



Potencial biotecnológico de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas no cultivo de milho e soja

Biotechnological potential of rhizobacteria plant promoting growth in corn and soybean

Raquel Jacheline Ratz¹

Soraya Moreno Palácio²

Fernando Rodolfo Espinoza-Quiñones³

Renata Côrrea Vicentino⁴

Henan José Michelim⁵

Laércio Miguel Richter⁶

Resumo: O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial biotecnológico de bactérias do gênero *Bacillus* no crescimento de soja e milho. Duas formulações foram testadas: inóculo 1, contendo *B. subtilis* e *B. licheniformes* e inóculo 2, *B. subtilis*, *B. licheniformes*, *B. amylolichefaciens* e *B. cereus*. Os experimentos foram realizados em casa de vegetação em vasos contendo 4,3 kg de solo do tipo Latossolo Vermelho Eutroférico. A adubação nitrogênio-potássio-fósforo foi realizada no solo onde a saturação por bases havia sido previamente corrigida pela adição de Carbonato de Cálcio. No cultivo do milho a inoculação foi feita nas sementes e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado do tipo (3x3) variando o tipo de inóculo e quantidade de nutrientes NPK. O experimento com a soja seguiu o delineamento (3x3x2) variando o tipo de inóculo, quantidade de NPK e tipo de inoculação (semente ou solo). Os experimentos foram realizados em triplicata. Dez sementes foram plantadas e após 15 dias foram determinados o percentual de germinação e realizados o desbaste, deixando três plantas por vaso que foram cultivadas por

¹ Unioeste – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

² Unioeste – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

³ Unioeste – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

⁴ Unioeste – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

⁵ Unioeste – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

⁶ Biotecnol – Soluções Ambientais LTDA

71 dias, mantendo a umidade em 60 % da capacidade de retenção de água do solo. Os resultados mostraram que as plantas de milho apresentaram maior massa seca de raiz, concentrações de P e K quando recebeu o inóculo 1 somente com a adubação NPK em concentração ideal para a cultura. Na soja, o inóculo 2 foi mais favorável à produção de massa seca da parte aérea, nº de vagens e sementes, independentemente do nível de adubação NPK recebido, quando as bactérias foram inoculadas no solo. Os resultados indicaram que as formulações utilizadas apresentaram potencial biotecnológico para incrementar o desenvolvimento e a nutrição das plantas de milho e soja.

Palavras-chave: microrganismos; *Bacillus*; inoculação.

Abstract: The aim of this study was to evaluate the biotechnological potential of bacteria of the genus *Bacillus* in soybeans and corn growing. Two formulations were used: inoculum 1, containing *B. subtilis* and *B. licheniformes* and inoculum 2, *B. subtilis*, *B. licheniformes*, *B. cereus* and *B. amylolichefaciens*. The experiments were conducted in a greenhouse in pots containing 4.3 kg of soil type Latossolo Vermelho Eutroférico. The NPK fertilization was carried out on the ground where the base saturation was previously corrected by the addition of calcium carbonate. Maize cultivation inoculation was made in the seeds and the experimental design was completely randomized type (3×3) by varying the type of inoculum, and amount of nitrogen-phosphorus-potassium nutrients. The experiment with soybeans followed the design (3×3×2) by varying the type of inoculum, amount of NPK and type of inoculation (seed or soil). The experiments were performed in triplicate. Ten seeds were planted and were determined after 15 days the germination percentage and thinning carried out, leaving three plants per pot, which were cultured for 71 days, keeping the amount of water in 60 % of the soil retention capacity. The results showed that the maize plants had higher dry matter root when he received the inoculum 1 and NPK fertilization in ideal concentration for culture and had a higher content of phosphorus and potassium in the shoots than the other treatments. In soybean cultivation, the inoculum 2 was more favorable to the dry matter yield of shoot, number of pods and seeds, regardless of NPK fertilization level received when the bacteria were inoculated in the soil. The results indicated that the formulations used have biotechnological potential to increase the development and plant nutrition corn and soybeans.

Keywords: microorganisms; *Bacillus*; inoculation.

