



**ISOLAMENTO E INOCULAÇÃO DE  
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NA CULTURA  
DO MILHO EM VITÓRIA DA CONQUISTA - BA**

**JOELMA DA SILVA SANTOS**

**2013**

**JOELMA DA SILVA SANTOS**

**ISOLAMENTO E INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS  
NA CULTURA DO MILHO EM VITÓRIA DA CONQUISTA - BA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador:  
Prof. Dr. Joilson Silva Ferreira

Co-Orientadora:  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Vera Lúcia Divan Baldani

VITÓRIA DA CONQUISTA  
BAHIA – BRASIL  
2013

*À minha mãe Raimunda,  
Meu irmão Júnior e a  
Meu pai José (in memorian).*

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelo dom da vida; por ser luz em meu caminho e estar sempre comigo em todos os momentos.

À minha mãe, pelo incentivo, amor e confiança. Que mesmo estando distante se fez presente diariamente;

Ao meu amigo e irmão, pelo carinho e cuidado;

Ao curso de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia;

Ao meu orientador, Dr. Joilson Silva Ferreira, pela orientação, confiança, respeito, compreensão e incentivo;

À minha co-orientadora, Dr<sup>a</sup>. Vera Lúcia Divan Baldani, pelo apoio, confiança e contribuição na execução deste trabalho;

À coordenação e aos professores do Programa de Pós- Graduação em Agronomia (Fitotecnia), pela contribuição;

À FAPESB, pela concessão da bolsa de estudo;

À Embrapa Agrobiologia, pela oportunidade e apoio na realização de parte deste trabalho;

À banca examinadora, pela participação e contribuição;

Ao professor Dr. Ramon Vasconcelos, pelas sugestões;

Ao professor Dr. Otoniel Moraes pelo laboratório cedido para realização das análises agronômicas;

Aos colaboradores e profissionais do laboratório de Gramíneas, Embrapa Agrobiologia, em especial, a Wilson, Lúcio, Sandy, Cecília e Gabriela, pela ajuda prestada;

Ao meu amigo Eduardo Ganem, pela colaboração, incentivo e paciência;

À Diretoria de Campo Agropecuário (DICAP), pela colaboração e apoio técnico cedido, em especial, ao Maurício e à Rita;

Ao pessoal do campo experimental, pela grandiosa ajuda na condução dos experimentos;

Aos colegas de Pós-graduação, Jacqueline, Eduardo, Greice, Gilmar, Ione, John, Flávio, Ivana e Tarciana, pelos grupos de estudo e pela amizade;

Aos amigos Cristina Meira, Raely Silva, Renan Tiago, Pablo, Josy, Renatinha Soares, Aderson e Gabriela, pela imensa ajuda com os experimentos;

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para concretização dessa pesquisa.

## RESUMO

SANTOS, Joelma da Silva. **ISOLAMENTO E INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NA CULTURA DO MILHO CULTIVADOS EM VITÓRIA DA CONQUISTA – BA.** 97 p. (Mestrado em Agronomia, Fitotecnia). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, Vitória da Conquista – BA, 2013.

O nitrogênio é um dos principais nutrientes limitantes à produção das culturas, o que as tornam altamente dependentes deste nutriente, via fertilização mineral, que possui preços elevados. Neste contexto, a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), realizado por bactérias diazotróficas, é o principal processo natural capaz de disponibilizar N para as culturas. Entretanto, diferente do que é relatado na literatura para as leguminosas, os resultados da FBN em *Poaceae* são variáveis, o que pode estar relacionado aos mecanismos de associação, ainda não bem elucidados. Portanto, a inoculação de bactérias diazotróficas isoladas de plantas nativas e adaptadas à região pode ser uma estratégia para obter resultados eficientes para estas culturas. O objetivo com este trabalho foi isolar, caracterizar, inocular e selecionar bactérias diazotróficas na cultura do milho cultivado em Vitória da Conquista – BA. O estudo foi realizado em três experimentos. O primeiro experimento foi realizado em casa de vegetação, com a finalidade de isolar bactérias diazotróficas nativas. O segundo e o terceiro foram realizados em condições de campo, para avaliação do efeito da inoculação com a estirpe ZAE94 de *Herbaspirillum seropedicae* e, posteriormente, uma avaliação quanto ao desempenho dos novos isolados nativos em contraste com ZAE94 e inoculante comercial, recomendado para cultura, respectivamente. O primeiro e o segundo experimentos foram conduzidos em esquema fatorial 2 x 4, com presença e ausência de inoculação com estirpe ZAE94 e três doses nitrogenadas (60, 100 e 140 kg de N ha<sup>-1</sup>) e um controle, dispostos em DIC e DBC, com cinco repetições. O terceiro experimento foi realizado em DBC, num esquema fatorial 3x5, com duas doses de N (60 e 100 kg de N ha<sup>-1</sup>) e um controle, as inoculações foram com ZAE94, inoculante comercial, isolado nativo J10 e N13 e controle. Os parâmetros agrônômicos avaliados nos três experimentos foram: alturas de plantas (AP), MSPA, N% e N-total; AP, diâmetro do colmo, comprimento espiga, número e diâmetro de espiga, estande final, peso 1000 grãos, produtividade; e, no último experimento, só produtividade. No experimento de casa de vegetação, a inoculação promoveu aumentos no acúmulo de 14,3% na MSPA e 44,3% do N-Total, quando associada à dose 60k kg de N ha<sup>-1</sup>. No primeiro experimento em campo, não foram observadas diferenças significativas para a inoculação. No segundo

experimento em campo, a inoculação com ZAE94 foi superior aos demais tratamentos, com aumentos de até 36%, quando suplementados com dose equivalente a 100 kg de N ha<sup>-1</sup>. Os resultados mostraram que a inoculação com ZAE94, apesar de não ter substituído a adubação nitrogenada, mostrou-se promissor com potencial para ser utilizado como insumo biológico.

**Palavras-chave:** *Zea mays* L; inoculação; *Herbaspirillum seropedicae*.

---

\*Orientador: Joilson Silva Ferreira, D.Sc., UESB. Co-orientadora: Vera Lúcia D. Baldani, D.Sc., EMBRAPA

## ABSTRACT

SANTOS, Joelma da Silva. **ISOLATION AND INOCULATION OF DIAZOTROPHIC BACTERIA IN MAIZE CULTIVATION IN VITÓRIA DA CONQUISTA - BA.** 97 p. (Master Degree in Agronomy, Phytotechnology). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, Vitória da Conquista – BA, 2013.

Nitrogen is one of the major nutrients which limit the production, and this makes them highly dependent on this chemical element through mineral fertilization which is very expensive. In this context, the Biological Nitrogen Fixation (BNF), accomplished by the diazotrophic bacteria is the main natural process to make N available for cultivations. However, different from what is reported in the literature for leguminous, the results of the BNF in Poaceae vary, and this might be related to the mechanisms of association which have not been well elucidated yet. Therefore, the inoculation of diazotrophic bacteria isolated from native plants and adapted to the region can be a strategy to obtain efficient results for these cultivations. The aim of this project is to isolate, characterize, inoculate and select diazotrophic bacteria in the corn grown in Vitória da Conquista - BA. The study was conducted in three experiments. The first experiment was done in a greenhouse, and the aim was to isolate native diazotrophic bacteria. The second and third were conducted under field conditions, in order to evaluate the inoculation effect with the *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 strain, recommended by Embrapa Agrobiologia, and then an evaluation of the performance of the new isolated native in contrast with ZAE94 and the commercially recommended inoculant for cultivation, respectively. The first and second experiments were carried out in a 2 x 4 factorial scheme, with and without presence of inoculation with ZAE94 strain and three nitrogen doses (60, 100 and 140 kg N ha<sup>-1</sup>) and a control, arranged in DIC and DBC, with five replications. The third experiment was carried out in a 3x5 DBC factorial scheme, with two N doses (60 and 100 kg N ha<sup>-1</sup>) and a control, the inoculations were with ZAE94, J10 and N13 a commercial, isolated native inoculant, and control. The agronomic parameters in the three experiments were: plant heights (PH), DMAP, N% and N-total; AP, stem diameter, cob length, number and diameter of cob, final stand, 1000-grain weight, productivity and in the last experiment only productivity. In the greenhouse experiment, the inoculation caused increases in the accumulation of 14,3% and 44,3% in the DMAP of the N-Total when combined with the 60 kg N ha<sup>-1</sup> dose.

It was not observed significant differences for the inoculation in the first field experiment. In the second field experiment, the inoculation with ZAE94 was higher than the other treatments, with increases of up to 36% when supplemented with a dose equivalent to 100 kg N ha<sup>-1</sup>. The results showed that the inoculation with ZAE94 despite not having replaced the nitrogen fertilization showed to be a promising method with the potential to be used as biological input.

**Keywords:** *Zeamays* L; inoculação; *Herbaspirillum seropedicae*

---

\*Adviser: Jilson Silva Ferreira, *D.Sc.*, UESB. Co-adviser: Vera Lúcia D. Baldani, *D.Sc.*, *EMBRAPA*



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Massa seca da parte aérea de plantas de milho com ausência e presença de inoculação de *H. seropedicae* (ZAE94) e diferentes dosagens de N, cultivadas em casa de vegetação. Vitória da Conquista - BA..... 46

Tabela 2 - Teor de N percentual (%) na massa seca da parte aérea de plantas de milho, com presença e ausência de inoculação com *H. seropedicae* (BR 11417), cultivadas em casa de vegetação. Vitória da Conquista – BA. 2011.....47

Tabela 3 - Ocorrência de bactérias diazotróficas encontradas em plantas de milho cultivadas em casa de vegetação e quantificadas pela técnica do número mais provável (NMP).....49

Tabela 4 - Número de isolados de bactérias diazotróficas obtidos em meios de cultura JNFb, NFb e LGI, isolados de plantas de milho.....50

Tabela 5 – Redução de acetileno, produção de ácido indol-acético e solubilização de fosfato por isolados similares ao gênero *Herbaspirillum* e *Azospirillum* em

condições *in vitro*.....55- 56

Tabela 6 - Produtividade com presença e ausência de inoculação com *H. seropedicae* (BR11417) estirpe ZAE94, cultivado em Vitória da Conquista – BA, 2011/2012. Média de 5 repetições.....67

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Acúmulo total de nitrogênio ( $\text{g.planta}^{-1}$ ) em parte aérea de plantas de milho, com presença e ausência de inoculação (ZAE94) e diferentes dosagens de N, cultivados em casa de vegetação. Vitória da Conquista - BA..... 48
- Figura 2 - Altura de plantas de milho híbrido AG 1051 em função de doses de nitrogênio, cultivado em Vitória da Conquista – BA, 2011/2012. Média de 5 repetições com presença e ausência de inoculação..... 60
- Figura 3 - Análise de regressão para (A) o peso de 1000 grãos e (B) comprimento da espiga (C), produtividade em função da doses de nitrogênio (0, 60, 100 e 140  $\text{Kg ha}^{-1}$ ), com presença e ausência de inoculação com *H. seropedicae* (BR11417), estirpe ZAE94, cultivado em Vitória da Conquista – BA. 2011/2012. .... 63

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

FBN	Fixação biológica de nitrogênio
MSPA	Massa seca da parte aérea
°C	Graus Celsius
Cm	Centímetros
C.V.	Coeficiente de variação
AP	Altura de plantas
CE	Comprimento da espiga
DE	Diâmetro da espiga
NE	Número de espigas
ES	Estande final
P1000G	Peso de mil grãos
PROD	Produtividade
Há	Hectare
NMP	Número mais provável
CONAB	Companhia Nacional de abastecimento
%N	Porcentagem de nitrogênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
AIA	Ácido indol – acético
ARA	Atividade de redução de acetileno
MS	Massa seca
N	Nitrogênio
RPM	Rotação por minuto
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
%	Porcentagem
Mg ha <sup>-1</sup>	Mega grama por hectare
PGPR	Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO MILHO.....	17
2.2 NITROGÊNIO.....	18
2.3 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO.....	21
2.4 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 CARACTERÍSTICAS DA ÁREA EXPERIMENTAL.....	28
3.2 EXPERIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO: INOCULAÇÃO E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM CONDIÇÕES EDAFOCLIMÁTICAS DE VITÓRIA DA CONQUISTA – BA.....	28
3.2.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	28
3.2.2 CARACTERÍSTICA DO GENÓTIPO.....	29
3.2.3 IMPLANTAÇÃO, INOCULAÇÃO E ADUBAÇÃO.....	29
3.2.4 COLETA DE DADOS E VARIÁVEIS ANALISADAS.....	29
3.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
3.3 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS.....	30
3.3.1 ISOLAMENTO E CONTAGEM.....	30

<b>3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS ORIUNDOS DE VITÓRIA DA CONQUISTA - BA</b>	<b>31</b>
<b>3.4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA</b>	<b>31</b>
<b>3.4.2 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA</b>	<b>32</b>
<b>3.4.2.1 ATIVIDADE DA ENZIMA NITROGENASE</b>	<b>32</b>
<b>3.4.2.2 PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-ACÉTICO (AIA)</b>	<b>33</b>
<b>3.4.2.3 SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO</b>	<b>34</b>
<b>3.5 PRIMEIRO EXPERIMENTO A CAMPO: INOCULAÇÃO COM A BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA ZAE94 DE H.SEROPEDICAE (BR 11417) TESTADA EM CONDIÇÕES EDAFOCLIMÁTICAS DE VITÓRIA DA CONQUISTA - BA.</b>	<b>34</b>
<b>3.5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</b>	<b>34</b>
<b>3.5.2 INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO</b>	<b>35</b>
<b>3.5.3 COLETA DE DADOS, VARIÁVEIS ANALISADAS E ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>36</b>
<b>3.6 SEGUNDO EXPERIMENTO A CAMPO: COMPARAÇÃO DOS NOVOS ISOLADOS COM A ESTIRPE ZAE94 E INOCULANTE COMERCIAL TESTADO NAS CONDIÇÕES</b>	

<b>EDAFOCLIMÁTICAS DE VITÓRIA DA CONQUISTA - BA.</b> .....	<b>36</b>
<b>3.6.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>37</b>
<b>3.6.2 PREPARO DO INOCULANTE</b> .....	<b>37</b>
<b>3.6.3 INSTALAÇÃO E CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO</b> .....	<b>37</b>
<b>3.6.4 COLETA DE DADOS, VARIÁVEL ANALISADA E ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>38</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>4.1 EXPERIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO: INOCULAÇÃO E ISOLAMENTO COM BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA</b> .....	<b>39</b>
<b>4.2 ISOLAMENTO E CONTAGEM DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS</b> .....	<b>43</b>
<b>4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS NOVOS ISOLADOS</b> .....	<b>46</b>
<b>4.4 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA</b> .....	<b>47</b>
<b>4.4.1 PRODUÇÃO DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO (ÁCIDO INDOL-ACÉTICO - AIA)</b>	<b>47</b>
<b>4.4.1 ATIVIDADE DA ENZIMA NITROGENASE</b> ...	<b>50</b>
<b>4.4.3 SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO</b> .....	<b>52</b>
<b>4.5 PRIMEIRO EXPERIMENTO DE CAMPO: INOCULAÇÃO COM A BACTÉRIA DIAZOTRÓFICAS ZAE94</b> .....	<b>53</b>

<b>4.6 SEGUNDO EXPERIMENTO DE CAMPO: AVALIAÇÃO DOS NOVOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS INOCULADAS NA CULTURA DO MILHO CULTIVADO EM VITÓRIA DA CONQUISTA – BA, EM CONTRASTE COM A ESTIRPE ZAE94 E INOCULANTE COMERCIAL RECOMENDADO PARA A CULTURA DO MILHO.</b> .....	<b>60</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>64</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>86</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>90</b>



## 1. INTRODUÇÃO

O milho é uma das culturas agrícolas mais importantes do mundo. No Brasil, esse grão tem importância tanto no cenário econômico como no social, sendo empregado na alimentação humana e animal, além de servir como matéria prima para diversos processos alimentícios, também constitui um grande produto para a exportação brasileira.

