGMB 326 são passíveis à produção e comercialização como inoculantes para a cultura do milho, desde que sejam aplicados isoladamente ou coinoculados com *A. brasilense*.

Palavras-chave: inoculantes bacterianos, bioestimulantes e adubação nitrogenada.

## ABSTRACT

The corn crop demands a great quantity of fertilizers, mainly the nitrogenous ones, potentiating the environmental damages and risks of the financial losses in the agricultural production. An alternative to maintaining high yields of maize without increasing nitrogen fertilizer applications is the use of bacterial inoculants, which perform biological nitrogen fixation, exude phytohormones, stimulate root growth, increase nutrient uptake by plants and can solubilize phosphate. The objective of this work was to evaluate the agronomic efficiency of inoculation and co-inoculation of two genera of plant growth promoting bacteria, *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 and Ab-V6) and *Bacillus* LGMB 319, and *Bacillus* LGMB 326 in corn cultivated in the field. The experiments were carried out in two research stations in the State of Paraná, one located in the municipality of Campo Largo and the other in the municipality of Lapa. The treatments tested the application of bacterial inoculants in the seeds and nitrogen fertilizer in the form of ammonium sulfate (21% N), applied in the vegetative stage V4. Stem diameter and height of the plants, dry shoot mass and nutrient content in the leaves were measured at the stage of the female inflorescence. Number of grain rows per spike, ear length, ear diameter, mass of one thousand grains, grain yield and nutrient content in the grains were measured at the stage of physiological maturation of the plants. The bacterial isolates *Bacillus* LGMB 319 and *Bacillus* LGMB 326 may be a viable alternative to the *A. brasilense* inoculant, or they may be co-co-inoculated without bringing decreases in the production components, grain yield or nutrient content of the plant. The isolated inoculation of *Bacillus* LGMB 319 and *Bacillus* LGMB 326 or in co-inoculation with *A. brasilense* (Ab-V5 and Ab-V6) may increase up to 4.8% the grain yield of the inoculated plants in relation to the uninoculated plants. However, the co-inoculation of the two strains of *Bacillus* (LGMB 319 and LGMB 326) without *A. brasilense* reduces productivity in relation to the other inoculated treatments or the plants that received nitrogen fertilizer. Considering the criteria of the legislation in force in Brazil, the inoculants of *Bacillus* LGMB 319 and *Bacillus* LGMB 326 are susceptible to production and commercialization as inoculants for corn, provided they are applied alone or coinoculated with *A. brasilense*.

Keywords: bacterial inoculants, biostimulants and nitrogen fertilization.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	11
2 HIPÓTESE .....	19
3 OBJETIVO .....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	20
5 RESULTADOS.....	24
6 DISCUSSÃO .....	25
7 CONCLUSÃO .....	33
REFERÊNCIAS.....	34

## 1 INTRODUÇÃO

No atual cenário agrícola mundial, o aumento do rendimento das colheitas é uma questão de segurança alimentar e de sustentabilidade, pois é melhor buscar práticas que aumentam a produção por área do que aumentar a área cultivada. Por estes motivos, o modelo produtivo de grãos baseado na monocultura e grandes extensões de terra têm mudado paulatinamente durante os últimos anos. A agricultura tem sido aprimorada com a adoção de sistemas de cultivos duplos e, até mesmo triplos. Materiais vegetais adaptados para cada região e técnicas biológicas também foram incorporados. O cenário na qual os agricultores semeiam a segunda cultura (principalmente milho) no mesmo espaço após a colheita da soja também está impulsionando a produção nacional, sendo que na última safra, esse modelo representou 69,5% da área total do milho colhido no Brasil (CONAB, 2018). Dessa forma, cada vez mais, os profissionais da agricultura têm idealizado tecnologias que sirvam aos sistemas agrícolas de produção, muito mais, do que às culturas individualmente.

De qualquer maneira, a agricultura moderna ainda é altamente dependente dos fertilizantes minerais para aumentar a produção e atender a demanda mundial de alimentos. Apesar das melhorias do melhoramento vegetal na seleção de plantas, das técnicas de manejo agrícola que melhoram a estrutura do solo e das formulações dos nutrientes, os níveis de fertilização mineral permanecem altos (DORAIS, 2007). O sistema agrícola mal manejado acarreta na perda da biodiversidade local, consumo dispendioso de água, aumento das emissões de gases de efeito estufa, eutrofização da biosfera, sobretudo, os corpos d'água, como a salinização de águas subterrâneas e superficiais, degradação do solo e poluição dos rios e altos níveis de insumos químicos (TILMAN, 1999; TOWNSEND, 2003; PRETTY et al., 2018). Neste contexto, as aplicações biológicas que atuam como “hipótese aditiva” para os aumentos de rendimento das culturas inoculadas com bactérias, pode diminuir a dependência dos insumos químicos adicionados na agricultura, além de reduzir os riscos dos fatores bióticos e abióticos, como, veranicos e patógenos.

A produção agrícola é diretamente afetada pela variabilidade climática, sendo o clima o fator que traz mais riscos aos cultivos agrícolas (PERFIRIO et al., 2018). Por isso, é essencial a busca por alternativas que amenizem os

potenciais prejuízos ambientais e financeiros nas áreas cultivadas. Além disso, os aumentos de produtividade estão associados à interação do meio ambiente (clima e solo) e do manejo (material genético, população de plantas, nutrição e proteção de plantas) (ANDREA et al., 2018).

Assim, considerando os aspectos de manejo sob a perspectiva dos sistemas agrícolas de produção, as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) podem contribuir para manutenção da produtividade durante os períodos de escassez de água e contribuir para a melhor utilização dos nutrientes, já que aumentam o volume de raízes para explorar o solo. Além disso, a inoculação é uma tecnologia acessível tanto para pequenos quanto para grandes agricultores.

O milho (*Zea mays* (L.)) é uma gramínea de ciclo anual pertencente à família *Poaceae*. É uma planta muito eficiente na conversão da radiação solar em produção de biomassa, por apresentar mecanismo C4 de fixação de CO<sub>2</sub> e extensa área foliar (TAIZ e ZEIGER, 2013). É um dos principais cereais cultivados no mundo, e no Brasil é produzido em todos os tipos de solo e de clima.

O milho é um cereal de alto valor energético, com uma grande quantidade de amido acumulado no endosperma (GALVÃO et al., 2015). Este grão apresenta utilidades diversas, que vão desde a alimentação animal, por meio da produção de ração, principalmente para aves, suínos e bovinos; alimentação humana, na forma de farinhas, óleos e flocos; à indústria de alta tecnologia, participando de diversos processos da indústria alimentícia, de bebidas e produção de biocombustível, o etanol.

O Brasil produziu 80.786 milhões de toneladas de milho em uma área de 16.631,8 milhões de hectares na safra 2017/18, o que representou aproximadamente 7,8 % do estoque mundial do cereal (CONAB, 2018; OECD, 2018). A produtividade média do milho no Brasil é baixa (4,86 t ha<sup>-1</sup>) quando comparada à de outros países grandes produtores (10,7 t ha<sup>-1</sup> nos Estados Unidos; 7,3 t ha<sup>-1</sup> na Argentina) (OECD, 2018).

O milho é bastante responsivo às altas aplicações de fertilizantes, principalmente os nitrogenados (N). Para a produção de 1000 kg de grãos cultura requer pelo menos 20 kg de N (SOUZA e LOBATO, 2004). Como as altas produtividades demandam grandes aplicações de fertilizantes

nitrogenados, 17,8% dos fertilizantes nitrogenados comercializados mundialmente nas safras 2013/2014 e 2014/2015 foram destinados ao cultivo do milho (HEFFER, 2017).