1. Introdução

A demanda crescente pela produção de alimentos, como consequência do crescimento populacional, exige o desenvolvimento de novas tecnologias aplicadas à agricultura para tornar esta atividade cada vez mais produtiva. O modelo de produção agrícola atual privilegia o uso intensivo de insumos, como fertilizantes e agrotóxicos. O uso indiscriminado desses insumos pode causar danos à saúde e ao meio ambiente, aumentando a importância de se adotar técnicas e/ou práticas mais sustentáveis e que minimizem os impactos desta atividade (Mao *et al.*, 2012; Canellas *et al.*, 2015).

O uso de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) pode constituir uma alternativa biológica promissora para aumentar a produtividade das culturas (Coelho *et al.*, 2007; Marques *et al.*, 2010) e reduzir as entradas de fertilizantes em agroecossistemas (Schroth e Hancock, 1982; Lavie e Stotzky, 1986; Adesemoye e Kloepper, 2009). As RPCPs constituem um grupo heterogêneo de bactérias que podem ser encontrados na rizosfera, em superfícies radiculares e em associação com raízes (Ahmad *et al.*, 2008). Entre os gêneros mais estudados destacam-se: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Serratia*, e *Azotobacter* (Zaady *et al.*, 1993; Rodríguez e Fraga, 1999; Araujo, 2008).

Existem relatos da promoção de crescimento por rizobactérias em várias culturas, tais como: soja (Araujo e Hungria, 1999), milho (Babalola *et al.*, 2003; Gholami *et al.*, 2009), trigo (Luz, 2001), feijão (Silveira *et al.*, 1995), arroz (Beneduzi *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2008), tomate (Freitas e Pizzinatto, 1991; Bernabeu *et al.*, 2015;) e alface (Gomes *et al.*, 2003; Chamangasht *et al.*, 2012). Nos casos citados, a promoção do crescimento está ligada a fatores como a maior produção de grãos, maior germinação em casa de cultivo e no campo, melhor absorção dos nutrientes, aumento tanto no peso seco quanto na altura dos cultivares dentre outros.

As RPCPs quando aplicadas ao solo, em formulações simples ou misturas de inoculantes, podem causar diferentes efeitos no desenvolvimento das plantas, tais como, aumentar a germinação das sementes, a emergência das plântulas e beneficiarem o crescimento das mesmas (Lazzaretti e Bettiol, 1997). O crescimento vegetal pode ser promovido através de várias formas, dentre elas, fixação biológica de nitrogênio, síntese de hormônios e outras moléculas, controle biológico de patógenos e pela solubilização de nutrientes com consequente aumento da oferta de fósforo biodisponível e outros oligoelementos para absorção pelas plantas (Glick, 1995; Vessey, 2003; Adesemoye *et al.*, 2010; Hungria *et al.*, 2010; Canellas *et al.*, 2015).

Bactérias do gênero *Bacillus* incluídas entre as RPCPs são reportadas como bactérias significantes na solubilização de fofato (Tank e Saraf, 2003; Yasmin *et al.*, 2004; Canbolat *et al.*, 2006; Wani *et al.*, 2007); Bhattacharyya e Jha, 2012), produção de ácido indol-acético (Tank

e Saraf, 2003; Yasmin *et al.*, 2004; Tsavkelova *et al.*, 2005; Joseph *et al.*, 2007; Wani *et al.*, 2007), produção de amônia (Joseph *et al.*, 2007; Wani e Khan, 2010), atividade antifúngica (Cazorla *et al.*, 2007), produção de sideróforos (Wani *et al.*, 2007) e de antibióticos (Freitas e Pizzinatto, 1997). Além destas características as bactérias do gênero *Bacillus* apresentam outras características favoráveis à produção de inoculantes comerciais, tais como a produção de endosporos, a facilidade de manuseio e de aplicação podendo ser misturados com outros defensivos agrícolas (Freitas e Vildoso 2004).

Nesse sentido, sugere-se que a inoculação de consórcios de RPCPs possa contribuir para a obtenção de um nível de nutrição adequado ao desenvolvimento do milho e da soja com menor uso de fertilizantes NPK e reduzir os impactos destes no meio ambiente. Desta forma, o presente estudo teve como objetivos, avaliar o efeito da inoculação de consórcio de bactérias do gênero *Bacillus* no desenvolvimento de milho e soja cultivados em casa de vegetação, quando associada à aplicação de adubação *NPK* em diferentes concentrações, visando sua redução e nos experimentos com soja testar a influência do local de inoculação dos microrganismos.