De acordo com Duarte e outros (2010), aproximadamente 70% do milho produzido no mundo são destinados ao preparo de rações, para criação de aves e suínos. No Brasil, 90% da produção de milho estão concentradas nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, sendo que 70 a 80% são utilizadas na indústria de alimentos para animais (KWIATKOWSKI; CLEMENTE, 2009).

O crescente aumento populacional demanda incremento na produção das principais culturas de importância agrícola, como o milho, que possui alto valor proteico para atender e suprir a demanda mundial de alimentos, tanto humana como animal.

Entretanto, para se alcançar elevadas produtividades, as culturas de modo geral necessitam de nutrientes minerais, essenciais para o seu desenvolvimento. Dentre esses nutrientes, o nitrogênio é um dos mais limitantes à produção das culturas.

Embora o nitrogênio constitua cerca de 78% dos gases atmosféricos e compreenda um dos elementos mais abundantes do planeta, esse nutriente é limitado para as plantas, devido à estabilidade existente entre a tripla ligação das duas moléculas de  $N_2$ , tornando esse gás estável à temperatura ambiente (SPRENT & SPRENT, 1990).

A principal fonte de N no solo é a matéria orgânica, que está presente na camada superficial do solo, que sofre as ações adversas do meio, como as precipitações pluviais, ocasionando perdas seletivas de diversos elementos

localizados nessa camada, provocando limitações na produção agrícola (DAROS, 1993), favorecendo a desnitrificação e lixiviação de compostos nitrogenados, contribuindo, assim, para a dependência da aplicação de fertilizantes nitrogenados (DÖBEREINER, 1992).

Além da matéria orgânica, existe um aporte de nitrogênio aos solos, por meio de processos como relâmpagos, reações fotoquímicas e fixação biológica do nitrogênio (FBN), que são responsáveis pelo fornecimento de aproximadamente 8,2 e 90% de N para o solo, respectivamente (TAIZ & GEIZER, 2004). Desses processos naturais, a FBN é o que mais contribui para o fornecimento desse nutriente para o ambiente no solo, e é realizado pela ação de bactérias diazotróficas que possuem a enzima nitrogenase, capaz de quebrar a tripla ligação covalente existente entre os dois átomos de nitrogênio atmosférico e reduzi-los à amônia, em condições naturais (REIS e outros, 2005). O contrário é observado na aquisição de N, via processos industriais, para a obtenção de fertilizantes nitrogenados sintéticos, uma vez que, para produção desses insumos, empregam-se altas temperaturas e pressões, elevando os custos financeiros, energéticos e ambientais (HUNGRIA e outros, 2001).

A utilização das bactérias diazotróficas pode representar uma grande estratégia para reduzir a dependência de fertilizantes nitrogenados sintéticos (CONCEIÇÃO e outros, 2009), além disso, as *Poaceas* (antigas gramíneas) possuem uma elevada capacidade para absorção de nutrientes, sobretudo, para o nitrogênio, devido ao seu sistema radicular fasciculado, que se constitui também em uma importante estratégia para a reciclagem desse nutriente (PERIN e outros, 2004), visto que, das quantidades de N adicionadas ao solo, muito pouco é recuperado pelas plantas.

Outro aspecto favorável é o emprego de microrganismos, capazes de promover efeitos benéficos às plantas como promoção de crescimento vegetal, constitui uma importante vantagem, uma vez que essa interação eucarioto x

procarioto não representa fonte de contaminação ambiental, e pode suprir parcialmente as necessidades de N requeridas por diversas culturas, reduzindo, dessa forma, o uso de fertilizantes nitrogenados com diminuição de custos para o produtor (MOREIRA e outros, 2010).

Os maiores efeitos da FBN são observadas em espécies leguminosas, notadamente, na cultura da soja, entretanto, nos últimos anos, o isolamento e a posterior inoculação com diversas espécies de bactérias diazotróficas, em diferentes culturas, sobretudo nas gramíneas, têm revelado efeitos positivos, negativos e, muitas vezes, inconsistentes, dos benefícios provenientes dessa interação plantas x bactéria nas mais diversas culturas (KENNEDY e outros, 2004; BALDANI & BALDANI, 2005; GUIMARÃES e outros, 2007; FERREIRA e outros, 2010).

O isolamento e a posterior inoculação com estirpes homólogas de bactérias diazotróficas nativas, que colonizam plantas de milho, podem apresentar melhores efeitos quanto a FBN, em comparação com estirpes provenientes de outras regiões do Brasil, uma vez que os isolados nativos possuem uma melhor adaptação às condições edafoclimáticas regionais (BALDANI & BALDANI, 2005).

A região Nordeste, notadamente, as lavouras do oeste da Bahia e Cerrado piauiense, vem ganhando destaque na produção nacional de grãos de milho. No entanto, o emprego de técnicas biotecnológicas, como a utilização de insumos biológicos, à base de bactérias diazotróficas poderia contribuir de forma ainda mais significativa para o plantio em escala comercial, assim como, para as lavouras em pequenas propriedades rurais, compostas significativamente por agricultores familiares que também poderão se beneficiar do uso dessa nova tecnologia.

Objetivou-se, por este estudo, isolar, caracterizar, inocular e selecionar bactérias diazotróficas na cultura do milho cultivado em Vitória da Conquista – BA.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Importância da cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma monocotiledônea pertencente à família Poaceae, tribo *Maydeae* e gênero *Zea* (FANCELLI & LIMA, 1982). É uma das culturas agrícolas mais antigas e difundidas do mundo, cultivada a mais de 6000 anos (PIPERNO & FLANNERY, 2001). O cultivo se expandiu em escala mundial após o reconhecimento do seu valor alimentício (NORMAN e outros 1995; TOLLENAAR & DWYER, 1999).

Os maiores produtores mundiais de milho são os Estados Unidos e China seguido pelo Brasil, terceiro maior produtor. Na agricultura brasileira, a produção agrícola é amplamente difundida, porém, há diferenças entre as regiões produtoras. As regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste são responsáveis por 90% da produção nacional, com a segunda maior área cultivada, perdendo apenas para a cultura da soja (CONAB, 2013).

A produção brasileira de milho na safra 2011/2012 alcançou patamares de 72.731,2 milhões de toneladas (primeira e segunda safra), cultivados em 15.156 milhões de hectares (CONAB, 2012).

Por apresentar alto valor energético, o milho possui uma utilização bastante difundida e suas reservas acumuladas nos grãos apresentam composição média em torno de 60% carboidratos (amido), 10% proteínas, 4% lipídios (FANCELLI & LIMA, 1982).

A ampla utilização desse grão, em dietas animais e humana, como matéria prima para diversos produtos industrializados e para produção de bioenergia, fundamenta a importância econômica dessa cultura (PINOTTI e outros 2009). No Brasil, são destinados cerca de 4% da produção para a

alimentação humana de forma direta e 10% para as indústrias alimentícias, onde diversos produtos são processados (PAES, 2006).

No aspecto social, sua importância está relacionada ao elevado número de pequenos produtores rurais, com pequenas áreas agricultáveis, com baixo nível tecnológico, resultando em baixos índices de produtividade, realidade oposta acontece com os grandes produtores (DUARTE e outros 2011).

Costa e outros (2005) ressaltam que, dentre os diversos fatores que influenciam a produtividade do milho, os principais são a adubação nitrogenada, potencial genético das sementes, condições climáticas, especialmente temperatura e radiação solar, e o manejo da população de plantas.

Pertencente ao grupo de plantas C4, o milho não apresenta saturação à radiação solar, o que lhe permite alcançar elevados índices de produtividade (FANCELLI & DOURADO NETO, 2000), que ocorrem quando a máxima área foliar coincide com a maior captação de energia radiante, desde que não haja estresse hídrico (BERGAMASHI, 2004).

No cenário nacional, na safra agrícola 2011/2012, o Estado do Paraná obteve a maior produção, atingindo 16.917,1 mil toneladas. Na região Nordeste, o Estado da Bahia destacou-se como maior produtor, alcançando 2.174,3 mil toneladas (CONAB, 2012), sendo que a região Oeste do Estado possui dois municípios nos quais concentram a maior produção da cultura do milho. Barreiras está no ranking, com produção de 217.054 toneladas, seguida de Luis Eduardo Magalhães, com produção 152.797 toneladas. Já na região Sudoeste, o município de Vitória da Conquista possui em média 400 hectares de área plantada com produção de 200 toneladas (IBGE, 2010).

## **2.2 Nitrogênio**

O nitrogênio é um dos elementos químicos mais abundantes da natureza, fundamental para manutenção da vida. É um dos principais constituintes dos

aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, clorofila, e muitos outros importantes constituintes celulares, tornando-se um elemento essencial para todos os organismos vivos (SORATTO, 2010).

A disponibilidade de nitrogênio é um fator limitante na produtividade agrícola. O nitrogênio é um dos nutrientes absorvidos em maior quantidade pelas culturas. No milho, esse nutriente influencia diretamente na produtividade de grãos (AMADO e outros 2002). Para produção de uma tonelada de grãos por hectare, são absorvidos entre 18 a 20 kg de nitrogênio pela planta, destes, aproximadamente, 15 kg migram para o grão, sendo exportados da área agrícola (FANCELLI, 2000; RESENDE e outros 2003).

Nutriente mais exigido pelas culturas, o N só é superado em quantidade apenas pelos macronutrientes fósforo e potássio (RAIJ,1991). Na cultura do milho, as exigências de N não ocorrem de forma constante ao longo do ciclo da cultura, pois nos estádios iniciais são observadas as menores exigências, a demanda por N eleva-se com o aumento da taxa de crescimento, requerendo quantidades superiores durante a fase de florescimento até início da formação dos grãos (ARNON, 1975).

Embora o nitrogênio represente aproximadamente 78% dos gases atmosféricos, as plantas não conseguem utilizá-lo diretamente como nutriente, devido à tripla ligação covalente existente entre os dois átomos de  $N_2$  atmosférico para produzir amônia (HUNGRIA e outros 2001).

Na natureza, os principais fornecedores de nitrogênio para as plantas são os relâmpagos, reações fotoquímicas, a fixação biológica do nitrogênio (TAIZ & GEIZER, 2004) e a decomposição da matéria orgânica do solo.

No solo, 98% do nitrogênio estão presentes na forma orgânica, no entanto, apenas 2% estão disponíveis nas formas inorgânicas de amônio e nitrato (MALAVOLTA, 2006), sendo resultantes da mineralização realizada pela

atividade da microbiota do solo ou por aplicação de fertilizantes nitrogenados (CORDEIRO & HOEK, 2007).

As reservas de nitrogênio presentes na matéria orgânica do solo são limitadas, principalmente nos solos tropicais, devido à temperatura e umidade, podendo esgotar após alguns cultivos, sendo que através da fertilização nitrogenada obtém-se a rápida assimilação deste elemento (HUNGRIA e outros 2001), por meio da ação sequencial das enzimas nitrato redutase e nitrito redutase, que atuam na redução do  $\text{NO}_3^-$  em  $\text{NH}_4^+$  (SOUZA & FERNANDES, 2006).

Cantarella & Marcelino (2008) relatam que, na agricultura brasileira para a cultura do milho, geralmente é empregado fertilizantes solúveis em água, tais como a ureia, o sulfato de amônio e o nitrato de amônio, liberando no solo íons de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ).

A forma artificial de se obter nitrogênio para os fertilizantes é pelo processo de Haber – Bosh, no qual o  $\text{N}_2$  combina-se com hidrogênio formando amônia. Para tanto, empregam-se temperaturas entre  $300^\circ$  e  $600^\circ\text{C}$  e pressões variando de 200 a 800 atmosferas. Este processo requer alto custo, visto que utilizam recursos naturais não renováveis derivados do petróleo (HUNGRIA e outros 2001; NORSE, 2003).

Hungria e outros (2001) afirmam que o uso elevado de fertilizantes aumentam os custos de produção, como também está associada à fonte de contaminação ambiental. Além disso, cerca de 50% do N adicionado na forma de fertilizantes é perdido por desnitrificação, volatilização da amônia e lixiviação, poluindo águas superficiais e subterrâneas, apresentando riscos à saúde (BOCKMAN e outros 1997; STOLTZFUS e outros 1997), além de provocar a acidificação do solo e eutrofização da água (DIXON e KAHN, 2004; KENNEDY e TCHAN, 1992).



Ao longo dos anos, têm-se buscado alternativas para diminuir o uso exagerado de fertilizantes, de forma que não acarrete a queda da produtividade das culturas. Para isso, procura-se utilizar dos microrganismos presentes no solo e no interior de plantas, para produção de adubos biológicos. Estes adubos disponibilizam nutrientes essenciais à cultura, promovem crescimento e uma maior produtividade dessas. Sendo assim, pode-se obter alta produtividade, com baixo custo e com menos agressão ao ambiente (ARRUDA, 2012).

### **2.3 Fixação Biológica do nitrogênio**

O processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um dos processos mais importantes conhecidos na natureza, restrito a alguns microrganismos procariotos (REIS, 2005).

Realizado por organismos fixadores de nitrogênio, dentre os quais se destacam as bactérias diazotróficas, esses microrganismos possuem um complexo enzimático, denominado nitrogenase, capaz de reduzir o nitrogênio atmosférico à amônia em condições biológicas (REIS, 2005; ROESCH e outros 2007).

A FBN é um processo que recicla o nitrogênio constantemente para a atmosfera, principalmente pela ação de organismos decompositores de matéria orgânica do solo, no qual captam o nitrogênio presente no ar, tornando-o assimilável pelos vegetais, garantindo, dessa forma, aos ecossistemas terrestres, um reservatório inesgotável deste elemento à atmosfera (PEOPLES & CRASWELL, 1992).

Entre todas as bactérias procariontes existentes na natureza, acredita-se que apenas 5% desses microrganismos possuem os genes codificantes responsáveis para realizar o processo biológico de fixação de nitrogênio (RAYMOND e outros 2004).

Presentes nos mais diferentes habitat terrestres, esses microrganismos possuem uma grande diversidade morfológica, fisiológica, genética, bioquímica e filogenética (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002), podendo ser encontrados em associação com as plantas em interações simbióticas, ou mesmo de vida livre no solo ou na água (DIXON & KAHN, 2004).

São nas raízes que estão em contato direto com solo, numa região chamada de rizosfera, onde ocorre a maioria das interações entre os microrganismos e plantas (LUSTER e outros 2009).

Associadas às raízes ou próximas a estas, vivem uma diversidade de bactérias capazes de promover maior absorção de nutrientes, nas quais são transferidos para as plantas por diversos mecanismos, como pela FBN, produção de substâncias reguladoras de crescimento, produção de antibióticos e siderofóros e solubilização de nutrientes como o fósforo. Esses microrganismos são denominados de Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (HAYAT e outros 2010).

#### **2.4 Bactérias Diazotróficas**

Considerando que o nitrogênio é um elemento essencial para a nutrição de todos os organismos eucariotos, a FBN constitui-se de um processo fundamental que é realizado pela ação de microrganismos procariotos, presentes nos mais variados ecossistemas terrestres que atuam decisivamente na manutenção da vida na terra.

Diversos grupos filogenéticos encontrados na natureza possuem a habilidade de fixar nitrogênio, tais como: bactérias verdes sulfurosas, actinomicetos, cianobactérias e todas as subdivisões de Proteobacteria e Archaea (DIXON & KAHN, 2004).