A baixa eficiência do uso dos fertilizantes nitrogenados é explicada pelos processos biogeoquímicos de volatilização, lixiviação e erosão, que podem acarretar em perdas significativas do fertilizante, além da contaminação do lençol freático e corpos de água, acidificação dos solos, emissão de gases de efeito estufa. Outro aspecto importantíssimo é o preço dos fertilizantes, pois, para a produção de cada tonelada de fertilizante nitrogenado (amônio) são necessários 6 barris de petróleo. Isso torna a produção de milho menos sustentável. A alta aplicação dos fertilizantes nitrogenados nos solos agrícolas diminui a sustentabilidade ambiental e financeira das propriedades agrícolas.

Além disso, os fertilizantes nitrogenados reduzem a fixação biológica de nitrogênio no solo. Devido a entrada de amônio no sistema, as plantas não precisam mais dos microrganismos simbióticos para fornecer amônio e isso reduzem o estímulo às bactérias simbióticas e associativas. As bactérias nitrificantes também aproveitam esse excesso de amônio e o utilizam para produzir nitrato. Esta alta quantidade de nitrato é utilizada por bactérias desnitrificantes para produzir  $N_2O$  e o excesso é perdido por lixiviação até o lençol freático (GALLOWAY et al., 2008).

Sob a perspectiva da produção agrícola sustentável, as culturas cultivadas precisam estar preparadas com resistência a doenças, tolerância à seca, tolerância ao estresse por metais pesados e com melhor teor nutricional. Neste sentido, as BPCV podem ser utilizadas para melhorar a saúde das plantas e promover o aumento das taxas de crescimento das plantas, sem contaminação ambiental.

Para auxiliar as necessidades de uma agricultura tão dependente dos produtos sintéticos, uma possível alternativa é introduzir microrganismos do solo (bactérias, fungos, algas, etc.) que aumentem a capacidade de absorção e eficiência do uso de nutrientes e da água (ARMADA et al., 2014). Entre esses microrganismos potenciais do solo, as bactérias conhecidas como bactérias promotoras de crescimento vegetal são as mais promissoras. O termo “bactérias promotoras do crescimento vegetal” (BPCV) refere-se a bactérias

que colonizam as raízes das plantas (rizosfera) e estimulam o crescimento por diferentes mecanismos.

A rizosfera é a zona de contato entre solo e raízes, onde ambos são mutuamente influenciados, e, um ambiente de máxima atividade microbiana (VEJAN, 2018). As plantas normalmente exsudam uma grande fração de seu carbono fotossinteticamente fixado (estimado geralmente na faixa de 5-30%) através de suas raízes (GLICK, 2013). Os exsudados de raízes contêm grandes quantidades de açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos, servindo como uma fonte de alimento bacteriano. Por isso, a população microbiana na rizosfera é parcialmente diferente dos outros ambientes do solo devido à presença de exsudatos radiculares que funcionam como fonte de nutrientes para o crescimento microbiano (BURDMAN, 2000). Weller e Thomashow (1994) provaram que a zona estreita da rizosfera é rica em nutrientes para micróbios em comparação com o solo livre da influência das raízes mostrando que quantidade de bactérias presentes em torno das raízes das plantas é geralmente 10 a 100 vezes maior do que no solo livre.

As BPCV afetam diretamente o metabolismo vegetal através de uma ampla variedade de mecanismos. Os benefícios que as BPCV promovem incluem: (I) tolerância ao estresse abiótico, (II) disponibilização de nutrientes (N, P e Fe), (III) hormônios reguladores de crescimento vegetal, (IV) produção de sideróforos, (V) produção de compostos orgânicos voláteis; e (VI) produção de enzimas de proteção, como quitinase, glucanase e ACC-desaminase para a prevenção de doenças de plantas (CHOUDHARY et al., 2011; GARCÍA-FRAILE et al., 2015). Entretanto, o modo de ação das diferentes BPCV pode variar conforme o tipo de planta hospedeira. Nos subitens abaixo, lista-se os principais mecanismos.

As bactérias do gênero *Azospirillum* spp. são as BPCV mais estudadas, com exceção dos rizóbios (BASHAN e DE-BASHAN, 2010). Duas características principais definem esse gênero: a fixação biológica de nitrogênio (FBN) e a produção de fitohormônios (TIEN et al. 1979), e fizeram com que essas bactérias passassem a ser comercializadas em grande escala na Argentina, México, Índia, Itália, França e Brasil (BASHAN e DE-BASHAN, 2010). Bactérias do gênero *Azospirillum* são conhecidas por sua capacidade de produzir hormônios vegetais, e entre esses, o ácido indol-3-acético (AIA)

(SPAEPEN et al. 2007) e as giberelinas (BOTTINI et al. 2004). Esses hormônios alteram o metabolismo e a morfologia das plantas aumentando a densidade e o comprimento dos pêlos radiculares, bem como o alongamento das raízes laterais, aumentando assim a área de superfície radicular (FALLIK et al., 1994), e em muitos casos, as plantas são mais vigorosas e verdes, apresentando maior crescimento vegetal, já que absorveram mais água e minerais (BASHAN e DE-BASHAN, 2010), além da fixação biológica de nitrogênio (DE-BASHAN et al., 2012).

Embora, muitas bactérias do solo sejam consideradas BPCV, nem todas as estirpes de um determinado gênero e espécie bacteriana têm a mesma capacidade e composição metabólica. Mesmo no Brasil onde as pesquisas com BPCV são pioneiras, a sua utilização em grande escala nos cultivos com gramíneas é incipiente e recente. No Brasil, no ano de 2016, somente 8,9% dos inoculantes comercializados pelas empresas cadastradas na associação de produtores e importadores de inoculantes foram destinados às gramíneas, totalizando 4.532,217 doses aplicadas (ANPII, 2018).

A FBN por essas bactérias é realizada por um complexo enzimático, chamado de nitrogenase. A nitrogenase foi descrita por Dean e Jacobson (1992) como uma metaloenzima de dois componentes, sendo: (I) dinitrogenase redutase que é uma proteína constituída de ferro, e (II) dinitrogenase que possui um cofator de metal. A dinitrogenase redutase fornece elétrons de alto poder redutor, e a dinitrogenase usa esses elétrons para reduzir  $N_2$  a  $NH_3$ . Com base nesses fatores, foram identificados três sistemas diferentes de fixação do N: (1) Mo-nitrogenase, (2) V-nitrogenase e (3) Fe-nitrogenase. Esses sistemas de FBN variam entre os diferentes gêneros bacterianos, porém, a maioria dos processos ocorre pela nitrogenase do molibdênio. Os genes presentes nas bactérias capazes de realizarem a FBN são chamados de genes nif. Os genes nif codificam 20 proteínas diferentes (GLICK, 2012). O complexo enzimático da nitrogenase de molibdênio possui duas proteínas que são codificadas pelos genes nif, o nifDK e nifH.

O processo da estimulação do crescimento das raízes dos vegetais é influenciado por microrganismos que têm a capacidade de produzir ou alterar a concentração de hormônios reguladores do crescimento de plantas, como auxinas, giberelinas, citocininas e etileno (VEJAN, 2018). Esses fitohormônios



são substâncias orgânicas que modificam os processos bioquímicos, e fisiológicos das plantas. As auxinas mais ativas nas plantas são o ácido indol-3-acético (AIA). O AIA em baixa quantidade estimula o alongamento da raiz primária e aumenta a formação dos pêlos radiculares (SPAEPEN, 2007; VACHERON, 2013), fazendo com que as plantas consigam absorver mais nutrientes. Os processos de germinação de sementes, indução floral, desenvolvimento de flores e frutos e crescimento das folhas necessitam da giberelina (BOTTINI, 2004), sendo que o efeito mais dominante da giberelina é o alongamento da parte aérea (SPAEPEN, 2011). As citocininas estimulam a divisão celular e induzem a proliferação de pêlos radiculares (VEJAN, 2018). O etileno é conhecido por regular o amadurecimento dos frutos e a abscisão das folhas (REID, 1981), porém, em altas concentrações induz a desfolha e os processos celulares que levam a inibição do crescimento da raiz e do caule (LI, 2005). As plantas sintetizam 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), que é precursor do etileno, produzido sob condições de estresse ambiental como seca, inundação, infecções por patógenos e presença de metais pesados. As BPCV degradam o etileno, estimulando o crescimento radicular mesmo em condições de estresse ambiental (VEJAN, 2018).