2. Material e Métodos

Nos experimentos com milho e soja foram usados dois inóculos contendo diferentes espécies de bactérias do gênero *Bacillus*. O inóculo 1 é uma mistura de bactérias das espécies *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformes* em quantidades iguais totalizando $1,25 \times 10^9$ UFC (unidade formadora de colônia), por grama de inóculo. O inóculo 2 é uma mistura em quantidades iguais das espécies *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformes*, *Bacillus amylolichefaciens* e *Bacillus cereus*, totalizando $1,25 \times 10^9$ UFC.

O solo usado no cultivo das plantas (Latossolo vermelho eutrófico) foi coletado na camada entre 0-20 cm de profundidade, seco em temperatura ambiente, peneirado em malha de 2 mm e armazenado em recipientes plásticos. Uma amostra foi submetida à análise das propriedades químicas e granulométricas. As análises granulométricas foram realizadas pelo método da pipeta (EMBRAPA, 2011). O pH foi determinado em água (1:2,5; solo:água) após agitação de 1 h. Os cátions trocáveis Al^{3+} , Ca^{2+} e Mg^{2+} foram determinados no extrato obtido com $\text{KCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$ (1:10; solo:solução) após agitação de 10 minutos. A extração do P e K foi feita com o extrator Mehlich-1 ($\text{HCl } 0,05 \text{ mol L}^{-1} + \text{H}_2\text{SO}_4 0,0125 \text{ mol L}^{-1}$) em uma proporção 1:10 (solo:extrator) agitando por 10 min. O Al^{3+} foi determinado por titulação com solução padronizada de $\text{NaOH } 0,015 \text{ mol L}^{-1}$, usando o azul de bromotimol como indicador. As concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+} foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica, o K por fotometria de chama e o P por colorimetria, usando o método do complexo fosfomolibdico e ácido ascórbico como agente redutor. O carbono foi determinado pela oxidação

com dicromato de potássio. As características químicas e texturais do solo são mostradas na Tabela 1

Tabela 1: Características químicas e texturais do solo (Latossolo Vermelho Eutroférico).

Parâmetro	Unidade	Valor obtido
pH	-	5,3
H + Al	cmol _c dm ⁻³	8,7
Al	cmol _c dm ⁻³	1,17
Ca	cmol _c dm ⁻³	3,17
Mg	cmol _c dm ⁻³	0,19
C	g kg ⁻¹	6,57
P	mg dm ⁻³	0,11
K	cmol _c dm ⁻³	0,02
SB	cmol _c dm ⁻³	3,38
CTC	cmol _c dm ⁻³	12,08
V	%	28
Areia	g kg ⁻¹	96
Silte	g kg ⁻¹	400
Argila	g kg ⁻¹	504
CRA	%	36

P, K⁺: extraídos pelo método do extrator Mehlich-1; Al³⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺: extraídos pelo método do extrator KCl 1 mol L⁻¹; MO: matéria orgânica, por oxidação com solução de dicromato de potássio, método titrimétrico de Walkley-Black; H+Al: acidez potencial pelo método do acetato de cálcio e titrimetria com fenolftaleína; SB: soma de bases; CTC: capacidade de troca catiônica; V: saturação por bases. SB = soma de bases (K + Ca + Mg); CTC = capacidade de troca de cátions (SB +H + Al); V = saturação de bases (SB x 100/CTC); CRA = capacidade de retenção de água; Areia, silte, argila: método da pipeta.

O solo apresentou concentração de alumínio de 1,17 Cmol_c dm⁻³ que confere uma acidez nociva ao desenvolvimento das plantas e deve ser corrigida pela aplicação de calcário. A adição de calcário promove a elevação da saturação por bases (V) que deve atingir o valor ideal para a cultura desejada. O solo apresentou um V de 33 % que caracteriza um solo com baixa fertilidade (solo distrófico). Para as culturas de milho e soja o valor de V deve ser de 70 % que foi alcançado pela aplicação de CaCO₃ ao solo.

O solo, após receber o CaCO₃, foi mantido por uma semana com uma umidade de 60 % da capacidade de retenção de água, utilizando água destilada. Durante este período avaliou-se a perda de água por evaporação e fez-se a reposição caso necessário.