As bactérias diazotróficas são nomeadas de acordo com os locais de colonização destas na planta e no solo. Os gêneros *Paenibacillus*, *Beijerinckia*, *Azotobacter* e *Klebsiella*, por exemplo, são habitantes do solo, próximo às raízes associadas às plantas por processos ainda desconhecidos e que variam em espécies vegetais (KUSS, 2006).

As bactérias associativas são aquelas capazes de colonizar as raízes dos vegetais, nas quais se destacam várias espécies do gênero *Azospirillum*. Atualmente, há quatorze espécies identificadas: *A. brasiliense* e *A. lipoferum* (TARRAND e outros 1978), *A. amazonense* (MAGALHÃES e outros, 1983), *A. halopraeferens* (REINHOLD e outros, 1983), *A. irakense* (KHAMMAS e outros 1991), *A. largomobile* (DEKHIL e outros, 1997), *A. doebereinae* (ECKERT e outros, 2001), *A. oryzae* (XIE & YOKOTA, 2005), *A. melinis* (PENG e outros, 2006), *A. canadense* (MEHNAZ e outros, 2007a), *A. zae* (MEHNAZ e outros, 2007b), *A. rugosum* (YOUNG e outros, 2008), *A. picis* (LIN e outros, 2009), *A. thiophilum* (LAVRINENKO e outros, 2010).

Os gêneros *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Azoarcus* são bactérias diazotróficas endofíticas (BALDANI e outros 2002) que possuem a capacidade de penetrar na planta e colonizar sistematicamente o hospedeiro, podendo habitar as partes sistêmicas da planta, como caules, folhas e raízes, além de possuírem a capacidade de fixar nitrogênio da atmosfera. O interior das plantas irá estabelecer uma proteção para estes microrganismos contra os fatores inibitórios, como o oxigênio, além de proporcionar um habitat rico em fontes de carbono (ARRUDA, 2012).

Além disso, haverá uma menor competição com outros microrganismos e uma maior eficiência destes na transferência de compostos essenciais ao desenvolvimento da planta (DOBBELAERE e outros 2003).

Com o auxílio da microscopia eletrônica e da biologia molecular, foi possível identificar uma grande diversidade de bactérias diazotróficas em

diferentes espécies agrícolas, como milho, batata, trigo, arroz, cana-de-açúcar e sorgo (BENT & CHANWAY, 2002).

Baldani e outros (1997) relataram que esses endófitos obrigatórios, geralmente, não sobrevivem bem no solo e colonizam poucas plantas hospedeiras. Aliado a isso, essas bactérias apresentam grande potencial na FBN, devido a sua habilidade para colonizar diferentes partes da planta e estabelecer-se dentro de nichos protegidos do oxigênio e/ou de outros fatores, podendo, dessa forma, expressar seu potencial para fixar nitrogênio em grau máximo (KENNEDY e outros 1997).

O gênero *Herbaspirillum*, descrito por Baldani e outros (1986), compreende bactérias diazotróficas endofíticas, obrigatórias, gram-negativas, microaeróbicas, capazes de utilizar diferentes fontes de carbono.

Atualmente, esse gênero compreende dez espécies identificadas, sendo elas: *H. seropedicae* (BALDANI e outros 1986), *H. rubrisubalbicans* (BALDANI e outros 1996a), *H. frinsigense* (KIRCHHOF e outros 2001), *H. lusitanum* (VALVERDE e outros 2003), *H. clorofenolicum*, *H. huttiense*, subsp. putei (DING E YOKOTA, 2004) e *H. hiltneri* (ROTHBALLER e outros 2006), *H. rhizosphaerae* (JUNG e outros, 2007), *H. autotrophicum* e *H. aquaticum* (DOBRITSA e outros, 2010).

*Herbaspirillum seropedicae* pertence à classe  $\beta$  das Proteobacterias e foi a primeira espécie descrita do gênero, toleram mudanças de pH, variando de 5,3 a 8,0 (BALDANI e outros 1986), e possuem baixa sobrevivência no solo, desaparecendo em menos de trinta dias após sua inoculação com grande número de células (BALDANI e outros 1996a). É uma das diversas espécies capazes de produzir fitohormônios (BASTIAN e outros 1998).

Denominadas de Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (BPCV), esses microrganismos, além de realizar o processo de FBN, possuem a habilidade de estimular o crescimento vegetal com a produção de hormônios de

crescimento como auxinas e giberelinas, que promovem o crescimento radicular dos vegetais (DOBBELAERE e outros 1999; LAMBRECHT e outros 2000; RADWAN e outros 2002).

Além disso, outra característica observada em alguns grupos das BPCV é a proteção que algumas bactérias conferem à planta contra microrganismos patogênicos, através da produção de sideróforos, antibiose, chitinases e glucanases, que podem atuar na degradação das células das bactérias patogênicas (WHIPPS, 2001).

Diversos gêneros são conhecidos como BPCV, dentre eles destacam-se: *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, além dos rizóbios que não se enquadram nos gêneros citados (REIS e outros 2000; SOMERS e outros 2004)

Contudo, os pesquisadores ainda não conseguiram desvendar os mecanismos exatos sobre a promoção e o crescimento das plantas, mediados pelas BPCV (ARSHAD & FRANKENBERGER, 1993; GLICK, 1995). Sabe-se que a resposta da planta à inoculação pode ser influenciada pelas interações entre BPCV, microrganismos nativos do solo e a planta hospedeira.

Neste contexto, é importante o conhecimento da biodiversidade presente no solo, assim como a identificação das bactérias diazotróficas endofíticas que habitam os tecidos vegetais, a fim de selecionar estirpes eficientes e mais adaptadas às condições ambientais das diferentes regiões, visto que estas possuem um grande potencial biotecnológico e podem contribuir significativamente no fornecimento de nitrogênio fixado biologicamente em detrimento dos fertilizantes nitrogenados sintéticos.

Segundo Alves (2007), países como EUA, Itália, Alemanha, Bélgica, México e Argentina vêm desenvolvendo, ao longo dos anos, inoculantes

comerciais contendo bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum*, sendo empregados em algumas culturas.

No Brasil, apenas no ano 2009 foi disponibilizado no mercado o primeiro inoculante comercial à base de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum*, da espécie *Azospirillum brasilense*. Desenvolvidos para gramíneas, esse produto é indicado para as culturas do milho, trigo e arroz, e foi resultado de parceria/pesquisa entre a empresa Stoller do Brasil com órgãos oficiais como a Embrapa Soja e a Universidade Federal do Paraná.

Zilli e outros (2007), avaliando a produtividade de grãos de arroz e milho inoculados com *Herbaspirillum seropedicae* (estirpe ZAE94), obtiveram aumentos significativos com o híbrido de milho BRS 1010, quando inoculado. No arroz não foram observados incrementos significativos, quando inoculados com a estirpe ZAE94.

Alves (2007), testando a estirpe BR 11417 de *H. seropedicae* em condições de campo, no período safrinha, verificou que o híbrido de milho BR 1030 apresentou respostas satisfatórias em relação à inoculação.

Guimarães e outros (2003), em condições de campo, observaram que a inoculação com a estirpe ZAE94 promoveu aumento de 50% na produção de grãos de arroz da variedade Guarani.

Ferreira e outros (2010), avaliando a sobrevivência de bactérias diazotróficas em dois inoculantes à base de turfa, verificaram que a inoculação com a estirpe ZAE94 aumentou em até 13 e 19% a produção e o N-total dos grãos, respectivamente, na variedade de arroz IAC4440.

Em estudos recentes, pesquisadores da Embrapa Agrobiologia desenvolveram um inoculante à base de cinco espécies de bactérias diazotróficas endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. O novo inoculante, que vem sendo testado é composto pelas espécies *Gluconacetobacter diazotrophicus*,

*Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica* (OLIVEIRA e outros, 2006).

Oliveira e outros (2006), avaliando a resposta em condições de campo de duas variedades de cana-de-açúcar, cultivadas em três tipos de solo, inoculadas com duas misturas das estirpes selecionadas, observaram efeitos positivos da inoculação com a mistura das bactérias diazotróficas em variedades de cana-de-açúcar, cultivadas em solos com níveis baixos e médios de fertilidade sem a suplementação de adubação nitrogenada.

Em gramíneas como o milho e outros cereais, o uso de inoculantes pode substituir o nitrogênio sintético de forma parcial no cultivo destas culturas. A FBN pode contribuir em aumento de 20 a 30% na assimilação de nitrogênio, em especial, à cultura do milho (MOREIRA e outros 2010). Estes resultados evidenciam os benefícios que as PGPR podem proporcionar ao disponibilizar nitrogênio às plantas para serem usadas em seu metabolismo e crescimento (ARRUDA, 2012).

O uso do inoculante com *A. brasilense* em milho, arroz e trigo vem sendo utilizado no Brasil, devido ao seu efeito benéfico na produtividade destas culturas, e sua contribuição a este quesito pode chegar a 25% no aumento da produção (HUNGRIA e outros 2010).

A inoculação com estirpes de *H. seropedicae* contribuiu com aumentos significativos de até 50% no desenvolvimento da cultura do milho sobre condições de casa de vegetação, e mesmo tendo um decréscimo de 20%, quando testadas em campo, esta estirpe tem sido bastante estudada sobre seus efeitos benéficos a essa cultura (RIGGS e outros 2001).

A cultura do milho destaca-se pelo seu valor econômico e por ter capacidade de ser colonizada por diversas bactérias diazotróficas, que contribuem para o maior desenvolvimento de pesquisas com inoculação com isolados dessas bactérias (ROESCH, 2007).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Características da área experimental

O estudo foi conduzido em casa de vegetação, na Área Experimental da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, *Campus* de Vitória da Conquista, localizada na região Sudoeste do Estado da Bahia, cujas coordenadas geográficas são 14°51' latitude Sul, 40°50' longitude oeste, tendo 928 metros de altitude. De acordo com Köppen, o clima do município foi classificado como tropical de altitude (Cwb), com médias de temperatura máxima e mínima de 25,3° e 16,1°C, respectivamente, e precipitação média anual de 733,9 mm, concentrada no período de novembro a março (BRASIL, 1992).

O solo utilizado no experimento foi retirado da camada 0 - 20 cm do horizonte A de um Latossolo Amarelo típico, coletados no *Campus* acima citado. A análise química do solo apresentou os seguintes resultados: pH em água = 5,4; P = 2 mg DM<sup>-3</sup>; K = 0,10 Cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; M.O = 22 g dm<sup>-3</sup>. As recomendações das correções foram realizadas segundo Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais (ALVAREZ & RIBEIRO, 1999).

#### 3.2. Experimento em casa de vegetação: inoculação e isolamento de bactérias diazotróficas em condições edafoclimáticas de Vitória da Conquista - BA

##### 3.2.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, totalizando 40 vasos com capacidade para 9 Kg. O Experimento foi conduzido em um esquema fatorial 2 x 4, com presença e



ausência de inoculante da estirpe ZAE94 e quatro doses de nitrogênio, na forma de sulfato de amônio (0, 60, 100 e 140 kg N ha<sup>-1</sup>).

### **3.2.2 Característica do genótipo**

O genótipo avaliado foi o híbrido AG 1051 Agrocere, que possui ciclo semiprecoce, florescimento em torno dos 59 dias, dependendo das condições do ambiente; apresenta altura média de 2,53 metros e produtividade média de 9.000 Mg ha<sup>-1</sup>. Além disso, é líder para produção de pamonha e milho verde e muito utilizado para silagem (AGROCERES, 2012).

### **3.2.3 Implantação, inoculação e adubação**

O experimento foi implantado em 02/06/2011, quando foi utilizado veículo turfoso contendo a estirpe ZAE94 (BR 11417) de *Herbaspirillum seropedicae* com uma população estabelecida de 10<sup>9</sup> células g<sup>-1</sup> de inoculante para os tratamentos com inoculação, na proporção de 250g de inoculante para 10 kg de semente de milho (ALVES, 2007). Foram semeadas 4 sementes do híbrido AG 1051 por vaso. Todos os tratamentos inoculados com ZAE94 receberam adubação nitrogenada equivalente a 0, 60, 100 e 140 Kg ha<sup>-1</sup>. A primeira aplicação de fertilizante foi realizada 15 dias após o plantio e a segunda aplicação aos 20 dias. O desbaste foi realizado 18 dias após a emergência das plântulas, mantendo-se duas plantas por vaso.

### **3.2.4 Coleta de dados e variáveis analisadas**

A coleta de dados foi realizada 45 dias após o plantio, na qual foram avaliados a altura de plantas, acúmulo de massa seca da parte aérea, N% e N-Total. O teor de N foi determinado pela digestão de Kjeldahl, conforme descrito por Bremner & Mulvaney (1982). O isolamento das bactérias diazotróficas foi

realizado com as plantas, testemunhas absolutas, sendo o material coletado encaminhado à Embrapa Agrobiologia, para o isolamento das bactérias diazotróficas, oriundas das condições edafoclimáticas da região.

### ***3.2.5 Análise estatística***

Os dados foram analisados no programa SAEG 8.0 (EUCLYDES, 1983) quanto à sua normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variância (teste de Cockran e Bartlet). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sisvar 5.0 (FERREIRA, 2003).

## **3.3 Isolamento das bactérias diazotróficas**

### ***3.3.1 Isolamento e contagem***

O isolamento das bactérias diazotróficas foi realizado no laboratório de gramíneas da Embrapa Agrobiologia, em Seropédica - RJ.

As plantas de milho foram desinfestadas superficialmente em água corrente e, em seguida, com água destilada, para eliminação dos resíduos do solo. As plantas foram separadas em raiz e parte aérea. As amostras foram fragmentadas pesando-se 5g. Em seguida, foram trituradas em liquidificador com 45 mL de solução salina, a fim de obter uma solução na concentração  $10^{-1}$ . Posteriormente, realizaram-se diluições seriadas de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$ , transferindo-se 1 mL da suspensão de cada diluição para tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina. Para cada uma das diluições, alíquotas de 0,1mL, foram inoculadas em triplicata, em frascos de vidros de penicilina contendo 5 mL dos

meios semissólidos livres de N, JNFb para *Herbaspirillum seropedicae*, NFb para *Azospirillum spp.* JMV para *Burkholderia*, LGI para *A. amazonense*.

Os frascos foram incubados a 30°C, por cinco dias, após esse período, foram considerados positivos para contagem aqueles que desenvolveram uma película aerotóxica típica próxima da superfície do meio. A contagem da população de bactérias diazotróficas foi realizada pela técnica do Número Mais Provável (NMP), utilizando a tabela de McCrady para três repetições por diluição (DÖBEREINER e outros 1995).

Os meios que formaram películas características foram repicados para novos meios semissólidos, até formação de nova película. Em seguida, foram riscadas em placas de Petri, em meios sólidos específicos e em meio sólido batata, incubadas em estufa a 30°C, por cinco dias, a fim de identificar a purificação dos isolados. Quando purificado, os isolados foram estocados em meio de cultura batata, adicionando ao meio de cultura óleo mineral estéril, e estocado para posteriores caracterizações.

### **3.4 Caracterização dos isolados oriundos de Vitória da Conquista - BA**

#### ***3.4.1 Caracterização morfológica***

A caracterização morfológica foi realizada após a purificação dos isolados. As colônias foram avaliadas após 7 dias de crescimento em meios sólidos específicos, e a distinção das colônias foi realizada a olho nu e com auxílio de uma lupa. Foram observadas características como tamanho, forma, borda, superfície, elevação, transparência e cromogênese (DÖBEREINER e outros 1995). Estirpes de *H.seropedicae* e *Azospirillum*, da coleção de culturas de bactérias diazotróficas da Embrapa Agrobiologia, foram utilizadas como

padrões de crescimento, sendo cultivadas e caracterizadas nas mesmas condições.