O fósforo (P) é o segundo nutriente que mais limita o crescimento das plantas. O P está no solo nas formas orgânica ou inorgânica. Apesar de parecer abundante nos solos, uma quantidade moderada de P está em forma insolúvel. As plantas absorvem apenas duas formas solúveis, o monobásico ( $H_2PO_4$ ) e o diabônico ( $HPO_4^{2-}$ ) (BHATTACHARYYA e JHA, 2012). A solubilização do fosfato mineral ocorre pela ação de ácidos orgânicos liberados pelas BPCV. Esses ácidos acidificam a célula e seus arredores, conseqüentemente, o fósforo inorgânico é liberado do mineral por substituição de prótons por  $Ca^{2+}$  (GOLDSTEIN et al., 1994). Entre esses ácidos, o glucônico é o mais frequente na solubilização do fosfato mineral (RODRIGUEZ et al., 1999). Há também o processo da mineralização do fósforo orgânico que acontece pela decomposição dos restos de plantas e animais e ação das fosfatases. Na decomposição da matéria orgânica há liberação de organofosfonatos que passam pela mineralização no processo da biodegradação, tornando o fósforo orgânico disponível (MCGRATH et al., 1995).

As BPCV também podem ser chamadas de biopesticidas; promovem crescimento de plantas através do controle de microorganismos fitopatogênicos, produzindo metabólitos de propriedades antifúngicas utilizadas como sistema de defesa. Esse mecanismo envolve a produção de enzimas hidrolíticas, sendo a quitinase e glucanase. Os principais componentes da parede celular dos fungos são constituídos por quitina e betaglcucana, portanto, as bactérias que produtoras de beta-glucanases inibem o crescimento fúngico, fortalecendo o desenvolvimento de resistência sistêmica induzida nas plantas hospedeiras (MIA e SHAMSUDDIN, 2013).

É indiscutível que as BPCV desempenham ótimos resultados nas plantas com os diferentes benefícios acima supracitados. Porém, o inverso também pode acontecer. Por exemplo, a produção de cianeto que é conhecida por ser uma das características de espécies de *Pseudomonas* (VEJAN, 2018). O cianeto tem efeito de biocontrole contra patógenos vegetais (MARTINEZ-VIVEROS, et al., 2010), mas, pode causar feitos adversos no crescimento das plantas (BAKKER et al., 1987). Caso semelhante também ocorre com a auxina que pode causar efeitos benéficos ou prejudiciais para as plantas (XIA et al., 1996). O modo de ação dependerá da sua concentração. Em baixas concentrações aumenta o crescimento das plantas, enquanto em altas concentrações inibe o crescimento das raízes (XIA, et al., 1996). Até o momento, os resultados têm demonstrado que poucas espécies bacterianas podem inibir o crescimento das plantas, portanto, a seleção de uma estirpe é muito importante para obtenção dos benefícios de crescimento para as plantas desejadas.

Segundo a legislação brasileira, Lei nº 6.894, de 16/12/1980, inoculante é uma substância que contém microrganismos com atuação favorável ao desenvolvimento vegetal. De modo geral, os inoculantes têm se tornado um aspecto crucial para a economia na agricultura. No mercado brasileiro, há nove empresas cadastradas na associação nacional dos produtores e importadores de inoculantes (ANPII). Em 2016, essas empresas comercializaram mais de 50 milhões de doses de inoculantes para diferentes culturas como soja, feijão, milho e forragens (ANPII, 2018).

Este mercado tem potencial de expansão, haja vista que menos de 10% dessas doses comercializadas foram destinados para a cultura do milho. Por

isso, este setor está investindo em pesquisas e tecnologias de produção de inoculantes para esta espécie.

Os inoculantes microbianos a base de *Bacillus* spp. têm sido fabricados industrialmente a partir de várias cepas (LOPES et al., 2018). Os produtos a base de espécies de *Bacillus* têm grande potencial de uso nos sistemas integrados, por isso a caracterização de novas cepas pode ajudar o desenvolvimento de novos produtos. Na Tabela 1, são apresentados os principais produtos comercializados mundialmente a base de *Bacillus*.

Os inoculantes a base de *Bacillus* representam a classe mais importante de produtos microbianos comercialmente disponíveis para uso fitossanitário. A capacidade de formar esporos permite a colonização em diferentes tipos de solos e ambientes.

### ***Bacillus* spp.**

As bactérias do gênero *Bacillus* pertencem a família *Bacillaceae*, são heterotróficas, em forma de bastonete, gram-positivas, se locomovem por flagelos peritricosos, e alguns membros são aeróbicos, enquanto outros são facultativos ou anaeróbicos. São capazes de produzir endósporos resistentes a condições ambientais desfavoráveis, por exemplo, sob temperaturas altas ou carência nutricional. Esse endósporo pode permanecer dormente durante anos se as condições forem desfavoráveis, ou converter-se rapidamente em uma célula vegetativa quando as condições são favoráveis (MADIGAN et al., 2016).

**Tabela 1.** Inoculantes a base de *Bacillus* sendo comercializados mundialmente.

<b>Produto</b>	<b>Cepas</b>	<b>Patógenos alvos</b>	<b>Culturas</b>	<b>Companhias</b>
Yield Shield	<i>B. pumilus</i> GB34	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium</i>	Soja	Bayer CropScience, USA
Bio-Yield	<i>B. amyloliquefaciens</i> GB99, <i>B. subtilis</i> GB122	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i>	plantas de cobertura	3Bar Biologics, USA
Dipel	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-1	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Strymon</i> <i>basalides</i> , <i>Alabama</i> <i>argillacea</i> , <i>Helicoverpa</i> , <i>Diatraea saccharalis</i> , <i>Ecdytolopha aurantiana</i> , <i>Grapholita molesta</i> , <i>Diaphania nitidalis</i> , <i>Plutella xylostella</i> ,	abacaxi, algodão, cana-de- açúcar, citrus, macieira, melão, repolho, soja,	Valent BioSciences, USA

		<i>Anticarsia gemmatalis</i> , <i>Tuta absoluta</i> , <i>Argyrotaenia sphaleropa</i>	tomate, videira	
Nacillus	<i>B. subtilis</i> Antumávida, <i>B. subtilis</i> Vilcún, <i>B. licheniformis</i> Mallerauco Brevi, <i>B. brevis</i> Maguellines Brevi, <i>B. brevis</i> Maguellines I	<i>Pseudomonas</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>Xanthomonas</i> , <i>Clavibacter</i>	cerejeira, mirtilo, avelã, tomate, videira, pêra, kiwi, legumes	Bio Insumos Nativa, Chile
Votivo	<i>B. firmus</i> I-1582	<i>Meloidogyne</i> , <i>Pratylenchus</i>	soja, algodão, milho	Bayer CropScience, USA

Fonte: Lopes et. al. (2018)

As espécies do gênero *Bacillus* estão entre as bactérias benéficas na interação micróbio-planta exploradas como pesticidas, fungicidas ou biofertilizante (PEREZ-GARCÍA et al., 2011), estimulando a resistência e promovendo o crescimento das plantas (LOPES et al., 2018). A formação de endósporos possibilita a sua persistência por longos períodos nos solos e em produtos armazenados. Esse gênero inclui bactérias benéficas ao sistema de cultivo, pois promovem o crescimento vegetal por meio da liberação de fitohormônios, solubilização de fosfato, produção de compostos inseticidas e antimicrobianos e indução de resistência sistemática da espécie vegetal (PEREZ-GARCÍA et al., 2011).

Os mecanismos de ação dos isolados do gênero *Bacillus* responsáveis pela promoção do crescimento em plantas, inicialmente podem estar ligados a inibição de fitopatógenos do solo. Entretanto, alguns trabalhos vêm apresentando resultados que sugerem existir uma faixa bem mais ampla quanto aos efeitos dessas bactérias nas plantas.