2.1 Avaliação do efeito dos inóculos e da adubação NPK na germinação e crescimento do milho

O experimento com milho foi realizado para avaliar os efeitos dos inóculos e da adubação NPK na germinação, crescimento das plantas e nutrição. Nestes experimentos a adubação NPK foi realizada diretamente no solo antes do plantio e os inóculos foram aplicados nas sementes.

As sementes de milho (UNOESTE 101) foram umedecidas com solução adesiva à base de maltodextrina 10 %, na proporção de 1 mL/kg de sementes e colocadas em contato com os inóculos 1 e 2 seguindo a proporção de 500 g de inóculo para 25 kg de sementes.

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação, onde foram dispostos os vasos contendo o solo (4,3 kg) com a saturação por bases corrigida. O solo recebeu adubação NPK de acordo com os níveis estabelecidos no delineamento experimental.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3x3 (inóculo x adubação NPK), com três repetições. Os níveis do fator inóculo foram: SI = sem inóculo, I-1 = inóculo 1 e I-2 = inóculo 2, para a adubação NPK os níveis foram: NPK₁₀₀ = concentração ideal para a cultura estudada, em percentagem, NPK₅₀ = adubação com 50 % da concentração ideal e NPK₀ = sem adubação NPK. Os tratamentos denominados T1M, T2M e T3M não receberam inóculo (SI) e receberam respectivamente, NPK₁₀₀, NPK₅₀ e NPK₀. O inóculo 1 foi aplicado em T4M, T5M e T6M com adubação de NPK₁₀₀, NPK₅₀ e NPK₀, respectivamente. T7M, T8M e T9M receberam NPK₁₀₀, NPK₅₀ e NPK₀, respectivamente e o inóculo 2.

A adubação NPK foi realizada usando os fertilizantes comerciais sulfato de amônio (21 % de N), superfosfato triplo ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 41 % de P_2O_5) e cloreto de potássio (60 % de K), respeitando a necessidade da cultura para nitrogênio (30 kg/ha de N), fósforo (90 kg/ha de P_2O_5) e potássio (70 kg/ha de K_2O), sendo esta, considerada a dose ideal, isto é, NPK₁₀₀. Os fertilizantes foram triturados em almofariz de porcelana antes da incorporação e homogeneização no solo.

Em cada vaso, contendo o solo preparado, foram semeadas 10 sementes. Após 15 dias do plantio foi avaliado o número de plantas emergidas e realizado o desbaste mantendo-se três plantas por vaso. As plantas foram mantidas por 70 dias. A reposição de água foi realizada durante todo o experimento mantendo a umidade em 60 % da capacidade de retenção do solo. Após esse período foi medido a altura da parte aérea e as plantas foram cuidadosamente arrancadas. As raízes foram separadas da parte aérea e lavadas em água destilada para a retirada do solo. Tanto as raízes quanto a parte aérea foram secas em estufa de secagem com circulação forçada de ar na temperatura de 60 °C, até peso constante, para determinação da matéria seca.

A parte aérea foi moída e submetida à análise foliar usando a técnica de Fluorescência de Raios-X por reflexão Total (TXRF). As amostras foram moídas em almofariz de ágata até atingirem um diâmetro de partícula de 50 µm. Foram pesados 50 mg de amostra e adicionados 5 µL de solução padrão de Gálio (1000 mg L^{-1}), resultando em uma concentração de padrão interno de 5 mg kg^{-1} . A esta mistura foram adicionados 2,5 mL de Triton TM X-100 (Sigma-Aldrich) a 1 %. Após a homogeneização, foram pipetados 5 µL em um disco de quartzo previamente preparado. Os discos foram secos em capela de fluxo laminar e irradiados em Espectromômetro de Fluorescência de Raios X por 600s sob reflexão total por um feixe de raios X

de 20 keV, proveniente da fonte radioativa de molibdênio. O sinal analítico foi detectado em um detector semi-condutor gerando um espectro SR-TXRF. As intensidades dos picos das linhas K, L e M elementares foram transformadas em concentrações (mg kg^{-1}) usando o software fornecido pelo fabricante do equipamento.