### ***3.4.2 Caracterização fisiológica***

#### ***3.4.2.1 Atividade da enzima nitrogenase***

A atividade da enzima nitrogenase dos isolados foram avaliadas pelo método de redução de acetileno descrito por Boddey e outros (1987). Colônias puras dos isolados foram cultivados em meio DYGS sob agitação constante por 24h. Aliquotas de 20 µl da suspensão bacteriana foi repicada para frascos de penicilina com capacidade de 10 mL contendo 5 mL de meio semissólido específico sem indicador.

Após a formação da película característica, os frascos foram vedados com rolhas de borracha perfurável do tipo subseal estéreis, em seguida, foi injetado 1 mL de gás acetileno e incubados por 30 min em estufa, a 30°C. Posteriormente, 0,5 mL da fase gasosa contida no frasco foi injetado em cromatógrafo de gás com ionização de chama, Perkin Elmer modelo F11, para determinar a concentração de etileno na amostra.

O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método descrito por Bradford (1976). Depois de realizada as leituras do ARA no cromatógrafo de gás, os meios de cultura semissólido, que continham as películas características, foram homogeneizados, alíquotas de 100 µl da mistura foram transferidos para eppendorfs com 100 µl de NaOH a 1M. A mistura foi mantida em temperatura ambiente por 30 min para lisar as células. Posteriormente, uma alíquota de 100 µl dessa mistura foi acrescida a 900 µl do reagente Bradford (Sigma), e incubada por 30 min a 37°C. Aliquotas de 200 µl foram distribuídas em placas de 96

poços. A leitura de absorvância foi realizada em leitor de microplaca Labsystem iems reades MF (Labsystem) no comprimento de onda de 595 nm.

A concentração de proteína foi estimada utilizando uma curva padrão, obtida a partir de quantidades conhecidas de albomina de soro bovino (0,25 a 1,5 µg de BSA). As amostras foram analisadas em triplicata.

#### **3.4.2.2 Produção de ácido indol-acético (AIA)**

A produção de AIA foi verificada através do método de microplaca, conforme Sarwar & Kremer (1995). Colônias puras dos isolados foram repicadas para meio DYGS, onde foram cultivadas a 30°C, por 24h. Posteriormente, alíquotas de 20 µl da cultura crescida foram transferidas para novos tubos e acrescido ao meio com 50 µl de L-triptofano, na concentração final de 200 µg.mL<sup>-1</sup>. Os tubos foram mantidos no escuro, sob agitação constante de 150 rpm, a 30°C, por 48 h. Alíquotas de 1 mL foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos.

Na etapa subsequente, 150 µl do sobrenadante foram distribuídos em placas de 96 poços, e adicionados 100 µl do reagente de Salkowski. As amostras foram incubadas no escuro, à temperatura ambiente, por 30 min, a leitura de absorvância foi realizada em comprimento de onda de 540 nm. A determinação da concentração dos compostos indólicos foi determinada utilizando uma curva de calibração preparada com diluições seriadas de padrões de AIA (0-50 µg.mL<sup>-1</sup>).

Para determinação da proteína, foram utilizadas as células centrifugadas, através das quais as mesmas foram ressuspensas com 1 mL de meio DYGS e homogeneizadas, alíquotas de 100 µl da suspensão foram adicionadas a 100 µl de NaOH, e mantidas por 30 min, à temperatura ambiente. Dessa mistura, foram retirados 100 µl e adicionado 900 µl de reagente de Bradford. O material foi incubado em estufa a 37°C, por 30 min. Em seguida, foi distribuído em placa de

96 poços e realizada leitura de absorvância no comprimento de onda de 595 nm (BRADFORD e outros, 1976).

#### ***3.4.2.3 Solubilização de fosfato***

A capacidade dos isolados em solubilizar fosfato inorgânico foi testada em placas de petri contendo meio de cultura NBRIP sólido (National Botanical Institute's Phosphate – Nautiyal e outros, 1999). Os isolados foram cultivados em meio DYGS líquido, por 24h, a 30°C. Foi utilizado o método *drop plate*, no qual alíquotas de 20 µl da cultura foram inoculadas na superfície de placas de petri e incubadas em estufa a 30°C. Foram utilizadas 3 alíquotas por placa e 3 repetições. O diâmetro do halo de solubilização foi observado após 8 e 15 dias de incubação.

### **3.5 Primeiro experimento a campo: inoculação com a bactéria diazotrófica ZAE94 de *H.seropedicae* (BR 11417) testada em condições edafoclimáticas de Vitória da Conquista - BA.**

O estudo foi conduzido na área experimental da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *Campus* de Vitória da Conquista – BA, conforme descrição da área experimental no item 3.1.

#### ***3.5.1 Delineamento experimental***

O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, com cinco repetições, em um esquema fatorial 2 x 4. Os tratamentos foram: ausência e presença de inoculação com a estirpe ZAE94 (BR 11417) e quatro doses nitrogenadas (0, 60, 100 e 140 kg N ha<sup>-1</sup>). O controle foi suplementado com 10 kg de N ha<sup>-1</sup>, na forma de sulfato de amônio.

O genótipo utilizado foi o mesmo descrito no item 3.2.2.

### ***3.5.2 Instalação e condução do experimento***

O experimento a campo foi instalado em 28/11/2011. O preparo do solo constou de uma aração e duas gradagens e, posteriormente, abertura dos sulcos com trator, de acordo com os espaçamentos das parcelas.

Cada parcela apresentava quatro linhas de cinco metros de comprimento com espaçamento entre linhas de 0,70 m e 2 m entre os blocos. A área útil da parcela constava das duas linhas centrais, com bordaduras de 1 m nas extremidades.

A semeadura foi realizada manualmente nos sulcos das parcelas, nas quais foram semeadas 40 sementes por linha, iniciando-se pelos tratamentos que não continham inoculação, para diminuir os riscos de contaminação. Os tratamentos com inoculação receberam 250 g de inoculante turfoso para 10 Kg de sementes de milho. O desbaste foi realizado vinte dias após o plantio, permanecendo 16 plantas por linha.

A adubação foi realizada de acordo com a recomendação da Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais (ALVAREZ & RIBEIRO, 1999), segundo a análise química do solo que apresentou os seguintes resultados: pH em água = 5,4; P = 31 mg dm<sup>-3</sup>; K = 0,41 Cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> M.O = 29 g dm<sup>-3</sup>. A adubação consistiu de 20 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e K<sub>2</sub>O, usando como fonte o superfosfato simples e cloreto de potássio, respectivamente, aplicados no sulco da semeadura de todos os tratamentos. A fonte de N utilizada foi sulfato de amônio aplicado (20%) na semeadura e (80%) em cobertura aos 20 e 69 dias após plantio. Aos 45 dias após o plantio, foi realizada uma adubação foliar com sulfato de zinco a 1%, neutralizado com cal hidratada a 0,5%.

Os tratos culturais e controle de pragas foram realizados de acordo com a necessidade da cultura. O estande foi regado cerca de quarenta minutos diariamente, por aspersão, devido às altas temperaturas e um prolongado período de seca, durante a condução do experimento.

### ***3.5.3 Coleta de dados, variáveis analisadas e análise estatística***

A coleta de dados foi realizada no fim do experimento, no qual as duas linhas centrais das parcelas foram colhidas manualmente, descartando-se 1 metro em cada extremidade. A colheita ocorreu no dia 03/04/2012, quando o milho apresentava em média 31% de umidade. As espigas foram levadas para estufa para secagem, onde permaneceram até atingirem umidade de 13%.

As variáveis analisadas foram: produtividade (massa dos grãos secos a 13% de umidade), altura de plantas, estande final, número de espigas por planta, comprimento da espiga, diâmetro do colmo, diâmetro de espigas, peso de 1000 grãos.

A análise estatística foi realizada conforme item 3.2.5.

### **3.6 Segundo experimento a campo: comparação dos novos isolados com a estirpe ZAE94 e inoculante comercial testado nas condições edafoclimáticas de Vitória da Conquista - BA.**

O estudo foi conduzido na área experimental da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *Campus* de Vitória da Conquista – BA, conforme descrição da área experimental no item 3.1.



### ***3.6.1 Delineamento experimental***

O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, com quatro repetições, num esquema fatorial 3x5. O primeiro fator consistiu nas doses nitrogenadas (0, 60 e 100 kg ha<sup>-1</sup>), na forma de sulfato de amônio; e o segundo fator a inoculação com: estirpe ZAE94 (BR 11417), dois isolados que apresentaram melhor eficiência quanto à produção de AIA e redução de acetileno (inoculante turfoso), inoculante comercial recomendado para Poaceae (inoculante líquido) e o controle. O genótipo utilizado foi o mesmo descrito no item 3.2.2

### ***3.6.2 Preparo do inoculante***

Os isolados que apresentaram maior eficiência quanto à produção de AIA e ARA foram selecionados e utilizados no preparo do inoculante à base de turfa. Colônias purificadas foram crescidas em meio DYGS a 150 rpm, por 24 horas, a 30°C. Na etapa subsequente, 15 mL da suspensão bacteriana foram adicionadas a sacos de polipropileno, que continham 35g de turfa, previamente preparadas. Para inoculação das sementes de milho, utilizou-se o veículo turfoso e líquido nas proporções descritas no tópico a seguir.

### ***3.6.3 Instalação e condução do experimento***

O experimento a campo foi implantado em 26/10/2012, na área experimental da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, em Vitória da Conquista – BA.

Quanto ao preparo do solo, detalhamento das parcelas, semeadura, tratamentos culturais e recurso hídrico, foram realizados conforme descrito no item 3.5.3.

Os tratamentos com inoculação à base de turfa receberam 250 g de inoculante para 10 Kg de sementes de milho. Para o tratamento com inoculante comercial (líquido), utilizou-se a dosagem recomendada pelo fabricante, 100 mL ha<sup>-1</sup>, com concentração 5 bilhões de bactérias/g ou mL.

A adubação foi realizada de acordo com a recomendação da Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais (ALVAREZ & RIBEIRO, 1999), segundo a análise química do solo, que apresentou os seguintes resultados: pH em água = 5,4; P = 43 mg dm<sup>-3</sup>; K = 0,54 Cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; M.O = 24 g dm<sup>-3</sup>.

A adubação consistiu de 28 e 24 kg.ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e K<sub>2</sub>O, respectivamente, usando como fonte o superfosfato simples e cloreto de potássio, aplicados no sulco da semeadura para todos os tratamentos. A fonte nitrogenada utilizada foi o sulfato de amônio parcelado em três vezes, sendo 20% na semeadura e 80% em cobertura, aos 25 e 70 dias após plantio. O desbaste foi realizado vinte dias após o plantio, permanecendo 18 plantas por linha.

#### ***3.6.4 Coleta de dados, variável analisada e análise estatística***

As coletas de dados foram realizadas ao fim do experimento, na qual as duas linhas centrais das parcelas foram colhidas manualmente, descartando-se 1 m em cada extremidade. A colheita ocorreu no dia 21/03/2013, quando o milho apresentava em média 27% de umidade. Posteriormente, as espigas foram levadas para estufa para secagem, onde permaneceram até atingirem umidade de 13%.

A variável analisada foi a produtividade (massa dos grãos secos a 13% umidade). A análise estatística foi realizada conforme item 3.2.5.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Experimento em casa de vegetação: inoculação e isolamento com bactéria diazotrófica

Os resultados obtidos no experimento conduzido em casa de vegetação demonstraram que a inoculação influenciou significativamente a maioria dos parâmetros avaliados, exceto para a altura de plantas (APÊNDICE A). A interação foi significativa para o N-Total, sendo que para essa variável houve ajuste quadrático de regressão.

Para a variável massa seca da parte aérea (MSPA), não foram observados efeitos significativos da adubação nitrogenada, apenas da inoculação. Esse fator promoveu aumento significativo de 14,33% no acúmulo de (MSPA), quando comparado ao tratamento não inoculado (TABELA 1).

Esses resultados corroboram com os obtidos por Quadros (2009), que observou incrementos de 19,71% na massa seca da parte aérea de plantas de milho, híbridos AS 1575 e SHS 5050, inoculadas com bactérias diazotróficas.

Ramos e outros (2010) verificaram que, 30 dias após o plantio, plantas de milho inoculadas com *Azospirillum lipoferum* (estirpe BR 11084) e adubadas com 30 kg de N apresentaram diferenças significativas na MSPA, quando comparadas ao tratamento controle. Viana (2012) também obteve maior acúmulo de massa seca em plantas de arroz, cultivar BRS Tropical, inoculadas com *H. seropedicae* ZAE94, suplementada com fertilizante nitrogenado.

Contudo, Reis Júnior e outros (2008) não observaram efeitos significativos da inoculação com *A. amazonense* para MSPA de plantas de

milho, embora resultados contrários tenham sido observados na massa seca das raízes.

**Tabela 1 - Massa seca da parte aérea de plantas de milho cultivadas em casa de vegetação na ausência e presença da inoculação de *H. seropedicae* (ZAE94) e diferentes doses de N. Vitória da Conquista - BA. Média de 5 repetições.**

TRATAMENTO	MSPA
	g.planta <sup>-1</sup>
Inoculado	13,48 A
Não inoculado	11,79 B

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Quanto ao percentual de nitrogênio (%N) presente na MSPA do híbrido de milho AG 1051, houve uma redução em função da inoculação com *H. seropedicae*, embora esse não diferisse dos controles nitrogenados. Diferenças significativas ocorreram entre os tratamentos que receberam dose correspondente a 100 kg N ha<sup>-1</sup>, no qual foram observados os maiores acúmulos de N% em função da adubação nitrogenada (TABELA 2).

Resultados diferentes foram obtidos por Sabino (2003), que verificou aumentos de até 34% do %N na parte aérea do cultivar de arroz IR42, quando inoculados com a estirpe ZAE94 e suplementados com 40 kg N.

Dotto e outros (2010) observaram que a inoculação com bactérias do gênero *Herbaspirillum* não promoveu aumentos no teor de N em plantas de milho.

Alves (2007), avaliando o efeito da inoculação com estirpes de *Herbaspirillum* spp., em híbrido de milho SHS 5050, constatou que houve

diferenças nos valores relativos da biomassa seca da parte aérea, oscilando de - 12,14 (BR 11177 e BR 11182) a 42,45 % (BR 11421).

**Tabela 2 - N percentual (%) na massa seca da parte aérea de plantas de milho, com presença e ausência de inoculação com *H. seropedicae* (BR 11417), cultivadas em casa de vegetação. Vitória da Conquista – BA. 2011. Média de 5 repetições.**

TRATAMENTOS	DOSES DE N			
	0	60	100	140
	-----%-----			
Inoculado	1,0 A	2,3 A	2,5 B	2,7 A
Não inoculado	1,3 A	2,4 A	3,1 A	2,7 A

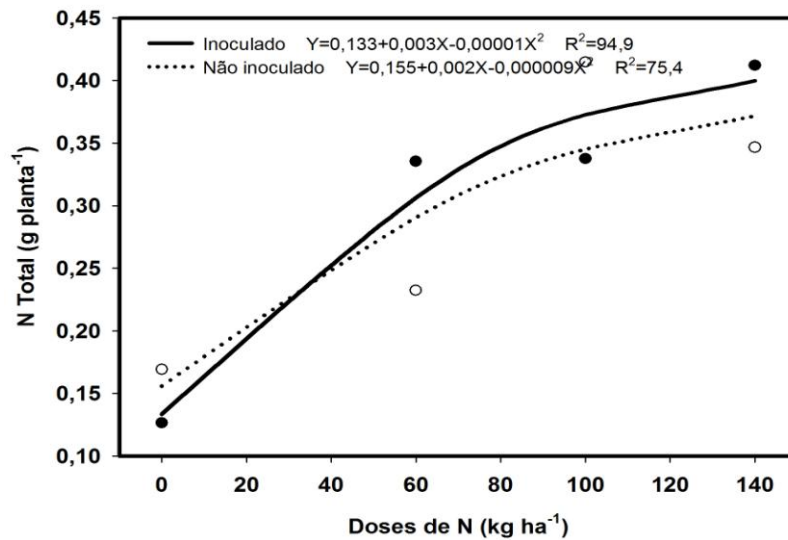
\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Quanto ao N-Total, a análise de variância demonstrou haver interação entre os fatores avaliados. A inoculação com ZAE94, associada à dose de 60 Kg de N, proporcionou aumento de 44,32% em relação ao controle não inoculado. Já os tratamentos suplementados com 100 e 140 Kg de N, embora diferindo estatisticamente, a inoculação não promoveu grandes aumentos no acúmulo de N no tecido das plantas (FIGURA 1). Esses resultados sugerem que os acúmulos observados no N-Total na parte aérea das plantas de milho ocorreram devido ao aumento da massa seca da parte aérea, que, por sua vez, ocorreu em função da inoculação com ZAE94.