## 2 HIPÓTESE

A inoculação de bactérias do gênero *Bacillus* resulta em crescimento vegetal e aumento da produtividade de grãos de milho com uma menor oferta do fertilizante nitrogenado.

### 3 OBJETIVO

Avaliar a eficiência agronômica da inoculação *Bacillus* LGMB 319 e *Bacillus* LGMB 326 na cultura do milho sob plantio direto em dois locais no Estado do Paraná (Brasil).

### 4 MATERIAL E MÉTODOS

#### Experimentos

Os experimentos foram realizados com a cultura do milho (*Zea mays* (L.)) em dois locais do estado do Paraná nos municípios de Campo Largo e de Lapa, na safra de 2017/2018. As coordenadas geográficas e informações climatológicas são apresentadas na Tabela 2. O solo do experimento no município de Campo Largo foi classificado como Latossolo vermelho eutrófico chernossólico e em Lapa como Latossolo vermelho distrófico cambissólico conforme Sistema Brasileiro de Classificação de solos (SCBS, 2018). Em cada local, foram coletadas 20 subamostras de solo na profundidade 0–0,2 m e foram homogeneizadas, formando uma única amostra composta para a caracterização química e textural. As análises químicas (Tabela 3) foram realizadas conforme Marques et al. (2004) e a análise da textura com a metodologia do Densímetro de Bouyoucos (GEE e BAUDER, 1986). A adubação de semeadura foi com a aplicação de 500 kg ha<sup>-1</sup> do formulado 8-20-20 para cada área experimental.

**Tabela 2.** Informações geográficas e climáticas sobre a localidade dos experimentos.

Local	Coordenadas <sup>a</sup>	Altitude	Clima <sup>b</sup>	Precipitação <sup>c</sup>	Temperatura diária <sup>d</sup>
		m			mm
Campo	25°24'39.5"S;	987	Cwb	1071.6 <sup>e</sup>	19,6 <sup>f</sup>
Largo	49°29'42"W				
Lapa	25°50'38"S;	869	Cwb	737.2	19.6
	49°39'11.3"W				

<sup>a</sup> Latitude e Longitude<sup>b</sup> Sistema de classificação de Koppen-Geiger's<sup>c</sup> Precipitação acumulada de Curitiba e Lapa durante o período do plantio até a colheita.<sup>d</sup> Temperaturas médias durante o período do experimento.<sup>e</sup> precipitação da estação de Curitiba-PR, a 30 km do local do experimento.<sup>f</sup> temperatura diária média de Curitiba-PR, a 30 km do local do experimento.**Tabela 3.** Análise química e granulométrica (0-20 cm) dos locais do experimento em amostras foram feitas antes da semeadura.

Local	Química								Granulometria			
	pH	pH	Al	H+Al	Ca	Mg	K	P	C	Argila	Silte	Areia
	CaCl <sub>2</sub>	SMP	-----cmol/dm <sup>3</sup> -----			-----ppm-----		g/dm <sup>3</sup>	-----g/kg <sup>-1</sup> -----			
Campo	4,96	5,2	0,1	6,2	8,4	4,3	20,33	53,4	48,1	662	50	288
Largo												
Lapa	4,92	6,10	0,3	4,6	1,5	0,4	11,34	30,3	39,1	325	100	575

Os experimentos foram conduzidos sob delineamento experimental de blocos ao acaso com 8 tratamentos e 5 repetições. As parcelas T1, T2 e T3 não foram inoculadas e receberam as doses de (T1) 0 (zero), (T2) 100 e (T3) 50 kg N ha<sup>-1</sup>, respectivamente. As parcelas T4 foram inoculadas com *Azospirillum brasilense* (Abv-05 e Abv-06); T5, com *Bacillus* LGMB 319; T6, com *Bacillus* LGMB 326; T7, com *Bacillus* LGMB 319 e *Bacillus* LGMB 326; e T8, com *A. brasilense* (Abv-05 e Abv-06), *Bacillus* LGMB 319 e *Bacillus* LGMB 326. Todas as parcelas inoculadas receberam 50 kg N ha<sup>-1</sup> em cobertura. A aplicação do fertilizante nitrogenado foi realizada com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (21% N) no estágio vegetativo V4 da cultura (quatro folhas abertas) na superfície do solo, em linha, ao lado das plantas.

As sementes foram tratadas com inseticida Clorantraniliprole (Dermacor®, DuPont-Pioneer) na dose recomendada pelo fabricante. A semeadura foi realizada manualmente no dia 25/10/2017 com o híbrido comercial DKB 330 PRO3 (DEKALB) de ciclo superprecoce em Campo Largo, e, no dia 01/11/2017 com o híbrido comercial DKB 390 PRO3 (DEKALB) de ciclo precoce em Lapa.

Em Campo Largo, a parcela teve 6 linhas de 6 m de comprimento espaçadas 0,75 m entre si, as sementes foram semeadas com a distância de 0,2 metros entre si com população de 66.666 plantas ha<sup>-1</sup>. Em Lapa, a parcela tinha 7 linhas de 7,5 m de comprimento espaçadas 0,45 m entre si, as sementes foram semeadas com a distância de 0,25 metros entre si com população de 88.888 plantas ha<sup>-1</sup>.

As bactérias utilizadas foram *Azospirillum brasilense* Abv-05 e Abv-06 (fornecidas pela Total Biotecnologia S.A.), *Bacillus* LGMB 319 e *B. LGMB* 326 (Banco de Germoplasma do Laboratório de Genética de Microrganismos (LABGEM) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná), provenientes do isolamento da rizosfera de milhos híbridos comerciais (IKEDA et al. 2014). A inoculação foi feita com homogeneização de 3 ml de suspensão bacteriana com concentração de 2x10<sup>8</sup> células ml<sup>-1</sup> em 1800 sementes de milho imediatamente antes da semeadura.

### **Medições no estágio de pendoamento**

No estágio de pendoamento, as folhas localizadas na porção oposta e abaixo da espiga de 5 plantas escolhidas ao acaso por parcela foram cortadas, enxaguadas com água deionizada, secas em estufa com ventilação forçada a 60 °C por 72 horas e moídas em fragmentos menores de 2 mm. Os teores de P, K, Mg, Ca, Mn, Fe, e Zn das folhas foram determinados conforme Martins e Reissmann (2007). O conteúdo de N das mesmas foi determinado por combustão seca no analisador elementar (CNHOS) modelo Vario EL III - elementar®, Germany.

As medições da altura e diâmetro das plantas foram feitas em 10 plantas por parcela. A altura das plantas foi medida da superfície rente ao solo até o ponto de inserção da folha bandeira. O diâmetro do colmo foi medido no porte mediano do primeiro internódio visível.

### **Medições no estágio de maturação fisiológica**

A massa seca total da parte aérea (incluindo as espigas sem os grãos) foi determinada pela pesagem de 5 plantas no estágio de maturação fisiológica, cortadas rente ao solo, secas em estufa com ventilação forçada a 60 °C por 14 dias. Posteriormente, as plantas foram trituradas e moídas para determinação de P, K, Mg, Ca, Mn, Fe, e Zn, conforme metodologia de Martins e Reissmann (2007). O teor de N das mesmas foi determinado por combustão seca no analisador elementar (CNHOS) modelo Vario EL III - elemental®, Germany.

O comprimento e diâmetro das espigas foram estimados a partir da mensuração de 5 espigas de cada parcela. O comprimento consistiu da mensuração da base até o ápice das espigas. O diâmetro da espiga foi medido na metade do comprimento das mesmas.

### **Rendimento de grãos**

A colheita das espigas foi realizada manualmente na área útil, descartando-se as duas linhas laterais, o primeiro e o último metro de cada linha de plantio. As espigas foram debulhadas em debulhador mecânico acoplado no trator, e os grãos foram pesados e corrigidos a 13% de umidade e extrapolados para kg ha<sup>-1</sup>. Os grãos foram contados (para massa de mil grãos) e pesados, seus pesos corrigidos a 13% de umidade.