2.2. Avaliação do efeito dos inóculos, local de inoculação e da adubação NPK na germinação e crescimento da soja

Na soja foram estudados os efeitos da adubação NPK associada à inoculação de bactérias nas sementes e diretamente no solo.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3x3x2 (inóculo x adubação NPK x local do inóculo), com três repetições. Os níveis do fator inóculo foram: sem inóculo (SI), inóculo 1 (I-1) e inóculo 2 (I-2), para a adubação NPK os níveis foram: concentração ideal para a cultura estudada, em percentagem (NPK_{100}), adubação com 50 % da concentração ideal para a cultura estudada (NPK_{50}) e sem adubação NPK (NPK_0), para o local do inóculo foram: semente e solo.

As sementes de soja (BRS 185) foram inoculadas como descrito na inoculação das sementes de milho. Na inoculação no solo os inóculos 1 e 2 foram adicionados diretamente no solo na proporção de 1 g de inóculo por kg de solo. Cada vaso recebeu 4,3g de inóculo que foram distribuídos e misturados uniformemente. Os tratamentos realizados foram: T1S, T2S e T3S com adubação NPK_{100} , NPK_{50} e NPK_0 , respectivamente, sem inóculo; T4S, T5S e T6S, inóculo 1 na semente e adubação NPK_{100} , NPK_{50} e NPK_0 , respectivamente; T7S, T8S e T9S, inóculo 2 na semente e adubação NPK_{100} , NPK_{50} e NPK_0 , respectivamente; T10S, T11S e T12S, inóculo 1 no solo e adubação NPK_{100} , NPK_{50} e NPK_0 , respectivamente; T13S, T14S e T15S, inóculo 2 no solo e adubação NPK_{100} , NPK_{50} e NPK_0 , respectivamente.

Foram semeadas 10 sementes por vaso e após 15 dias do plantio foi avaliado o número de plantas emergidas e deixado 3 plantas por vaso por 70 dias mantendo a umidade em 60 % da capacidade de retenção do solo. Após este período foram avaliados os parâmetros: altura da planta (cm planta^{-1}), massa seca da parte aérea da planta (g planta^{-1}), o nº de vagens e o nº de sementes por planta.

2.3. Análise estatística

Para analisar os resultados obtidos nos experimentos com o milho e soja foram realizadas análises de variância (ANOVA) pelo teste F e as comparações de médias pelo teste de Tukey com 95 % de confiança, sendo significativo um p-valor $< 0,05$, para verificar a melhor

dosagem de adubação, local de aplicação do inóculo e o inóculo mais eficaz nos parâmetros de germinação, altura da planta, matéria seca da parte aérea e matéria seca das plantas de milho e de soja, nº de vagens e sementes da soja, utilizando o programa estatístico SISVAR versão 5.3 (Ferreira, 2011).

3. Resultados e Discussão

3.1. Avaliação do efeito dos inóculos e da adubação npk na germinação e crescimento do milho

A análise de variância realizada para o experimento bifatorial, não será mostrada, pois os resultados de germinação, altura e matéria seca da parte aérea e da raiz das plantas de milho não mostrou interação estatística entre os fatores inóculo e adubação NPK a um nível de confiança de 95 % (p-valor >0,05).

O teste de comparação de médias (Tukey) mostrou que não houve efeito significativo dos inóculos 1 e 2 à nível de 5 % de probabilidade no percentual de germinação, bem como na altura e na quantidade de matéria seca da parte aérea das plantas (Tabela 2). A adubação NPK também não produziu efeito na germinação e crescimento do milho. O estudo realizado por Freitas e Vildoso (2004) avaliando a inoculação de treze diferentes isolados de bactérias do gênero *Bacillus* em plantas de limoeiro mostrou que estes não produziram efeitos benéficos na altura média e na matéria seca da parte aérea das plantas e somente um dos isolados proporcionou um aumento da matéria seca da raiz. Estudo em casa de vegetação realizado por Araujo (2008) no qual foi realizada a inoculação de *Bacillus subtilis*, em sementes de milho associada à adição ou não de farinha de ostras, não mostrou efeito positivo na germinação, porém, foi observado efeito benéfico nos parâmetros relacionados ao desenvolvimento das plantas (matéria seca da parte aérea e raízes) e sua nutrição (N, P, K, Ca, Mg e S) quando inoculadas na presença da farinha de ostras ou não.