Resultados semelhantes foram obtidos por Sabino (2003), nos quais a inoculação com ZAE94 com adição de 80 Kg de N ha<sup>-1</sup> promoveu aumentos significativos no acúmulo total de nitrogênio na parte aérea em relação ao tratamento controle.

Guimarães e outros (2003) também observaram que a inoculação com ZAE94 proporcionou aumentos de 86% no N-Total presente na parte aérea de plantas de arroz, entretanto, esses valores não foram significativos.

Ainda, Ferreira e outros (2010), trabalhando com a variedade de trigo BRS 296, inoculadas com a estirpe Sp245, acrescidas da dose de 40 Kg N ha<sup>-1</sup>, observaram diferença significativa no N-Total da parte aérea em relação ao controle sem inoculação, com aumento médio de 23,2%.



**Figura 1- Acúmulo total de nitrogênio na parte aérea de plantas de milho, com presença e ausência de inoculação (ZAE94) e diferentes doses de N. Vitória da Conquista - BA. 2011. Média de 5 repetições.**

Os resultados sugerem que as contribuições significativas observadas em função da inoculação nas variáveis estudadas, possivelmente foram proporcionadas pela ação das bactérias diazotróficas fixadoras de nitrogênio que

também possuem a capacidade de promover crescimento vegetal. Estes micro-organismos podem causar alterações morfológicas e fisiológicas na estrutura radicular, contribuindo para maior absorção de água e nutrientes.

Outro fator importante é a especificidade da bactéria diazotrófica utilizada, considerando que a mesma foi isolada colonizando endofiticamente as raízes de milho, sorgo e arroz (BALDANI e outros, 1986). Os estudos recentes vêm demonstrando que a espécie *H. seropedicae* tem proporcionado resultados significativos quando utilizada em algumas culturas agrícolas de importância comercial (BALDANI e outros, 2000; REIS e outros, 2005). Outro aspecto observado nessa espécie bacteriana é a capacidade de promover crescimento vegetal em Poaceas (BASTIAN e outros, 1998).

#### **4.2 Isolamento e contagem de bactérias diazotróficas**

O resultado final do isolamento e da contagem (NMP) detectaram variações na ocorrência de bactérias diazotróficas associadas aos tecidos das raízes e parte aérea das plantas de milho (testemunha absoluta). No meio JMV, não foi verificada ocorrência de bactérias diazotróficas (TABELA 3).

Foram obtidos 30 isolados, sendo que a maior população dessas bactérias foi encontrada nas raízes (80%) e (20%) foram oriundas da parte aérea (TABELA 3).

**Tabela 3 – Ocorrência de bactérias diazotróficas encontradas em plantas de milho cultivadas em casa de vegetação e quantificadas pela técnica do número mais provável (NMP).**

Híbrido	Origem	Amostras	Meios de Cultura			
			JNFB	NFB	LGI	JMV
			Nº Célula /g massa fresca			
AG 1051	Vitória da Conquista	Raiz	9,5x10 <sup>6</sup>	2,5x10 <sup>7</sup>	3,0x10 <sup>6</sup>	-
		Parte Aérea	2,5x10 <sup>6</sup>	4,5x10 <sup>6</sup>	2,0x10 <sup>6</sup>	-

Esses resultados corroboram com outros estudos que avaliaram a ocorrência de bactérias diazotróficas em culturas como milho (ROESCH e outros, 2007; GOMES e outros 2010), arroz (SABINO, 2003; VIANA, 2012) e cana-de-açúcar (PERIN, 2003; ANTONIO, 2010), nos quais constataram um maior número de bactérias diazotróficas presentes nas raízes de plantas, quando comparado à parte aérea.

O resultado encontrado neste trabalho pode ser explicado pelo fato da região radicular ser um ambiente rico em nutrientes, o que favorece a atividade e crescimento de microrganismos, que irão utilizar os compostos orgânicos liberados por exsudação e deposição das raízes, como fonte de energia e carbono (DOBBELAERE e outros 2003).

Os isolados encontrados no presente estudo foram obtidos a partir de meios de cultura semissólido semiespecífico, sendo 50% encontrados em meio JNFb e 50% em meio NFb (TABELA 4). Com base nesses meios semiespecíficos, e na caracterização morfológica, os isolados foram



considerados similares com representantes dos gêneros *Herbaspirillum* e *Azospirillum*, respectivamente.

Entretanto, para confirmação ao nível de gênero ou mesmo de espécie aos quais os representantes pertencem, é necessária a aplicação de técnicas moleculares, as quais não foram aplicadas no presente estudo.

**Tabela 4- Número de isolados de bactérias diazotróficas obtidos em meios de cultura JNBb, NFb e LGI isolados de plantas de milho.**

Meios de cultura		
JNBb	NFb	LGI
15	15	-

Após isolamento e contagem, todas as estirpes foram armazenadas e estocadas em meio de cultura batata, inclinados e acrescidos de óleo mineral estéril para posteriores caracterizações. Por ocasião da caracterização morfológica, nas condições testadas, não foi possível identificar nenhum isolado similar a *A. amazonense*, apesar do meio de cultura LGI ter apresentado ocorrência de bactérias diazotróficas tanto na raiz como em parte aérea (TABELA 3).

Possivelmente, os isolados não foram reativados devido à perda de viabilidade das bactérias, durante o período que ficaram em estoque, ou o meio de cultura, recomendado exclusivamente para o isolamento dessa espécie, não possibilitou a sua detecção, uma vez que os meios de cultivo são considerados semiespecíficos.

Sala e outros (2005), estudando a diversidade de bactérias diazotróficas em plantas de trigo, não conseguiram identificar os microrganismos em meio de

cultura LGI-P, indicado para isolar a espécie *G. diazotrophicus*, apesar do meio de cultura ter apresentado película característica.

### **4.3 Caracterização morfológica dos novos isolados**

Os 30 isolados foram diferenciados quanto as suas características morfológicas. Tal procedimento foi realizado em meios de cultura sólido específico para cada gênero (JNFb e NFb), e as avaliações morfológicas foram realizadas após 7 dias de incubação.

A caracterização morfológica revelou que os isolados apresentaram características similares às bactérias do gênero *Herbaspirillum* e *Azospirillum*. Padrões desses dois gêneros foram utilizados para comparações. Todos os 15 isolados obtidos dos meios JNFb apresentaram características similares ao gênero *Herbaspirillum*, com colônias pequenas em formato circular, com 2 mm de diâmetro aproximadamente, elevação convexa, borda inteira, superfície lisa e centro da colônia azul escuro. Já os 15 isolados similares aos gêneros *Azospirillum* diferiram em algumas características, quando comparada aos isolados similares de *Herbaspirillum*, com diferenças na elevação, superfície e configuração das colônias.

## 4.4 Caracterização fisiológica

### 4.4.1 Produção de hormônio de crescimento (ácido indol-acético - AIA)

A biossíntese de AIA faz parte do metabolismo de diversas espécies de bactérias associadas às plantas (PATTEN e GLICK 1996), possibilitando a esses microrganismos a capacidade de estimular e promover o crescimento vegetal.

Os resultados mostraram uma variabilidade entre os isolados produtores de AIA. Nas condições testadas, todos os isolados foram capazes de produzir esse composto em meio de cultivo suplementado com L - triptofano. A produção de compostos indólicos variou de 0,269 a 15,649  $\mu\text{g AIA mg proteína}^{-1}$  (TABELA 5). A variação na produção dos compostos indólicos, observadas entre os isolados, indica uma eficiência variável entre os representantes, quando em associação com plantas de milho.

Entre os isolados cultivados em meio de cultura JNFb, similares ao gênero *Herbaspirillum* spp., os valores na produção de AIA variaram entre 0,269 a 11,246  $\mu\text{g AIA mg proteína}^{-1}$ . O isolado que apresentou maior capacidade de produzir AIA foi o J09, proveniente de amostra de raiz de milho. O menor valor foi apresentado pelo isolado J03, proveniente também da raiz.

Os isolados que foram obtidos a partir do meio de cultura NFb, similares ao gênero *Azospirillum* spp., os valores variaram entre 1,234 a 15,649  $\mu\text{g AIA mg proteína}^{-1}$ . Nesse meio, o isolado que apresentou maior produção de AIA foi o N11, originário de amostra de raiz de milho. O menor valor foi apresentado pelo isolado N05, proveniente de parte aérea de milho.

Entre todos os isolados, apenas os representantes N11 e N13 foram estatisticamente iguais ao controle padrão de ZAE94, que obteve 15,786  $\mu\text{g AIA mg proteína}^{-1}$ .

Lum e Hirsch (2003) relatam que os exsudados liberados pelas raízes são fontes naturais de L - triptofano. Esses compostos favorecem o crescimento e a atividade microbiana, além disso, contribuem para a síntese de AIA na região da rizosfera.

De modo geral, todos os isolados testados foram capazes de produzir compostos indólicos, entretanto, observou-se que os isolados similares ao gênero *Azospirillum* spp apresentaram um melhor desempenho quanto à produção de AIA. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos por Radwan e outros (2004), que constataram que as estirpes de *Azospirillum* produzem mais compostos indólicos do que as estirpes de *Herbaspirillum*.

Pedrinho e outros (2010) observaram variações na produção de AIA por isolados de *Herbaspirillum*. Pedraza e outros (2004), avaliando a capacidade de cinco isolados de *Azospirillum* spp em produzir AIA, verificaram que os valores variaram 2,680 a 38,286  $\mu\text{g mg}^{-1}$  proteína, quando meio de cultura foi suplementado com L - triptofano. Avaliando a produção de AIA por bactérias diazotróficas isoladas de sorgo, Bermamaschi e outros (2006) observaram produção indólica variando de 0,70 a 10,70  $\mu\text{g AIA mg proteína}^{-1}$ .

**Tabela 5 - Redução de acetileno, produção de ácido indol-acético por isolados similares ao gênero *Herbaspirillum* e *Azospirillum* em condições *in vitro*.**

Isolados	Redução de acetileno nmol/h/mg de PTN	Produção de AIA µg/mg de ptn	Parte da planta	Meio de cultura
J1	0,8599 c	5,9120 d	Raiz	JNFb
J2	0,8894 c	6,5533 c	Raiz	JNFb
J3	Nd	0,2686 e	Raiz	JNFb
J4	0,8643 c	8,6676 c	P.aérea	JNFb
J5	0,7939 c	5,3703 d	Raiz	JNFb
J6	1,2948 c	5,8583 d	Raiz	JNFb
J7	0,8713 c	6,9230 c	Raiz	JNFb
J8	1,0889 c	9,7990 b	Raiz	JNFb
J9	0,7362 c	11,2463 b	Raiz	JNFb
J10	1,0767 c	6,4453 c	Raiz	JNFb
J11	0,9493 c	8,4286 c	Raiz	JNFb
J12	0,8922 c	5,8163 d	Raiz	JNFb
J13	0,7470 c	4,3853 d	Raiz	JNFb
J14	0,6195 c	4,9546 d	Raiz	JNFb
J15	0,7288 c	7,7493 c	Raiz	JNFb
N1	1,7084 c	5,3923 d	Raiz	NFb
N2	2,1438 b	5,5390 d	Raiz	NFb
N3	1,3153 c	6,5483 c	Raiz	NFb
N4	2,1017 b	2,9423 e	Raiz	NFb
N5	0,0428 c	1,2343 e	P.aérea	NFb
N6	Nd	1,9773 e	P.aérea	NFb

Continuação...				
N7	2,8579 b	7,0870 c	Raiz	NFb
N8	2,6939 b	6,7760 c	P.aérea	NFb
N9	2,7339 b	7,3426 c	P.aérea	NFb
N10	1,5782 c	4,5596 d	P.aérea	NFb
N11	Nd	15,6496 a	Raiz	NFb
N12	0,9145 c	11,7833 b	Raiz	NFb
N13	2,3515 b	14,2116 a	Raiz	NFb
N14	0,3577 c	9,5226 b	Raiz	NFb
N15	4,3543 a	3,6013 e	Raiz	NFb
SP245	0,6431 c	-	Padrão	NFb
ZAE94	-	15,7853 a	Padrão	JNFb

Valores seguidos de mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade.

Nd= não detectado.

#### **4.4.1 Atividade da enzima nitrogenase**

A atividade nitrogenase, responsável pela FBN, pode ser mensurada indiretamente pela técnica da redução de acetileno (ARA).

Dos 30 isolados utilizados para determinação da atividade da enzima nitrogenase, através da técnica da ARA, 28 formaram película característica em condições microaerófilas, sendo então selecionados para o procedimento. As análises de redução de acetileno realizadas em cromatógrafo de gás evidenciaram que os 28 isolados foram capazes de reduzir acetileno a etileno. A partir desses resultados, foi selecionado um isolado para ser testado em condições de campo.

A ARA detectada nos 28 representantes variou de 0,013 a 4,354 nmolC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/mg de proteína (TABELA 5). Entretanto, é sabido que nem sempre

as condições experimentais refletem as condições naturais, podendo superestimar ou subestimar os resultados.

Nas condições testadas, os resultados apresentaram uma pequena variabilidade entre os isolados cultivados em meio de cultura JNFb, os valores foram estatisticamente iguais e variaram entre 0,6196 a 1,2949 nmolC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/mg de proteína. Entre os novos isolados similares ao gênero *Herbaspirillum*, o que se destacou na produção de ARA foi o isolado J06, seguido do J08 e J10, ambos oriundos de amostra de raízes de milho.

Entre os isolados cultivados em meio de cultura NFb, verificou-se uma maior variabilidade entre os isolados, os valores variaram entre 0,013 a 4,354 nmolC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/mg de proteína. O isolado N15, originário de amostras de raízes de milho, foi estatisticamente superior aos demais representantes.

Na literatura, encontram-se resultados variáveis quanto à capacidade de reduzir acetileno em etileno entre estirpes de uma espécie. Rodrigues e outros (2006) observaram grande variação na detecção de ARA em bactérias do gênero *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, isoladas de plantas de arroz.

Viana (2012), avaliando isolados similares a *Herbaspirillum* quanto à capacidade de ARA, detectou valores com amplitude de 16,559 a 199,717 mmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h/ml de proteína.

Pedrinho (2009), estudando a capacidade de redução de acetileno de bactérias isoladas de plantas de milho, obteve valores de ARA entre 0,1 a 0,64 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> cultura<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, de bactérias dos gêneros *Pseudomonas sp*, *Herbaspirillum sp*, *Burkholderia sp* e *Sphingomonas sp*.