Uma subamostra dos grãos foi retirada para a determinação dos nutrientes após moagem em malha de 2 mm. Os teores de P, K, Mg, Ca, Mn, Fe, e Zn foram determinados conforme Martins e Reissmann (2007). O conteúdo de N das mesmas foi determinado por combustão seca no analisador elementar (CNHOS) modelo Vario EL III - elemental®, Germany.

### **Análise estatística**

Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para confirmação das premissas de análise de variância (ANOVA). ANOVA foi realizada com o software de código aberto R com o pacote agricolae (de Mendiburu, 2009). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade.



## 5 RESULTADOS

Os benefícios da aplicação de N sobre a produtividade do milho foram comprovados, pois o tratamento sem aplicação deste nutriente teve as menores médias dos componentes de produção quando comparado aos demais tratamentos que receberam adubação nitrogenada (Tabela 4).

Os tratamentos com os inoculantes bacterianos não influenciaram as variáveis diâmetro do colmo, altura, massa seca das plantas, número de fileiras de grãos por espiga, comprimento das espigas e produtividade (Tabela 4).

O tratamento de coinoculação das três cepas bacterianas (T8) no experimento em Campo Largo produziu 359,17 kg ha<sup>-1</sup> de grãos a mais do que o tratamento (T3) que recebeu a mesma quantidade de N em cobertura (Tabela 7). Na Lapa, o tratamento que mais produziu com a mesma quantidade do fertilizante nitrogenado foi o tratamento de inoculação de *B. LGMB 326* (T6), sendo 436,42 kg ha<sup>-1</sup> a mais do que o T3 (sem inoculante bacteriano).

Reduzir 50% da dose do fertilizante nitrogenado, mesmo com a inoculação de *A. brasilense*, *Bacillus LGMB 319* ou *Bacillus LGMB 326*, é uma estratégia que deve ser tomada com cautela. No experimento de Campo Largo a redução na produção de grãos não foi detectada estatisticamente, entretanto, a produtividade dos grãos reduziu até 1243,45 kg ha<sup>-1</sup> quando *Bacillus LGMB 319* e *Bacillus LGMB 326* foram coinoculadas. Em Lapa, esta redução foi de 734 kg ha<sup>-1</sup>.

A coinoculação das bactérias *Bacillus LGMB 319* e *Bacillus LGMB 326*, interferiu negativamente nas médias do diâmetro das espigas e massa de mil grãos em Campo Largo. Esses resultados indicam que a coinoculação com essas duas bactérias não é favorável ao desenvolvimento das espigas.

O teor de nutrientes na folha no estágio do florescimento (VT) (Tabela 5) variou pouco entre os tratamentos, exceto o N, que foi afetado pelo tratamento de 100 kg N ha<sup>-1</sup> em cobertura. Isso indica que a redução de 50% do N em cobertura não foi suprida pela inoculação com os microorganismos.

No estágio da maturação fisiológica, as plantas que receberam 100 kg N ha<sup>-1</sup> extraíram mais N, P, Ca, Mn e Zn do que os demais tratamentos (Tabela 6).

A inoculação com *A. brasilense* (Abv-05 e Abv-06) diminuiu a exportação de P, K e Mg entre os tratamentos com inoculantes bacterianos. Porém, a coinoculação de *A. brasilense* + *Bacillus* LGMB 319 + *Bacillus* LGMB 326 aumenta a exportação de P, K, Mg e Mn pelos grãos (Tabela 7).

## 6 DISCUSSÃO

A busca por estirpes de BPCV para a produção de inoculantes vem sendo realizada há décadas, no entanto, a utilização delas ainda é limitada na agricultura mundial (BASHAN et al. 2014; VEJAN, 2016). A utilização bem-sucedida da BPCV depende da sua sobrevivência no solo, da compatibilidade com a cultura na qual ela é inoculada, da capacidade da interação com a microbiota nativa no solo e dos fatores ambientais (MARTINEZ-VIVEROS, 2010). Experimentos a campo realizados pelo grupo do Laboratório de Genética, Microbiologia e Biologia da Universidade Federal do Paraná-Brasil evidenciaram duas cepas de bactérias (*B. LGMB 319* e *B. LGMB 326*) com efeitos potenciais para utilização agrícola-industrial. Essas bactérias foram isoladas e caracterizadas por Ikeda et al. (2014) e apresentaram a capacidade *in vitro* de produção de sideróforos, solubilização de fosfato, FBN e produção de AIA. Essa dissertação de mestrado apresenta os resultados do primeiro experimento de campo, realizado em duas condições edafoclimáticas do Estado do Paraná, para confirmar se as bactérias *B. LGMB 319* e *B. LGMB 326* têm potencial para serem utilizadas como inoculantes na cultura do milho.

A utilização de estirpes do gênero *Bacillus* como inoculantes pode interferir na tecnologia existente, impactando a credibilidade que os produtores rurais têm sobre a importância da prática da inoculação. A incompatibilidade de bactérias pode não trazer o efeito desejado, por exemplo, promoção do crescimento vegetal, aumento da absorção de nutrientes e tolerância das plantas sob estresses bióticos e abióticos. Como consequência, a inoculação pode apenas implicar em aumento no valor investido na lavoura, ou até mesmo reduzir a produção da cultura. Assim, o efeito de cada espécie bacteriana pode ser específica para uma determinada cultura, o que pode gerar efeitos opostos aos desejados (aumento do crescimento vegetal) ou serem governados por uma competição interespecífica (GADHAVE et al., 2018).

A aplicação de fertilizante nitrogenado aumentou as médias dos indicadores de componentes de rendimento e da extração dos nutrientes pelas plantas no tratamento com 100 kg N ha<sup>-1</sup> em cobertura (T2) quando em comparação com os tratamentos sem N (Tabela 6). Esse efeito é um resultado da nutrição adequada de N para as plantas. O nitrogênio é constituinte das proteínas, ácidos nucleicos, clorofila II, co-enzimas, fitohormônios e metabolitos (HAWKESFORD et al., 2012), resultando no aumento da taxa fotossintética. Porém, no final do ciclo as plantas inoculadas e com 50 kg N ha<sup>-1</sup> e inoculadas, produziram, semelhante ao tratamento com o dobro do fertilizante nitrogenado (Tabela 4), sugerindo que as bactérias supriram as plantas de nutrientes nos estádios de formação e enchimento de grãos.

Os mecanismos que as bactérias influenciam no crescimento e produção da biomassa das plantas pode diferir entre espécies de plantas, visto que cada material genético libera exsudados diferentes, selecionando as bactérias que as colonizam (KAUR, 2018), além dos diferentes gêneros das BPCV.

As médias dos diâmetros dos colmos nos dois experimentos, e da massa da biomassa das plantas em Lapa não diferiram estatisticamente entre si. Já as médias da altura das plantas e a massa da biomassa em Campo Largo divergiram entre os tratamentos. Esses resultados indicam que a inoculação com as bactérias *A. brasilense*, *B. LGMB 319* e *B. LGMB 326* não prejudicam o crescimento e desenvolvimento das plantas.

A variável número de fileiras de grãos por espiga em Campo Largo e Lapa, comprimento e diâmetro das espigas em Lapa não foram estimulados pelos tratamentos, demonstrando que essas variáveis são pouco influenciadas pelas doses do N em cobertura e pelos inoculantes bacterianos. Além disso, os resultados obtidos podem ser atribuídos ao fato de que o número de fileiras de grãos por espiga é um componente da característica genética do híbrido (FERNANDES et al., 2005; VALDERRAMA et al., 2011). Contudo, as médias podem ter sido um resultado da interação genótipo da planta X genótipo do microrganismo X ambiente X manejo, sendo esse um dos poucos motivos que limitam o uso da tecnologia da inoculação.