Tabela 2: Valores médios do percentual de germinação, altura da planta, matéria seca da parte aérea e matéria seca da raiz de milho, resultante da inoculação de sementes.

Ensaio	Inóculo	Adubação NPK (%)	Germinação (%)*	Altura da planta (cm/planta)*	Matéria seca da parte aérea (g/planta)*	Matéria seca da raiz (g/planta)*
T1M	SI	NPK ₁₀₀	97a	126a	7,46a	0,034ab
T2M	SI	NPK ₅₀	90a	131a	8,27a	0,029ab
T3M	SI	NPK ₀	83a	129a	8,06a	0,023ab
T4M	I-1	NPK ₁₀₀	80a	134a	9,69a	0,048a
T5M	I-1	NPK ₅₀	87a	125a	9,50a	0,036ab
T6M	I-1	NPK ₀	83a	129a	9,93a	0,024ab
T7M	I-2	NPK ₁₀₀	73a	132a	8,79a	0,044ab
T8M	I-2	NPK ₅₀	77a	134a	8,59a	0,035ab
T9M	I-2	NPK ₀	90a	137a	9,99a	0,028ab

SI = sem inóculo; I-2 = inóculo 1 e I-2 = inóculo 2. *Médias seguidas da mesma letra, na coluna, diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5 %.

No presente trabalho a matéria seca da raiz apresentou diferença estatística entre os tratamentos. O tratamento que recebeu o inóculo 1 e adubação NPK₁₀₀ foi estatisticamente superior aos demais, sendo que os outros tratamentos não diferiram entre si, corroborando com os resultados obtidos por Freitas e Vildoso (2004) e Araujo (2008). Os resultados obtidos por Lima et al. (2011), em estudo realizado no campo com inoculação de sementes de milho com *Bacillus subtilis* e plantadas em solo que recebeu adubação NPK, também não mostraram efeitos benéficos da inoculação e da adubação NPK na altura das plantas quando comparadas com a testemunha. A inoculação de *Bacillus subtilis*, no entanto, apresentou efeito positivo na acumulação de nitrogênio na parte aérea da planta melhorando seu desenvolvimento e aumentando a produtividade de grãos (Lima et al., 2011).

O trabalho realizado por Cavallet et al. (2000) com inoculação de RPCP em milho mostrou que o parâmetro de crescimento como a altura das plantas não teve correlação significativa com a produtividade de grãos. Desta forma, acredita-se que parâmetros nutricionais possam estar significativamente relacionados ao desenvolvimento das plantas e sua produtividade.

A comparação das concentrações médias de fósforo e potássio, encontradas nas plantas milho, mostrou diferença significativa entre os tratamentos ao nível de 5 % de probabilidade (Tabela 3). Houve influência dos diferentes inoculantes e da adubação NPK, sendo que uma maior concentração de fósforo foi encontrada no tratamento T4M que recebeu NPK₁₀₀ e inóculo 1, sendo maior que a concentração encontrada no tratamento (T1M) que não recebeu inóculo.

Tabela 3: Teores de macronutrientes na parte aérea do milho resultantes da inoculação de sementes.

Ensaio	Inóculo	Adubação NPK (%)	Mg kg ⁻¹			
			P*	K*	Ca*	Mg*
T1M	SI	NPK ₁₀₀	806 b	34519 b	8656 a	1951 a
T2M	SI	NPK ₅₀	561 cd	23685 f	7105 d	1818 ab
T3M	SI	NPK ₀	236 e	19299 g	6980 de	1514 bcd
T4M	I-1	NPK ₁₀₀	991 a	34833 a	8136 b	1440 cd
T5M	I-1	NPK ₅₀	704 bc	26828 c	8206 b	1223 de
T6M	I-1	NPK ₀	590 cd	26343 d	7897 c	1057 e
T7M	I-2	NPK ₁₀₀	520 d	25445 e	6808 e	1635 abc
T8M	I-2	NPK ₅₀	502 d	19278 g	6622 f	1262 de
T9M	I-2	NPK ₀	282 e	10702 h	6283 g	1161 de

SI = sem inóculo; I-2 = inóculo 1 e I-2 = inóculo; *Médias seguidas da mesma letra, na coluna, diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5%.