Como observado, na literatura é notada grande variabilidade na atividade da enzima nitrogenase pela técnica da ARA. Essa técnica possui uma metodologia muito simples e apresenta uma alta sensibilidade para detectar a atividade da nitrogenase, representando um forte indício da contribuição da FBN para os vegetais.

Entretanto, a maioria dos autores considera essa técnica como qualitativa, pois apenas determina se a nitrogenase está ou não fixando N<sub>2</sub> sem, contudo, quantificar a contribuição da FBN para as plantas, visto que esse fenômeno biológico apresenta oscilação durante o dia e no período de crescimento das plantas. Além disso, existe a possibilidade de ocorrer perturbações no sistema a ser testado, de modo que os resultados obtidos podem não representar a real contribuição da nitrogenase (RESENDE e outros 2003).

Desse modo, para a atividade de redução de acetileno, detectados no presente trabalho, atribuiu-se um caráter qualitativo, uma vez que a análise possibilitou detectar a atividade da enzima nitrogenase dos novos isolados quanto a sua capacidade de fixar ou não fixar nitrogênio.

#### ***4.4.3 Solubilização de fosfato***

O fósforo é um dos nutrientes mais limitantes do crescimento vegetal, e em solos tropicais a sua oferta é muito baixa. Diversos microrganismos endofíticos podem atuar de forma direta na promoção do crescimento vegetal, por meios de mecanismos como a solubilização de fosfato (VERMA e outros, 2001).

Todos os isolados obtidos foram avaliados quanto a sua capacidade de solubilizar fosfato *in vitro*. Os 30 isolados foram testados em meio de cultivo NBRIP, no qual se verificou que apenas um representante foi positivo para esse mecanismo de crescimento vegetal. Esse isolado foi o N11 extraído de raízes de plantas de milho.

A capacidade de solubilizar fosfato, realizada pelo isolado N11, foi evidenciada pela formação de halo transparente ao redor das colônias. Os halos foram medidos após 7 e 15 dias de incubação, quando as colônias apresentaram, em média, diâmetro de 14,5 e 14,95 mm, respectivamente. Os demais representantes nas condições testadas não apresentaram tal



capacidade. Pedrinho e outros (2010) obtiveram 58 isolados de raízes de milho, dos quais 27 apresentaram capacidade de solubilizar fosfato, os isolados apresentaram diâmetros entre 12 a 55 mm.

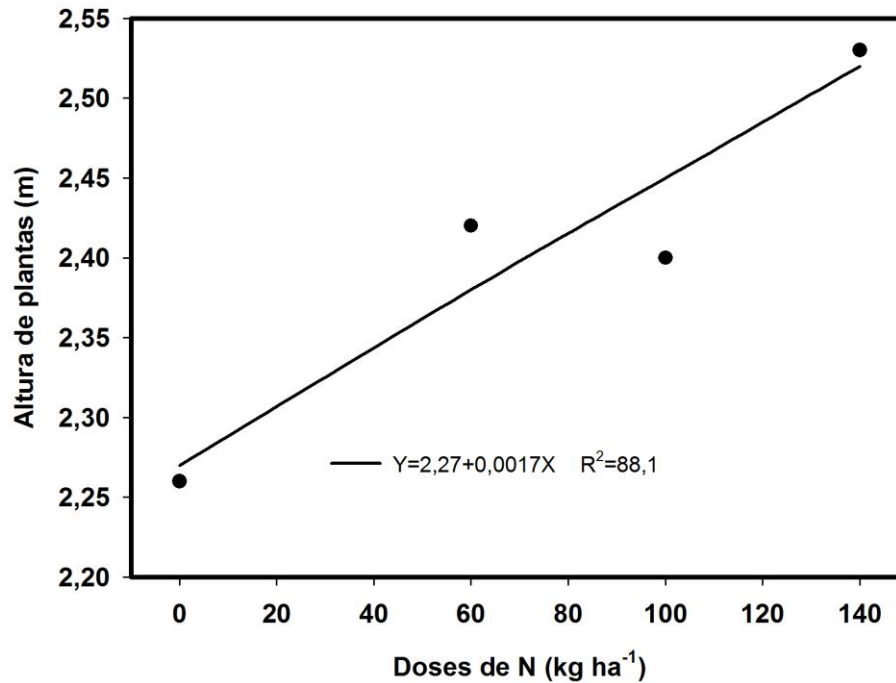
#### **4.5 Primeiro experimento de campo: inoculação com a bactéria diazotrófica ZAE94**

A análise de variância (APÊNDICE B) demonstrou haver diferentes respostas para os fatores: inoculação e doses nitrogenadas. Nas condições testadas, foram constatadas interações para os parâmetros agrônômicos: peso de mil grãos (P1000G), comprimento de espiga (CE) e produtividade (PROD). Para a altura de plantas (AP), a inoculação não teve efeito significativo, apenas a adubação nitrogenada. Quanto ao estande final (EF), diâmetro de espiga (DE) e número de espiga (NE), não houve diferenças significativas.

A altura das plantas não foi influenciada pela inoculação, apenas pelas doses de N. Nesse fator, houve ajuste linear com tendência de aumento na altura das plantas em função do aumento das doses de nitrogênio (FIGURA 2).

As plantas apresentaram altura média de 2,40 m, independente da presença ou ausência de inoculação e da dose de N empregada. Resultados similares foram obtidos por Cavallet e outros (2000), que constataram que a inoculação com produto comercial não influenciou na altura das plantas de milho.

Contudo, Ramos e outros (2010), estudando o efeito da inoculação em plantas de milho com bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum*, observaram que a inoculação, quando associada à adubação nitrogenada, promoveu aumentos significativos nessa variável.



**Figura 2 - Altura de plantas de milho em função de doses de nitrogênio, cultivado em Vitória da Conquista – BA.**

A análise de variância demonstrou haver interação entre os fatores na variável peso de 1000 grãos, comprimento da espiga e produtividade. Diferenças significativas, nessas variáveis, foram observadas entre os tratamentos suplementados com 60 kg de N ha<sup>-1</sup> e ocorreram em função da adubação nitrogenada. Nos demais tratamentos, exceto na produtividade com 140 Kg N, a inoculação proporcionou resultados estatisticamente iguais ao controle (FIGURA 3 – A; B; C).

Quando os tratamentos inoculados receberam dose equivalente a 140 kg de N ha<sup>-1</sup> no P1000G, embora não significativo, foram observados aumentos de 3% em relação ao controle adubado.

O peso de 1000 grãos observado no híbrido AG 1051 foi de 319,6 g, e as espigas apresentaram uma média de 19,18 cm de comprimento, média com presença e ausência de inoculação e diferentes doses de N.

Esses resultados corroboram com os obtidos por Dotto e outros (2010), que verificaram que a inoculação com bactérias diazotróficas do gênero *Herbaspirillum* não influenciou a massa de 1000 grãos. Esses autores verificaram que os híbridos AS 1570 e AS 1540 apresentaram médias de 345,2 e 393,4 g, respectivamente, em decorrência da aplicação de N.

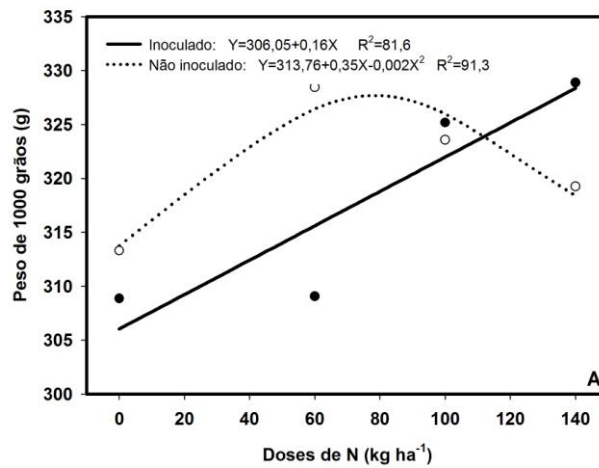
Mello (2012) observou peso médio de 309,0 g no híbrido AG 8025, média com presença e ausência de inoculação e diferentes doses de N. Sala e outros (2007) notaram incrementos 5,93% na massa de 1000 grãos, devido à presença da inoculação associada à adubação nitrogenada, na cultura do trigo.

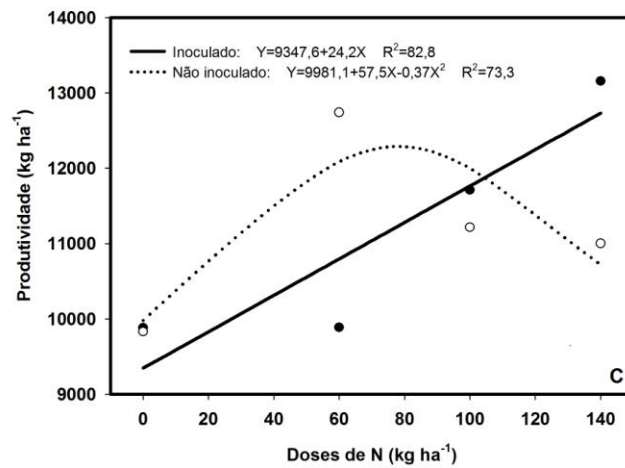
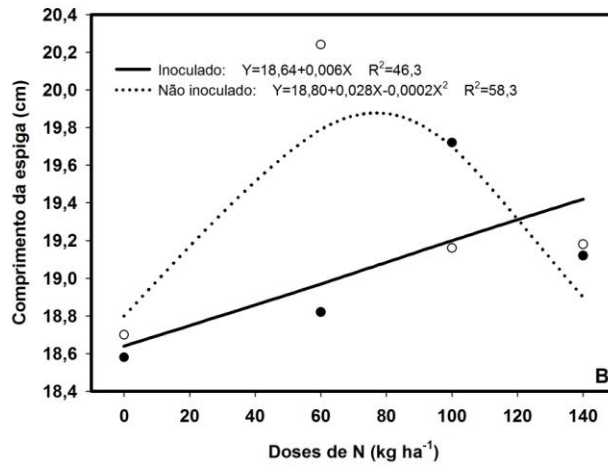
De modo similar, Mello (2012) verificou que o comprimento das espigas inoculadas com produto comercial foi em função da adubação nitrogenada, sendo que os híbridos DKB e AG 8025 apresentaram comprimento médio de 16,6 e 14,8 cm, respectivamente.

Avaliando a inoculação com produto comercial à base do gênero *Azospirillum* spp., Cavallet e outros (2000) observaram diferenças significativas no comprimento das espigas, quando utilizada a inoculação associada à adubação nitrogenada. O comprimento médio observado foi de 14,4 cm, resultado esse inferior ao observado no presente estudo.

O desdobramento da interação das doses dentro da inoculação revelou que, para o P1000G e produtividade, houve um ajuste linear nos tratamentos inoculados, com tendência de aumento em função das doses, onde a cultura atingiu a máxima produtividade de 11 Mg ha<sup>-1</sup> enquanto que para os tratamentos

não inoculados, o melhor ajuste foi o quadrático, com ponto máximo de 77 kg de N ha<sup>-1</sup>, na qual foi verificada a produtividade, 12 Mg ha<sup>-1</sup>. Para a variável comprimento da espiga, os modelos lineares e quadráticos não foram significativos para explicar os resultados obtidos (FIGURA 3 – A; B; C).





**Figura 3 - Análise de regressão para peso de 1000 grãos (A), comprimento da espiga (B) e produtividade (C) em função das doses de nitrogênio (0, 60, 100 e 140 Kg ha<sup>-1</sup>), com presença e ausência de inoculação com *H. seropedicae*, cultivado em Vitória da Conquista – BA, 2011/2012. Média de 5 repetições.**

Quanto à produtividade, diferenças significativas foram observadas entre os tratamentos suplementados com 60 Kg de N ha<sup>-1</sup> em função da adubação nitrogenada e 140 Kg de N ha<sup>-1</sup> em conjunto com a inoculação, e apresentaram incrementos de grãos de 28 e 19,5%, respectivamente, quando comparado ao controle, no entanto, esse último percentual é 8,5% inferior ao observado na metade da dose recomendada para cultura.

Esses resultados diferem dos obtidos por Zilli e outros (2007), que observaram que a inoculação com a estirpe ZAE94, associada a 80 Kg de N ha<sup>-1</sup>, promoveu aumentos 30,7% na produção de grãos de milho em relação ao controle.

Alves (2007), também avaliando em condições de campo a inoculação com a estirpe ZAE94 de *H.seropedicae* na variedade de milho BRS 106, não verificou resposta à inoculação.

Em condições de campo, Ferreira e outros (2003) verificaram que a inoculação com a estirpe ZAE94 proporcionou aumentos de 38% na produção de grãos de arroz na variedade IR42, quando comparado ao controle, e 18% na variedade IAC4440.

Segundo Coelho (2006), vários estudos, realizados em nível de campo, no Brasil, com a cultura do milho em diversas condições de solo, clima e diferentes sistemas de cultivo, têm revelado resposta generalizada dessa cultura à adubação nitrogenada. Esses autores relatam que esse efeito dos fertilizantes nitrogenados foi observado em 70 a 90% dos experimentos realizados.

As respostas a inoculação da bactéria diazotrófica ZAE94 observada neste primeiro experimento de campo, possivelmente foram influenciadas pela atividade das enzimas que atuam na assimilação do N. Pois, avaliando a atividade destas enzimas, Machado e outros (1998) acreditam que existe uma relação positiva entre as bactérias diazotróficas que tem a habilidade de fixar N atmosférico e a glutamina sintetase, uma vez que, essa esta é responsável pela

assimilação do íon amônio, que pode ser oriundo da FBN. Além disso, o  $\text{NH}_4^+$ , também pode ser proveniente da redução do  $\text{NO}_3^-$  que por ação da nitrato e nitrito redutase é convertido em amônio, posteriormente fixado via glutamina sintetase e glutamato sintase (GS/GOGAT), que serão substratos para produzir aminoácidos necessários à síntese de proteínas.

Segundo Okon e outros (1976) o íon amônio em elevadas concentrações podem inativar a GS. Por outro lado, Rudnick e outros (1997) também constataram que a atividade da enzima nitrogenase presente nas bactérias diazotróficas podem ser inibidas de forma rápida e reversível quando submetidas a altas concentrações de amônio.

Outro fator que também pode ter influenciado nos resultados obtidos é a interação genótipo x estirpe. Esta suposição pode ter fundamento, quando associada a resultado semelhante encontrado por Reis e outros (2000), os quais propuseram que, para se obter respostas positivas provenientes da FBN, é necessária a utilização de estirpes eficientes associados a genótipos, uma vez que a planta é o fator-chave para promover essa interação.

Além disso, Sabino (2003), avaliando a atividade da enzima nitrato redutase (ANR), nas cultivares de arroz IR42 e IAC4440, em função da inoculação com bactérias diazotróficas, verificou que a atividade dessa enzima foi diferenciada nas duas cultivares.

É relevante mencionar que os mecanismos envolvidos no processo de interação genótipo x bactéria, em Poaceae, ainda não foram totalmente compreendidos, e os resultados obtidos sugerem que, de alguma forma, a inoculação, embora não significativa, influenciou nos resultados dos parâmetros avaliados, visto que se observa um comportamento linear em todos os tratamentos inoculados em função das doses.

Além disso, fatores como manejo, época de plantio bem como as condições experimentais podem vir a influenciar na sobrevivência da população

microbiana presente no solo, influenciando nos resultados obtidos dos tratamentos inoculados (DOTTO e outros, 2010; GUIMARÃES e outros, 2011).