A massa de mil grãos é um componente importante da produtividade, e segundo Caires et al. (2016), após o florescimento das plantas de milho, qualquer tipo de estresse que a planta seja submetida, de natureza biótica ou

abiótica, pode afetar significativamente essa variável. O mesmo autor confirma em seu trabalho que a massa de mil grãos é estritamente relacionada com a adubação nitrogenada em cobertura. Neste trabalho, a massa de grãos mais pesada foi para os tratamentos que receberam a maior dose do fertilizante nitrogenado (T2). Porém, com exceção dos tratamentos com os inoculantes bacterianos *Bacillus* LGMB 319 + *B. LGMB 326* (T7) e com *A. brasilense* + *Bacillus* LGMB 319 + *B. LGMB 326* (T8) no experimento de Campo Largo que tiveram os menores pesos, as médias dos demais tratamentos não foram diferentes estatisticamente (Tabela 4).

A produtividade não variou entre os tratamentos que receberam N em cobertura e inoculantes bacterianos. Entretanto, parece existir limitações do uso da tecnologia da inoculação com essas estirpes, pois, por exemplo, as bactérias *Bacillus* LGMB 319 e *Bacillus* LGMB 326 quando coinoculadas diminuíram o rendimento de grãos (Tabela 4). Mas, quando a inoculação dessas bactérias (*B. LGMB 319* e *B. LGMB 326*) foi feita separadamente (T5 e T6), elas aumentaram a produção em até 315,15 kg ha<sup>-1</sup> quando comparado com o tratamento que recebeu a mesma dose do fertilizante nitrogenado, sem inoculantes bacterianos (T3) (Tabela 4).

Dentre os nutrientes avaliados na folha no estágio da inflorescência feminina, as plantas do tratamento com os 100 kg N ha<sup>-1</sup> (T2) em cobertura concentraram mais N (Tabela 5). Os demais nutrientes não foram afetados pelos tratamentos ou foram afetados de maneira diferente nos dois experimentos. Os nutrientes extraídos pela biomassa no estágio da maturação fisiológica não seguiram a mesma orientação da avaliação anterior, onde as plantas do tratamento com 100 kg N ha<sup>-1</sup> extraíram mais P, Ca, Mn e Zn (Tabela 6). A exportação dos nutrientes pelos grãos foi maior nos tratamentos coinoculados com as três bactérias juntas (T8), exportando mais P, K, Mg e Mn (Tabela 7).

O P é um dos elementos essenciais para o desenvolvimento dos vegetais, e não é um recurso renovável no solo. Sua utilização futura na agricultura dependerá da disponibilidade e de um possível aumento de custo de aquisição desse nutriente. As plantas do tratamento coinoculado com *A. brasilense*, *B. LGMB 319* e *B. LGMB 326* extraíram mais P nos grãos do que as plantas dos

outros tratamentos. Esse resultado é efeito das BPCV, já que elas têm a capacidade de disponibilizar mais P para as plantas.

**Tabela 4.** Resultado dos componentes de produção. (MSP, massa seca das 5 plantas; NFE, número de fileiras de grãos por espiga, CL, Campo largo-PR, e L, Lapa-PR)

Trat.	Diã. Colmo		Altura		MSP		NFE		Comp. Espiga		Diãm. Espiga		Massa de mil grãos		Produtividade	
	C.L	Lapa	C.L	Lapa	C.L	Lapa	C.L	Lapa	C.L	Lapa	C.L	Lapa	C.L	Lapa	C.L	Lapa
	-----mm-----	-----mm-----	-----cm-----	-----cm-----	-----g-----	-----g-----	-----cm-----	-----cm-----	-----mm-----	-----mm-----	-----g-----	-----g-----	-----kg/ha <sup>1</sup> -----	-----kg/ha <sup>1</sup> -----		
T1	19.9	20.4	2.12b	2.60b	471.6b	535.2	15.9	16.9	15.7	16b	45.3b	54.2	148.97b	276.83b	6180.7b	9912.35b
T2	22	20.7	2.25a	2.67ab	626a	585.6	16	17.2	18.6a	17.2	48.4a	55.7	185.23a	298.24a	9131.3a	11801.23a
T3	22	20.8	2.19ab	2.68ab	542.6ab	584.4	15.2	17.7	18.3a	16.9	47.2ab	55.2	166.39ab	279.03ab	8105.42a	11123.46ab
T4	20.7	21	2.20ab	2.69ab	530ab	568.4	15.6	17.4	17.7a	16.5	46.6ab	55.3	165.40ab	289.62ab	8119.43a	11426.54ab
T5	21.9	21.7	2.21ab	2.67ab	554.4ab	565.6	15	17.4	18.2a	16.6	46.8ab	54.8	160.62ab	291.97ab	8420.57a	11336.42ab
T6	21.3	19.8	2.23a	2.64ab	543.5ab	546.8	15.5	17.6	18a	16.2	47.1ab	54.5	167.85ab	285.52ab	8402.48a	11559.88ab
T7	21.8	20.9	2.19ab	2.69ab	542ab	585.2	15.8	17.4	17.1ab	16.9	46.2b	54.7	149.58b	292.65ab	7887.85a	11067.28ab
T8	21.4	20.4	2.22ab	2.7a	603ab	586.4	15.4	18.1	18.7a	17.3	47.2ab	55.6	158.52b	290.60ab	8464.59a	11164.20ab
CV%	6.15	4.85	2.47	1.90	13.37	8.71	4.55	3.89	6.21	5.17	2.63	2.18	9.75	3.99	13.71	8.05
P	ns	ns	**	*	*	Ns	ns	ns	***	ns	**	ns	**	*	***	*

\* Significativo no teste F,  $p < 0,05$

\*\* Significativo no teste F,  $p < 0.01$

\*\*\* Significativo no teste F,  $p < 0.001$

ns Não significativo no teste F.

**Tabela 5.** Teores de nutrientes na folha inteiro abaixo e oposta a espiga no estágio de florescimento (macronutrientes em g/kg<sup>-1</sup> e micronutrientes em mg/kg<sup>-1</sup>). (CL, Campo largo-PR, e L, Lapa-PR)

Trat.	N		P		K		Ca		Mg		Mn		Fe		Zn	
	C.L	L.	C.L	L.	C.L	L.	C.L	L.	C.L	L.	C.L	L.	C.L	L.	C.L	L.
1	19,9b	27c	2,4	2,2	15,3	14	3	3,6ab	1,9	1,9	22,8c	42,1	66,1b	66,4	17,3b	15,4
2	27,4a	31a	2,6	2,4	15,7	13,7	3	3,3b	1,8	1,7	31,8a	49,5	82,3ab	81,8	27a	19,8
3	25,8a	29,7ab	2,5	2,3	15,3	14	3	3,5ab	1,9	1,7	26,5bc	48,3	77,1ab	78	21,9ab	16,2
4	26,4a	29,3abc	2,5	2,3	15,4	14	3	3,4ab	1,9	1,7	26bc	51,5	86,3a	78,1	20,9ab	20,9
5	25,3a	28,6bc	2,6	2,3	15,5	14	3,2	3,5ab	2	1,8	28,8ab	49,7	76,2ab	73,7	27,2a	18,7
6	26,8a	27,9bc	2,5	2,3	15,5	14,6	3,1	3,5ab	1,8	1,7	25,1bc	54,2	68,7ab	69,7	26,4ab	17,5
7	25,3a	28,8abc	2,5	2,4	15,5	14,4	3	3,8a	1,8	1,7	24,7bc	53,6	64,1b	70,3	20,9ab	18,7
8	27,4a	28,7abc	2,6	2,5	15,4	14,4	3,4	3,8a	2	2	22,8c	48,8	71ab	69,3	25,8ab	18,1
CV%	10,21	5,41	6,28	5,94	2,58	3,89	10,06	8,57	9,52	11,50	12,7	13,4	15,5	16,19	22,03	23,6
P	***	***	ns	ns	Ns	ns	ns	*	ns	ns	***	ns	*	ns	**	ns

\* Significativo no teste F,  $p < 0,05$

\*\* Significativo no teste F,  $p < 0,01$

\*\*\* Significativo no teste F,  $p < 0,001$

ns Não significativo no teste F.

**Tabela 6.** Quantidade de nutrientes extraídos pela biomassa (parte aérea das plantas, exceto os grãos) das plantas (Kg ha<sup>-1</sup>). (CL, Campo largo-PR, e L, Lapa-PR)

Trat.	N		P		K		Ca		Mg		Mn		Fe		Zn	
	C.L	Lapa	C.L	Lapa	C.L	Lapa	C.L	Lapa	C.L	Lapa	C.L	Lapa	C.L	Lapa	C.L	Lapa
1	49,9	60,5	8,23a	4,84cd	71,05b	90,87	18,88d	33,85b	12,90a	19,56ab	0,14d	0,51b	0,93c	1,52	0,06c	0,11b
2	61,2	82,5	8,23a	6,39a	90,17a	107,53	30,76a	42,58a	14,60a	22,19ab	0,29a	0,69a	1,21ab	1,40	0,09a	0,17a
3	52,5	61,9	6,65ab	6,24ab	80,89ab	106,80	25,80ab	38,95ab	13,38a	22,79a	0,25ab	0,65ab	1,16b	1,23	0,09a	0,13ab
4	47,2	68,3	6,36b	5,09bc	76,40ab	102,70	24,09bc	37,40ab	13,11a	19,94ab	0,16cd	0,62ab	1,22ab	1,21	0,08b	0,13ab
5	47,1	67,6	7,34ab	5,29abc	75,18b	108,79	28,68ab	34,32ab	13,82a	19,37ab	0,28a	0,57ab	0,51e	1,33	0,09a	0,14ab
6	43,9	68,2	7,59ab	4,62cd	77,75ab	102,45	24,78bc	32,88b	12,22a	17,54b	0,18cd	0,65ab	0,54e	2,08	0,09a	0,10b
7	42,8	63,5	6,35b	3,67d	75,65ab	120,17	23,64cd	33,70b	13,38a	17,74ab	0,23b	0,54ab	1,25a	1,65	0,09a	0,08b
8	44,5	80,9	7,40ab	5,62abc	82,96ab	111,64	27,39abc	33,82b	14,70a	21,32ab	0,22bc	0,51b	0,74d	1,57	0,10a	0,10b
CV%	25,65	23,01	14,42	18,22	10,78	13,31	11,35	13,67	12,06	14,22	24,79	14,64	31,28	32,65	14,61	29,66
P	ns	ns	**	***	**	ns	***	**	**	*	***	**	***	ns	***	**

\* Significativo no teste F,  $p < 0,05$

\*\* Significativo no teste F,  $p < 0,01$

\*\*\* Significativo no teste F,  $p < 0,001$

ns Não significativo no teste F.



**Tabela 7.** Quantidade de nutrientes exportados pelos dos grãos (Kg ha<sup>-1</sup>). (CL, Campo largo-PR, e L, Lapa-PR)

Trat.	N		P		K		Ca		Mg		Mn		Fe		Zn	
	C.L	Lapa	C.L	Lapa	C.L	Lapa	C.L	Lapa	C.L	Lapa	C.L	Lapa	C.L	Lapa	C.L	Lapa
1	73,1b	101,9b	17,6b	8,1bc	22,4d	33abc	20,8b	37,2	7,5b	8,1bc	0,031b	0,047ab	0,154	0,177	0,168	0,198abc
2	105,2a	157,2a	20,5ab	7,5bc	30,3abc	32,3abc	35,8a	42,1	9,7a	7,5bc	0,045a	0,047ab	0,171	0,211	0,201	0,202ab
3	91,9ab	124,9b	21,5ab	6,64c	29,2abc	27,2c	30,6a	43,8	9,6ab	6,6c	0,042a	0,038b	0,181	0,155	0,208	0,155abc
4	90,5ab	126,0b	19,8ab	6,3c	27,1c	27,7c	28,8ab	43,0	8,9ab	6,3c	0,039a	0,039b	0,155	0,171	0,181	0,148bc
5	91,3ab	116,6b	24,8a	7,7bc	32,5a	32,3abc	33,9a	39,7	10,9a	7,7bc	0,046a	0,047ab	0,175	0,179	0,211	0,174bc
6	95,7ab	126,3b	21,7ab	8,9ab	29,5abc	35,8ab	29,9a	39,2	9,8a	8,9ab	0,039a	0,046ab	0,159	0,177	0,192	0,189abc
7	90,5ab	113,5b	22,0ab	6,3c	28,5bc	29,5bc	27,9ab	35,9	9,6ab	6,3c	0,038ab	0,039b	0,175	0,153	0,176	0,143bc
8	85,2ab	124,4b	23,3a	10,7a	31,1ab	39,2a	28,9ab	40,5	10,2a	10,7a	0,045a	0,054a	0,203	0,191	0,203	0,231a
CV%	15,09	15,81	14,69	20,95	11,91	15,66	18,95	16,28	13,75	21,36	14,01	16,53	17,65	23,46	14,19	21,38
P	*	***	**	***	***	***	***	ns	**	***	***	**	ns	ns	ns	***

\* Significativo no teste F,  $p < 0,05$ \*\* Significativo no teste F,  $p < 0,01$ \*\*\* Significativo no teste F,  $p < 0,001$ 

ns Não significativo no teste F.

## 7 CONCLUSÃO

A inoculação com *Bacillus* LGMB 319 ou *Bacillus* LGMB 326 pode substituir ou ser coinoculado com *Azospirillum brasilense* (Abv-05 e Abv-06) que não diminuem a produção de grãos de milho.

A coinoculação de *Bacillus* LGMB 319 e *Bacillus* LGMB 326 sem a presença de *A. brasilense* não pode ser recomendada, pois as duas interagem negativamente entre si e podem causar redução na produtividade dos grãos.

## REFERÊNCIAS

- ANDREA, M. C. S.; BOOTE K.; SENTELHAS, P. C.; ROMANELLI, T.L. Variability and limitations of maize production in Brazil: Potential yield, water-limited yield and yield gaps. *Nature*, v. 165, p. 264-273, setembro, 2018.
- ARMADA, E.; PORTELA, G.; ROLDAN, A.; AZCON, R. Combined use of beneficial soil microorganism and agrowaste residue to cope with plant water limitation under semiarid conditions. *Geoderma*, v. 232, p 640–648. 2014.
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES E IMPORTADORES DE INOCULANTES (ANPII). Disponível em: <http://www.anpii.org.br/>. Acesso em: 01 nov. 2018.
- BASHAN Y, DE-BASHAN, L.E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - a critical assessment. *Advances in agronomy*, v. 108, p. 77-136, 2010.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.E.; PRABHU, S.R.; HERNANDEZ, J.-P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998–2013). (A Marschner Review). *Plant Soil*, v. 378, p. 1–33, 2014.
- BAKKER, A.W.; SCHIPPERS, P. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp.-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biol. Biochem.*, v. 19, p. 451–457, 1987.
- BHATTACHARYYA, P.N.; JHA, D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *Wood J. Microb. Biotechnol.*, v. 28, p. 1327–1350, 2012.
- BOTTINI, R.; CASSAN, F.; PICCOLI, P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Microbiol. Biotechnol*, v. 65, p. 497–503, 2004.
- BURDMAN, S.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture. In *Microbial Interactions in Agriculture and Forestry*; SUBBA RAO, N.S., DOMMARGUES, Y.R. Science Publishers, v. 135, p. 229–250, 2000.
- CAIRES, E. F, MILLA R., Adubação nitrogenada em cobertura para o cultivo de milho com alto potencial produtivo em sistema de plantio direto de longa duração. *Bragantia*, Campinas, v. 75, n. 1, p. 87-95, 2016.