#### **4.6 Segundo experimento de campo: avaliação dos novos isolados de bactérias diazotróficas inoculadas na cultura do milho cultivado em Vitória da Conquista – BA, em contraste com a estirpe ZAE94 e inoculante comercial recomendado para a cultura do milho.**

A análise de variância (APÊNDICE C) demonstrou haver significância na interação entre os fatores inoculação e doses nitrogenadas.

Os resultados encontrados neste segundo experimento de campo foram contrários aos obtidos no primeiro experimento. A inoculação com as diferentes estirpes de bactérias diazotróficas influenciou de forma positiva na produção de grãos de milho nas condições experimentais testadas.

O desdobramento da interação evidenciou, embora não significativo, que a inoculação com estirpe ZAE94 sem adubação proporcionou aumentos na produtividade na ordem de 12%, 8,4% e 10,7%, comparado ao controle absoluto, isolado J10 e o produto comercial, respectivamente (TABELA 6).

Nos tratamentos acrescidos das doses de 60 Kg de N ha<sup>-1</sup> observa-se que o tratamento controle foi estatisticamente superior e igual aos isolados nativos e a ZAE94 e produto comercial, respectivamente.

Já a inoculação com ZAE94 associada com dose de 100 Kg de N ha<sup>-1</sup>, embora não significativo, promoveu incremento de grãos na ordem de 9,7 e 12,7%. De modo similar, Cavallet e outros (2000), avaliando a produtividade de grãos de milho com produto comercial à base de *Azospirillum* spp. observaram aumentos na produção de 17%, quando a inoculação foi associada à adubação nitrogenada com dose equivalente a 70 kg ha<sup>-1</sup>.

Estudando os efeitos da inoculação com *H. seropedicae*, estirpe BR 11417 com diferentes genótipos de milho e níveis de adubação, Alves (2007)



verificou que a inoculação com essa estirpe proporcionou aumentos de até 34% na produtividade dos grãos.

Hungria e outros (2010) constataram efeitos da inoculação com inoculante líquido à base de *A. brasilense*, cepas Ab-V5 e Ab-V6, associados a 80 e 50 Kg ha<sup>-1</sup> de N, e observaram aumentos na produção de 27% e 31% nas culturas de milho e trigo, respectivamente.

Guimarães e outros (2007), avaliando a produção de grãos de arroz na cultivar IR42, embora não significativo, obtiveram aumentos de 43% na produção, quando a inoculação foi realizada com a estirpe ZAE94.

**Tabela 6 – Produtividade da cultura do milho, com presença e ausência de inoculante à base de bactérias diazotróficas ZAE94, inoculante comercial, isolado J10, N13 e controle, cultivado em Vitória da Conquista – BA. Média de 4 repetições.**

TRATAMENTOS	DOSES DE N		
	0	60	100
-----Mg ha <sup>-1</sup> -----			
Controle	8056 A	11652 A	11790 A
ZAE94	9086 A	11083 A	12943 A
P.comercial	8105 A	11010 A	11480 A
Isolado N13	7862 A	9441 B	9511 B
Isolado J10	8319 A	8875 B	12529 A

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna, não diferem entre si, pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade.

A inoculação com o isolado J10, associado à dose de 100 Kg ha<sup>-1</sup> de N, embora estatisticamente igual ao controle e ao produto comercial, promoveu

acrécimo de 6,3 e 9,1% na produção de grãos em relação a esses tratamentos (TABELA 6).

De forma similar, Viana (2012), estudando os efeitos da inoculação com a estirpe ZAE94 e bactérias diazotróficas nativas isoladas de plantas de arroz, observou aumentos na produção de grãos de 28,7 e 7,6%, respectivamente.

Sala e outros (2007) observaram incrementos de até 20% na produção de grãos de trigo, quando a inoculação foi realizada com novos isolados de bactérias diazotróficas e associado a N fertilizante.

De modo geral, nas condições testadas, o híbrido AG 1051 respondeu de forma positiva à inoculação tanto com a estirpe ZAE94 quanto com o isolado J10. Em termos absolutos, o acréscimo observado sem adubação foi de 17 e 4 sacos  $ha^{-1}$ , respectivamente, e com adição de 100 kg de N foi de 19 e 12 sacos  $ha^{-1}$ , respectivamente, quando comparado ao controle.

Esses resultados sugerem que a estirpe ZAE94, oriunda de condições edafoclimáticas distintas, mostrou ser capaz de se adaptar às condições locais, de modo que seu desempenho superou os dois isolados bacterianos nativos. Entretanto, novas pesquisas devem continuar sendo realizadas em outras condições experimentais de cultivo, solo, níveis de adubação e cultivares utilizadas, em cada região.

Vale ressaltar que o presente estudo foi realizado numa área experimental de um Campus Universitário no qual o solo apresenta uma favorável fertilidade e teor de matéria orgânica, devido à intensa utilização das áreas experimentais, de modo que os mesmos apresentam níveis de fertilidade superiores aos solos da região. Em adição, as condições climáticas favoráveis durante a condução do experimento, o material genético, as bactérias nativas e o fator água, possivelmente, contribuíram para os resultados obtidos nos tratamentos controles absolutos.

## 5. CONCLUSÃO

- O isolamento permitiu a obtenção de 30 estirpes adaptadas às condições locais que colonizam plantas de milho similares aos gêneros *Herbaspirillum* e *Azospirillum*;
- A inoculação com a estirpe ZAE94 promoveu incrementos de até 44,32% em função de N aplicado, dependendo das condições experimentais;
- Os isolados N13, J10, N11 foram os isolados que apresentaram melhores desempenhos quanto à promoção de crescimento vegetal como produção de ácido indol-acético (auxina), habilidade em reduzir acetileno a etileno e solubilizar fosfato inorgânico em condições *in vitro*;
- A inoculação com a estirpe ZAE94 e o isolado nativo J10 mostraram-se promissores para serem utilizados como insumo biológico.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, G. C. **Efeito da Inoculação de Bactérias Diazotróficas dos Gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em Genótipos de Milho**. 2007. 53 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 2007.
- ALVAREZ V, V. H; RIBEIRO, A. C. Calagem. In: Comissão de fertilidade do solo do estado de minas gerais (CFSMG). **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais**. 5ª aproximação, Viçosa, 1999, p.41-60.
- AGROCERES. Sementes Agrocere. Milho híbrido AG1051. Disponível em: [http://www.sementesagrocere.com.br/?page\\_id=426](http://www.sementesagrocere.com.br/?page_id=426). Acessado em 20 jan 2013.
- AMADO, T. J. C; MIELNICZUK, J; AITA, C. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema plantio direto. **R. Bras. Ci. Solo**, V. 26: p.241-248, 2002.
- ANTONIO, C. S. **Ocorrência de bactérias endofíticas associadas a variedades de cana-de-açúcar cultivadas nos estados: Alagoas e Pernambuco**. 2010. 51f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ.
- ARRUDA, L. M. **Seleção e Caracterização de Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Milho Cultivadas no Rio Grande do Sul**. 2012. Dissertação (

Mestrado) Curso de Pós - Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

ARSHAD, M.; FRANKENBERGER JR., W. T. Microbial production of plant growth regulators. In: BLAINE, F.; METTING, J. R. (Ed.). **Soil Microbial Ecology**. New York: Marcel and Dekker, Inc., p. 307-347, 1993.

ARNON, I. **Mineral nutrition maize**. Bern: International Potash Institute, p. 452, 1975.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.

BALDANI, J. I.; REIS, V. R. S.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, V. L. D. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (org) **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. EDUCS, Caxias do Sul, 433p.; 2002.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**. Oxford, v. 29, n.5-6, p. 911-922, 1997.

BALBANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSÉN, E.; BALBANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; Inclusion of

[*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. Nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. . **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 46, n. 3, p. 802-810, 1996a.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a new root-associated nitrogen fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 36, p. 86-93, 1986.

BASTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v.24, n.1, p.7-11, 1998.

BODDEY, R. M. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. *CRC Critical Reviews in Plant Science*, Boca Raton, v. 6, p. 209-266, 1987.

BERGAMASCHI, H.; DALMAGO, G. A.; BERGONCI, J. I.; BIANCHI, C. A. M.; MÜLLER, A. G.; COMIRAN, F.; HECKLER, B. M. M. Distribuição hídrica no período crítico do milho e produção de grãos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 831-839, 2004.

BERGAMASCHI, L.; ROESCH, L. F. W.; QUADROS, P. D.; CAMARGO, F. A. O. Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de sorgo forrageiro. *Ciencia Rural*, Santa Maria, v.37, n.3, p.727-733, mai-jun, 2007.

BENT, E.; CHANWAY, C. P. Potential for misidentification of a spore – forming *Paenibacillus polymixa* isolate as an endophyte by using culture-based methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p.4650 – 4652, 2002.

BOCKMAN, O. C. Fertilizers and biological nitrogen fixation as sources of plant nutrients: perspectives for future agriculture. **Plant and Soil**, v.194, p. 11-14, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Normais climatológicas**. 1961-1990. Brasília: MA/SNI/INMET, 1992. 84 p.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1 –2, p. 248-254, 1976.

CAVALLET, L. E.; PESSOA, A. C. dos S.; HELMICH, J. J.; HELMICH, P. R.; OST, C. F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum spp.* **Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, PB; v.4, n.1, p.129-132, 2000.

CANTARELLA, H.; MARCELINO, R. Fontes alternativas de nitrogênio para a cultura do milho. In: FANCELLI, A.L. (ed). **Milho - Nutrição e Adubação**. Piracicaba, FEALQ, p. 36-55, 2008.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento. Levantamento da safra brasileira de grãos 2012/13 - Oitavo levantamento, maio 2013**. Brasília: Conab, 2013.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira:** grãos, décimo segundo levantamento, setembro 2012 / Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab, 2012.

CORDEIRO, L.A.M.; HOEK, J.B.V. D. Nitrogênio na cultura do milho sob sistema plantio direto. **Revista Factuciência**, v.13, p.27 -54, 2007.

COSTA, F. M. P da.; DOURADO NETO, D. FANCELLI, A.; BONNECARRERE, R. A. G.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Nitrogênio e produtividade de grãos de milho. In: FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. (Eds). **Milho: tecnologia e produção**. Piracicaba: ESALQ/USP/LVP, . p. 118-128; 2005.

COELHO, A. M. **Nutrição e adubação do milho**. Circular técnica, Embrapa milho e sorgo, nº 78, p. 10, 2006.

CONCEIÇÃO, P. M; VIEIRA, H. D; CANELLAS, L. P; OLIVARES, F. L; CONCEIÇÃO, P. S. Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p. 1880-1883, set, 2009.

CHENEBY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A.; HENAULT, C.; GERMON, J. C. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, **Amsterdam**, v. 34, p. 121-128, 2000.



DA ROS, C. O. Plantas de inverno para cobertura do solo e fornecimento de nitrogênio ao milho em plantio direto. Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, 1993. 85p. (Tese de Mestrado).

DEKHILL, S. B.; CAHILL, M.; STACKBRANDT, E. 1997. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology** 20: 72-77.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature reviews Microbiology**. v.2, p.621-631, 2004.

DING, L.; YOKOTA, A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 2223-2230, 2004.

DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. In: CARDOSO, E. J.B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 173-179.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Embrapa-SPI, Brasília, 1995.60 p.

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

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Crit Rev Plant Sci** V. 22; p. 107-149, 2003.

DOTTO, A. P.; LANA, M. C.; STEINER, F.; FRANDOLOSO, J. F. Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 5, n. 3, p. 376-382, 2010.

DOBRITSA, A. P.; REDDY, M. C. S.; SAMADPOUR, M.; 2010. Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *Putei* subsp. nov., comb. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 60: 1418-1426.

DUARTE, J. O.; , J. C.; GARCIA, J. C.; MATTOSO, M. J. Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de Produção, **ISSN 1679-012X** Versão Eletrônica - 6ª edição Set./2010. Disponível em:  
<[http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho\\_6\\_ed/economia.htm](http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/economia.htm)>  
acessado em 26/04/2011.

DUARTE, J. O.; MATTOSO, M. J.; GARCIA, J. C. **Importância Socioeconômica**. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/>>

milho/arvore/CONTAG01\_8\_168200511157.html>. Acesso em: 18 mai. de 2011.

EUCLYDES, R.F. 1983.Sistema de análises estatísticas e genéticas - SAEG. **Central de Processamento de Dados**. Viçosa, MG: UFV. 68p. (Manual do usuário).

ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. 2001. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 51: 17-26

FANCELLI, A. L.; LIMA, U. A. **Milho: produção, pré-processamento e transformação agroindustrial**. São Paulo: SICCI; PROMOCET; FEALQ, p.112; 1982.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba, RS: Agropecuária, 2000. 360 p.

FANCELLI, A. L. **Nutrição e adubação de milho**. Piracicaba: Departamento de Agricultura; ESALQ/USP, p.43; 2000.

FERREIRA, J. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 179-185, 2010.

FERREIRA, J. S.; SABINO, D. C. C.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. SELEÇÃO DE VEÍCULOS PARA O PREPARO DE INOCULANTE COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS PARA ARROZ INUNDADO. *Agronomia*, vol. 37, nº 2, p. 06 - 12, 2003

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 5.0. In: **45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria**. UFSCar, São Carlos, SP, 2003. p.255-258.

GOMES, M. L. de.; PERIN, L.; PEREIRA, G. M. D.; ZILLI, J. Z. **Bactérias diazotróficas endofíticas em cultivares de milho em áreas de cerrado e mata no estado de Roraima**. Boa Vista, RR: Embrapa Roraima, 2010. 35p. (Documentos / Embrapa Roraima, 43).

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal Microbiology**, v. 41, p. 109-117, 1995.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. **Revista Agronomia**, v. 37, n. 2, p. 25-30, 2003.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L.; JACOB-NETO, J. Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.42, n.3, p.393-398, mar. 2007

GOMES, M. L. de.; PERIN, L.; PEREIRA, G. M. D.; ZILLI, J. Z. **Bactérias diazotróficas endofíticas em cultivares de milho em áreas de cerrado e mata**

**no estado de Roraima.** Boa Vista, RR: Embrapa Roraima, (Documentos / Embrapa Roraima, 43) p.35; 2010.

HAYAT, R, ALI, A, AMARA, U, KHALID, R, AHMED, I.; Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: **a review.** **Ann Microbiol** v.60; p. 579-598; 2010.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja.** Embrapa Soja. Circular técnica: Londrina-PR, n. 35; p.48; 2001.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1-2, p. 413-425, 2010.

**IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/default.sht>. Acesso em 20 de maio de 2013.

JUNG, S. Y.; LEE, M. H.; OH, T. K.; YONN, J. H. 2007. *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. Nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2284-2288

KENNEDY I. R.; TCHAN, Y.T. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Recent advances. **Plant Soil**, v.141, p.93-118, 1992.

KENNEDY, I. R.; GERK-PEREG, L. L.; WOOD, C.; DEAKER, R. GILCHRIST, K.; KATUPITIYA, S. Biological nitrogen fixation in non-legumes field crops: facilitating the evolution of in effective association between *Azospirillum* and wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.194, p. 65-79, 1997.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKÉS, M. L. Nonsymbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 36, n.8, p. 1229-1244, 2004.

KHAMMAS, K.M., AGERON, E., GRIMONT, P.A.D., KAISER, P. *Azospirillum Irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research Microbiology**, n. 140, p. 679-693, 1989.

KWIATKOWSKI, A; CLEMENTE, E. Características do milho doce (*Zea mays* L.) Para industrialização. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. ISSN: 1981-3686/ v. 01, n. 02, 2009, p. 93-103.

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing a bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 157-168, 2001.

KUSS, A. V. **Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado**. 2006. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2006.