- CALZAVARA, A. K., PAIVA P. H. G., GABRIEL L. C., OLIVEIRA A. L. M., MILANI K., OLIVEIRA H. C., BIANCHINI E., PIMENTA J. A., DE OLIVEIRA M. C. N., DIAS-PEREIRA J., STOLF-MOREIRA R. Associative bacteria influence maize (*Zea mays* L.) growth, physiology and root anatomy under different nitrogen levels. *V. 20*, p. 870-878, 2018.
- CHOUDHARY, D.K.; SHARMA, K.P.; GAUR, R.K. Biotechnological perspectives of microbes in agro-ecosystems. *Biotechnol. Lett.*, v. 33, p. 1905–1910, 2011.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Indicadores da Agropecuária. Observatório Agrícola. Agosto 2018. N. 08. pg 13 – 23.
- ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO – OECD. Indicadores da agricultura. Produção de culturas. Disponível em: < <https://data.oecd.org/agroutput/crop-production.htm>>. Acesso em 01 novembro 2018.
- DEAN, D. R.; JACOBSON, M. R. Biochemical genetics of nitrogenase. *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey G., Burris R. H. and Evans H. J. Chapman and Hall, Nova York. p. 763-834. 1992
- DE MENDIBURU, F. Una herramienta de analisis estadístico para la investigación agrícola. Tesis. Universidad Nacional de Ingeniería (UNI-PERU). 2009.
- DORAIS, M. Organic production of vegetables: State of the art and challenges. *Can. J. Plant Sci.* v. 87, p. 1055-1066. 2007.
- FALLIK E, OKON Y, FISCHER M. The effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on metabolic enzyme activity in maize root seedlings. *Symbiosis*, v. 6, p. 17–28. 1988.
- FERNANDES, F. C. S., ARF, S. B. O. E ANDRADE, J. A. C. Doses, eficiência e uso de nitrogênio por seis cultivares de milho. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v. 4, p. 195-204. 2005.
- GADHAVE, K.R.; DEVLIN, P. F; EBERTZ, A.; ROSS, A.; GANGE, A. C. Soil Inoculation with *Bacillus* spp. Modifies Root Endophytic Bacterial Diversity, Evenness, and Community Composition in a Context-Specific Manner. *Microbial Ecology*, v.76, p. 741-750. 2018.
- GALLOWAY, J.N.; TOWNSEND, A.R.; ERISMAN, J.W.; BEKUNDA, M.; CAI, Z.; FRENEY, J.R.; MARTINELLI, L.A.; SEITZINGER, S.P.; SUTTON, M.A.

Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, v. 320, p. 889-892, 2008.

GALVÃO, J. C. C.; BORÉM, A.; PIMENTEL, M. A. Milho: do plantio à colheita. Ed UFV, p. 351, 2015.

GARCÍA-FRAILE, P.; MENÉNDEZ, E.; RIVAS, R. Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. *AIMS Bioeng*, v. 2, p. 183–205, 2015.

GEE GW, BAUDER JW. Particle-size analysis. In Klute A (ed.) *Methods of soil analysis*. Part 1. 2nd ed. Agron.Monogr. 9. ASA and SSSA, Madison, WI. p.383-411. 1986.

GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, v. 2012, p. 79-86. 2012.

GOLDSTEIN A.H. Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria. In: Torriani-Gorini A, Yagil E, Silver, S, editors. *Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology*. Washington, DC: ASM Press, p. 197–203. 1994.

HAWKESFORD, M.; HORST, W.; KICHEY, T.; LAMBERS, H.; SCHJOERRING, J.; MOLLER, S. I.; WHITE, P. Functions of macronutrients. In: Marschner, P. (ed.). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. NewYork: Elsevier, cap.6, p.135-189. 2012.

HEFFER, P. Assessment of fertilizer use by crop at the global level. International Fertilizer Industry Association, Paris. 2017.

IKEDA, A. C. Bioprospecção e identificação de bactérias isoladas de raízes de milho (*zea mays* L.) Para promoção de crescimento vegetal e controle biológico. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

KAUR, S.; KAUR, G. Morphological and Physiological Aspects of Symbiotic Plant–Microbe Interactions and Their Significance. In: Giri B., Prasad R., Varma A. (eds) *Root Biology*. Soil Biology, Springer, v. 52, 2018.

LOPES, R.; TSUI, S; GONÇALVES, P. J. R. O.; QUEIROZ, M. V. A look into a multifunctional toolbox: endophytic *Bacillus* species provide broad and underexploited benefits for plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 34, p. 34-94. 2018.

LI, Q.; SALEH-LAKHA, S.; GLICK, B.R. The effect of native and ACC deaminase-containing *Azospirillum brasilense* Cdl843 on the rooting of carnation cuttings. *Can. J. Microbiol.*, v. 51, p. 511–514. 2005.

MARQUES R, MOTTA A.C.V. Análise química do solo para fins de fertilidade. In: Lima MR (ed.) *Manual de diagnóstico da fertilidade e manejo dos solos agrícolas*. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, p. 81-102. 2003.

MARTINEZ-VIVEROS, O.; JORQUERA, M.A.; CROWLEY, D.E.; GAJARDO, G.; MORA, M.L. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, v. 10, p. 293–319. 2010.

MARTINS, A. P. L.; REISSMANN, C. B. Material vegetal e as rotinas laboratoriais nos procedimentos químico-analíticos. *Sciencia Agraria*, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 1-17, 2007.

MIA, M. A. B., HOSSAIN, M. M., SHAMSUDDIN, Z. H., & Islam, M. T. In D. K. Maheshwari (Ed.), *Plant-associated bacteria in nitrogen nutrition in crops, with special reference to rice and banana*. *Bacteria in agrobiolgy: Crop productivity*. Berlin: Springer-Verlag. 2013.

PÉREZ-GARCÍA A, ROMERO D, DE VICENTE A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Curr Opin Biotechnol*, v. 22, p.187-193. 2011.

PORFIRIO, L.L.; NEWTH D.; FINNIGAN J.J.; CAI, Y. Economic shifts in agricultural production and trade due to climate change. *Palgrave communications*. 2018.

PRETTY, J.; BENTON T.G.; BHARUCHA, Z. P.; DICKS, L.V. Global assessment of agricultural system redesign for sustainable intensification *Nature sustainability*. 2018.

REID, M.S. The role of ethylene in flower senescence. *Acta Hort.*, v. 261, p. 157-169. 1981.

RODRIGUEZ, R., VASSILEV, N., & AZCON, R. Increases in growth and nutrient uptake of alfalfa grown in soil amended with microbially- treated sugar beet waste. *Applied Soil Ecology*, v. 11, p. 9-15. 1999.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.*, v. 3, p 1-13. 2011.

- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial e microorganism-plant signaling. In FEMS Microbiology Reviews; Uden, F., Ed.; Blackwell Publishing Ltd.: Nova York, EUA, p. 425-448. 2007.
- TAIZ, L. ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- TIEN, T. M., GASKINS, M. H., e HUBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L). *Appl. Environ. Microbiol*, v. 37, p. 1016-1024. 1979.
- TILMAN, D. Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices. *Proc. Natl. Acad. Sci*, v. 96, p. 5995–6000. 1999.
- TOWNSEND, A. R. et al. Human health effects of a changing global nitrogen cycle. *Front. Ecol. Environ*, v. 1, p. 240-246. 2003.
- VACHERON, J.; DESBROSSES, G.; BOUFFAUD, M.-L.; TOURAINÉ, B.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; MULLER, D. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front. Plant Sci*. v. 4, 2013.
- VALDERRAMA, M., BUZETTI, S., BENETT, C. G. S., ANDREOTTI, M. E MINHOTO, M. C. T. Fontes e doses de NPK em milho irrigado sob plantio direto. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 41, p. 254-263. 2011.
- VEJAN, P; ABDULLAH, R; KHADIRAN, T; ISMAIL, S; BOYCE, A. N. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. *Molecules*, p. 1-17. 2016.
- XIE, H.; PASTERNAK, J.J.; GLICK, B.R. Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* CR12–2 that overproduce indoleacetic acid. *Curr. Microbiol*, v. 32, p. 67–71. 1996.
- WELLER, D.M.; THOMASHOW, L.S. Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. In *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms: Biotechnology and Release of GMOs*; O’Gara, F., Dowling, D.N., Boesten, B., Eds.; VCH: Nova York, NY, EUA, p. 1–18. 1994.