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

LIN, S. Y.; YOUNG, C. C.; HUPFER, H.; SIERING, C.; ARUN, A. B.; CHEN, W. M.; LAI, W. A.; SHEN, F. T.; REKHA, P. D.; YASSIN, A. F. 2009. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** **59**: 761-765

LAVRINENKO, K.; CHERNOUSOVA, E.; GRIDNEVA, E.; DUBININA, G.; AKIMOV, V.; KUEVER, J.; LYSENKO, A.; GRABOVICH, M. 2010. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** DOI: ijs.0.018853-0

LUSTER, J, GÖTTLEIN, A, NOWACK, B, SARRET, G.; Sampling, defining, characterizing and modeling the rhizosphere- the soil science tool box. **Plant Soil** 321: p. 457-482; 2009.

LUM, M.R.; HIRSCH, A.M. Rots and their symbiotic microbes: Strategies to obtain nitrogen and phosphorus in a nutrient limiting environment. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 21, n. 4, p. 368-382, 2003.

MACHADO, A. T.; SODEK, L.; DOBEREINER, J.; REIS, V. M. Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho nitroflint. **Pesq. agropec, bras.** Brasília, v.33, nó, p.961-970, jun. 1998.

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, n. 55, p. 417-430, 1983.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Editora Ceres; p. 631; 2006.

MELLO, de N. **INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense* NAS CULTURAS DE MILHO E TRIGO**. Rio Grande do Sul: Universidade de Passo Fundo, 2012. 98 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. 2007a. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 57: 620-624.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. 2007b. *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from corn rhizosphere soil of *Zea mays*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 57: 2805-2809.

MOREIRA, F. S. M.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras, Universidade Federal de Lavras. P.626; 2002.

MOREIRA, F. M. S.; DA SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; DE CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae** V. 1; P.74-99; 2010.



NORSE, D. (2003). Fertilizers and world food demand implications for environmental stresses. **In: IFA-FAO Agriculture Conference, Global Food Security and the Role of Sustainable Fertilization**. Disponível em <[http://www.fertilizer.org/ifa/publicat/PDF/2003\\_rome\\_norse.pdf](http://www.fertilizer.org/ifa/publicat/PDF/2003_rome_norse.pdf)>, acesso em Abril, 2013.

NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. **Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Vegetal, Nutrição Animal e Alimentos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, p.313; 2005.

NORMAN, M. J. T.; PEARSON, C. J.; SEARLE, P. G. E. **The ecology of tropical food crops** . 2. ed. Melbourne: Cambridge University Press, p. 430; 1995.

OKON, Y; ALBRECHT, S.L.; BURRIS, R. H. Carbon and ammonia metabolism of *Spirillum Lipoferum*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.128, p. 592-597, 1976.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, p.23–32, 2006.

PAES, M. C. D. Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grãos de Milho. - Embrapa Milho e Sorgo, **Circular Técnica: n° 75**, Sete Lagoas-MG, p.6; 2006.

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

PINOTTI, E. B; ALMEIDA, D; ARAÚJO, H. M; BARBOSA, R. Z. PETÍLIO, A. A. Características vegetativas de três cultivares de milho (*Zea mays* L.) sob quatro populações de plantas em espaçamento reduzido. **REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE AGRONOMIA** – ISSN: 1677-0293. Ano VII – Número 15 – Periódicos Semestral; Junho de 2009.

PIPERNO, D. R.; FLANNERY, K. V. The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: new accelerator mass spectrometry dates and their implications. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 2101-2103, 2001.

PEOPLES, M. B.; CRASWELL, E. T. Biological nitrogen fixation; investments, expectations and actual contributions to agriculture. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.141, n.1, p.13-39, 1992.

PEDRAZA, R. O.; RAMÍREZ-MATA, A.; XIQUI, M. L.; BACA, B. E. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, n. 233, p. 15 – 21, 2004.

PEDRINHO, E. A. N. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays*)**. 2009. 74 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal.

PEDRINHO, E. A. N.; GALDIANO JÚNIOR, R. F.; CAMPANHARO, J. C.; ALVES, L. M. C.; LEMOS, E.G. M. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 4, p. 905-911, 2010.

PERIN, L. **Ecologia e diversidade de isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* associados à cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)** 2003. 68 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica.

PENG, G.; WANG, H.; ZHANG, G.; HOU, W.; LIU, Y.; WANG, E. T.; TAN, Z. 2006. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses Grass. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 56: 1263-1267.

PERIN, A; SANTOS, R. H. S; URQUIAGA, S; GUERRA, J. G. M; CECON, P. R. Produção de fitomassa, acúmulo de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio por adubos verdes em cultivo isolado e consorciado. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.39, n.1, p.35-40, jan. 2004.

QUADROS, P. de D. **INOCULAÇÃO DE AZOSPIRILLUM SPP. EM SEMENTES DE GENÓTIPOS DE MILHO CULTIVADOS NO RIO GRANDE DO SUL**. Rio Grande do Sul: UFRRGS, 2009. 74 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo.

RAIJ, B. Van; Fertilidade do solo e adubação. Piracicaba: **Ceres/Potafos**, p. 343; 1991.

RAYMOND, J. SIEFERT, J. L.; STAPLES, C. R.; BLANKENSHIP, R. E.

The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 21, n. 3, p. 541-554, 2004.

REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S. Fixação Biológica de Nitrogênio – estado da arte. In: **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília, DF.; p. 368; 2005..

RESENDE, M.; ALBUQUERQUE, P. E. P de.; COUTO, L. Manejo de irrigação. In: RESENDE, M; ALBUQUERQUE, P. E. P; COUTO, L. (Coord.). **A cultura do milho irrigado**. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológicas, p. 266-301.; 2003.

RIGGS, P.J, CHELIUS, M.K, INIGUEZ, A.L, KAEPLER, S.M, TRIPPLET, EW Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Aust J Plant Physiol**; v. 28; p. 829-836; 2001.

ROESCH, L. F.; CAMARGO, F. O.; SELBACH, P. A.; SÁ, E. S. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v35, n.5, p.1201-1204, set-out, 2005.

ROESCH, L. F.; QUADROS, P. D. Q.; CAMARGO, F. A. O.; TRIPLETT, E. W. Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple field sites in southern Brazil. **World J Microbiol Biotechnol**: V. 23:1377–1383; 2007.

RODRIGUES, L. S.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e

Burkholderia na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 275-284, 2006.

ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I.; GATTINGER, A.; GRUNDMANN, S.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 1341-1348, 2006.

RADWAN, T. El-S. El-D.; MOHAMED, Z. K.; Reis, V. M. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **Symbiosis**, v.32, p.39- 54, 2002.

RADWAN, T. E. E.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39 n.10, p. 987- 994, 2004.

RESENDE, A. S de.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. **Técnicas utilizadas na quantificação da fixação biológica de nitrogênio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, (Embrapa Agrobiologia. Documento, 165) p. 26; 2003.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Paris, v.151, n.3, p. 167 – 177, 2000.

ROESCH, L. F. W.; PASSAGLIA, L. M. P.; BENTO, F. M.; TRIPLETT, E. W.; CAMARGO, F. A. O. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas

associadas a plantas de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 1367-1380, 2007.

RAMOS, A. S.; SANTOS, T. M. C.; SANTANA, T. M.; GUEDES, E. L. F.; MONTALDO, Y. C. Ação do *Azospirillum lipoferum* no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Verde**. V.5, n.4, p. 113-117. 2010.

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

REIS JUNIOR, F. B.; MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Brasília, v. 32, p. 1139-1146, 2008.

RUDNICK, P.; MELETZUS, D.; GREEN, A.; HE, L.; KENNEDY, C. Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 831 -841, 1997.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, v. 172, n. 2, p. 261 – 269, 1995.

SALA, V. M. R.; CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, J. G.; SILVEIRA, A. P. D. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em

condições de campo. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.42, n.6, p.833-842, jun.2007.

SORATTO, R. P.; PEREIRA, M.; COSTA, T. A. M.; LAMPERT, V. N. Fontes alternativas e doses de nitrogênio no milho safrinha em sucessão à soja. **Rev. Ciênc. Agron.** ISSN 1806-6690; vol.41, n.4, pp. 511-518; 2010.

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

SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. NITROGENIO. In Nutrição mineral de plantas. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, 2006, 432p.

STOLTZFUS, J. R.; SO, R.; MALARVITHI, P. P.; , J. K.; de BRUJIN, F. J. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. **Plant and Soil**. v.194, p.25-36, 1997.

SALA, V. M. R.; FREITAS, S. S.; DONZELI, V. P.; FREITAS, J. G.; GALLO, P. B.; SILVEIRA, A. P. D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 345-352, 2005.

SABINO, D. C. C. **Metabolismo de nitrogênio em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) em associação com bactérias diazotróficas endofíticas**. 2003. 75p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência do solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

SPRENT, J. I.; SPRENT, P. **Nitrogen fixing organisms**. London: Chapman and Hall, 2 ed., 1990, 256p.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TARRANT, J. J., KRIEG, N. R., DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum Lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum Lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum Brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, n. 24, p. 967-980, 1978.

TOLLENAAR, M.; DWYER, L. M. Physiology of maize. In: SMITH, D. L.; HAMEL, C.(Ed.). **Crop yield, physiology and processes**. Berlin: Springer-Verlag, cap. 5. p.169-201; 1999.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A.; IGUAL, J. M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 1979-1983, 2003.

VIANA, T. O. **Isolamento e inoculação de bactérias diazotróficas em arroz (*Oryza sativa* L.) cultivado em Vitória da Conquista - BA**. Vitória da Conquista - BA: UESB, (Dissertação – Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia) p. 97; 2012.



VERMA, S. C.; , J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water Rice. **Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 91, p. 127-141, 2001.

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

XIE, C.; YOKOTA, A.; 2005. *Azospirillum oryzae* sp. Nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the Rice plant *Oriza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 55: 1435-1438.

YOUNG, C.C.; HUPFER, H.; SIERING, C.; HO, M. J.; ARUN, A. B.; LAI, W. A.; REKHA, P. D.; SHEN, F. T.; HUNG, M. H.; CHEN, W. M.; YASSIN, A. F. 2008. *Azospirillum rugosum* sp. Nov., isolated from oil-contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 58: 959-963.

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C. ; ALVES, G. C. ; REIS, V. M. ; BALDANI, V. L. D. ; CORDEIRO, A. C. C. **Contribuição da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* para o rendimento de grãos de arroz e milho em Roraima.** - Embrapa Roraima, Boletim de Desenvolvimento e Pesquisa Boa Vista – RR.; V.06; p. 20; 2007.

## **APÊNDICES**

**Apêndice A** – Análise de variância da altura de plantas (AP), massa seca (MS), percentual de nitrogênio (%N), nitrogênio total (N-Total) com presença e ausência de inoculação com *H. seropedicae* (BR11417) estirpe ZAE94, cultivado em casa de vegetação em Vitória da Conquista – BA, 2011.

FV	AP	MS	%N	N-Total
	(cm)	(g)	(%)	(g planta <sup>-1</sup> )
	P>F			
Inoculação	0,1099	0,0241*	0,0355*	0,4336
Dose	0,0729	0,0538	0,000*	0,0000*
I x D	0,5965	0,1173	0,3256	0,0005*
CV%	20,86	17,88	16,62	16,39

**Apêndice B** – Análise de variância da altura de plantas (AP), diâmetro do colmo (DC), comprimento de espiga, peso de mil grãos (P1000G), número de espigas (NE), diâmetro de espiga (DE), estande final (EF) e produtividade (PROD) com presença e ausência de inoculação com *H. seropedicae* (BR11417) estirpe ZAE94, cultivado em Vitória da Conquista – BA, 2011/2012.

FV	AL	DC	CE	P1000G	NE	DE	EF	PROD
	(m)	(cm)	(cm)	(g)	(espiga ha <sup>-1</sup> )	(cm)	(planta ha <sup>-1</sup> )	(Kg ha <sup>-1</sup> )
P>F								
Inoculação	0,2981	0,8965	0,2829	0,3145	0,2310	0,1857	0,6202	0,9238
Dose	0,0100*	0,0519	0,0363*	0,0159*	0,0592	0,1791	0,3117	0,0035*
I x D	0,3197	0,4155	0,0287*	0,0177*	0,1850	0,4728	0,1577	0,011*
Bloco	0,0585	0,0303*	0,6687	0,5287	0,4629	0,9234	0,5621	0,1617
CV%	6,83	6,91	3,70	3,04	14,17	2,64	10,02	11,13

**Apêndice C** – Produtividade (PROD) com presença e ausência de inoculação com *H. seropedicae* (BR11417) estirpe ZAE94, Produto comercial, isolado J10 e N13 cultivado em Vitória da Conquista – BA, 2012/2013.

PROD		
FV	GL	P>F
Inoculação	4	0,0011
Dose	2	0,0000
I x D	8	0,0315
Bloco	3	0,8611
CV%		11,35

## **ANEXOS**

• **MEIO JNFB**

Ácido málico		5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10 %	6mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	sol. 10 %	18 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sol. 10 %	2mL
NaCl	sol. 10 %	1mL
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	sol. 10 %	2mL
Azul de bromotimol	sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH	2mL
FeEDTA	sol. 1,64%	4mL
KOH		4g
Extrato de levedura		20mg
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		2mL
Vitamina para meio de cultura		1mL

Ajustar o pH para 5,8 com solução de KOH a 1%.

Completar para 1000 ml com água destilada.

Adicionar 1,7 g l-1 de ágar para semissólido e 17 g l-1 para sólido.

• **MEIO NFB**

Ácido málico		5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10 %	5mL
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sol. 10 %	2mL
NaCl	sol. 10 %	1mL
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	sol. 10 %	2mL
Azul de bromotimol	sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH	2mL
FeEDTA	sol. 1,64%	4mL
KOH		4,5g
Extrato de levedura		50mg
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		2mL
Vitamina para meio de cultura		1mL

Ajustar o pH para 6,5 com solução de KOH a 1%.

Completar para 1000 ml com água destilada.

Adicionar 1,3 g l-1 de ágar para semissólido e 15g l-1 para

sólido.

- **MEIO BATATA**

Batata cozida		200g
Ácido málico		2,5
Açúcar		2,5
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		2MI
Vitamina para meio de cultura		1mL
Ajustar o pH para 6,8 – 7,0 com solução de KOH a 1%.		
Completar para 1000 ml com água destilada.		
Adicionar 1,84 g l <sup>-1</sup> de agar para semissólido e 15 g l <sup>-1</sup> de agar para sólido.		

- **DYGS**

Glicose		2 g
Ácido málico		2g
Peptona bacteriológica		1,5g
Extrato de levedura		2g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10 %	0,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sol. 10 %	0,5g
Ácido glutâmico		1,5g
Água destilada		1000mL
pH 6,0 para <i>Herbaspirillum</i>		
pH 6,8 para <i>Azospirillum</i>		



• **MEIO JMV**

Manitol		5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10 %	6mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	sol. 10 %	18mL
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sol. 10 %	2mL
NaCl	sol. 10 %	1mL
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	Sol. 1 %	2mL
Azul de bromotimol	sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH	2mL
FeEDTA	sol. 1,64%	4mL
Extrato de levedura		100mg
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		2mL
Vitamina para meio de cultura		1mL
Ajustar o pH para 5,0 – 5,4.		
Completar para 1000 ml com água destilada.		
Adicionar Agar.		

• **MEIO LGI**

Açúcar cristal		5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10 %	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	sol. 10 %	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sol. 10 %	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Sol.0,1%	2ml
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	Sol. 1 %	
Azul de bromotimol	sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH	
FeEDTA	sol. 1,64%	
Vitamina para meio de cultura		
Ajustar o p.H para 6,0 – 6,2 com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> sol. 5%;		
Completar para 1000 ml com água destilada.		
Adicionar Agar.		