Entre os tratamentos que não receberam adubação NPK (T3M, T6M e T9M) as concentrações foliares de P e K foram muito superiores no tratamento que recebeu o inóculo 1 quando comparado ao que recebeu o inóculo 2 ou não recebeu inoculação. O relato de solubilização de fósforo no solo por rizobactérias e aumento do fósforo disponível no solo pode ser encontrado na literatura por diversos autores (Richardson, 2000; Canbolat *et al.*, 2006). Estudando a inoculação de sementes de milho com *B. subtilis*, Araujo (2008) obteve concentrações significativamente maiores de fósforo, nas folhas das plantas inoculadas, quando comparadas ao tratamento testemunha.

Os tratamentos T2M (SI, NPK₅₀) e T6M (I-1, NPK₀) proporcionaram concentrações foliares de fósforo estatisticamente equivalentes evidenciando o efeito benéfico do inóculo 1. Esse efeito fica mais evidente quando se compara o tratamento T4M (I-1, NPK₁₀₀) com o T1M (SI, NPK₁₀₀) que receberam adubação NPK adequada ao desenvolvimento da cultura, sendo que o T4M apresentou concentração foliar de fósforo 22 vezes maior que o tratamento sem inóculo.

As concentrações de Ca e Mg (Tabela 3) obtidas na parte aérea das plantas de milho foram maiores nos tratamentos que receberam doses mais elevadas de NPK, sendo que o tratamento T1M (NPK₁₀₀, sem inóculo) foi o que apresentou melhores resultados para esses macronutrientes. A presença dos microrganismos contribuiu para a diminuição dos teores foliares de Ca e Mg, uma vez que estes elementos são nutrientes necessários ao desenvolvimento dos microrganismos e estão relacionados à atividade enzimática e à estrutura da membrana (Griffin, 1994). Os tratamentos T7M, T8M e T9M foram os que apresentaram menores concentrações destes elementos.

3.2. Avaliação do efeito dos inóculos, local de inoculação e da adubação npk na germinação e crescimento da soja

A análise de variância (não apresentada) para o experimento trifatorial (inóculo = I; adubação NPK = A e local do inóculo = LI) realizado com a soja mostrou que as interações duplas (I*A, I*LI e A*LI) e tripla (I*A*LI) para a matéria seca da parte aérea da soja não foram estatisticamente significativas à nível de 95% de probabilidade (p-valor > 0,05). O efeito dos fatores I e A, para o teor de matéria seca da parte aérea, também não foram estatisticamente significativos (p-valor > 0,05). No entanto, o efeito do local do inóculo (LI) foi significativo (p-valor < 0,05). Os tratamentos que receberam os inóculos nas sementes não diferiram significativamente das amostras sem inóculo quanto ao teor de matéria seca. Estudo realizado por Lazzaretti e Bettiol (1997) no qual inocularam *B. subtilis* em sementes de soja e feijão também não foi observado diferença estatística para a massa seca da parte aérea e das raízes das plantas.

Nos tratamentos em que os inóculos foram aplicados no solo foi possível observar maior quantidade de matéria seca em relação aos tratamentos que não foram inoculados (Tabela 4). Comparando a massa seca da parte aérea das plantas, entre os tratamentos que receberam o inóculo 1 no solo, somente o T10S (I-1, NPK₁₀₀) apresentou resultado estatisticamente superior ao demais, alcançando 50% a mais de massa seca. A redução da adubação NPK no tratamento T11S (I-1, NPK₅₀) ou a sua ausência (T12S) promoveu uma diminuição do teor de matéria seca mostrando que a associação das bactérias *B. subtilis* e *B. licheniformes* só foi benéfica na presença de NPK na concentração ideal para o desenvolvimento da cultura.

O inóculo 2 contendo maior número de espécies de bactérias do gênero *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformes*, *Bacillus amylolichifaciens* e *Bacillus cereus*) produziu quantidades de matéria seca equivalentes estatisticamente ao tratamento T10S (I-1, NPK₁₀₀), independentemente das concentrações de NPK empregadas (Tabela 4). O número de vagens e sementes produzidas pelas plantas, parâmetros relacionados com a produção, foi maior nos tratamentos T10S (I-1, NPK₁₀₀) e T15S (I-2, NPK₀) que receberam os inóculos 1 e 2 no solo, respectivamente (Tabela 4), sendo que o T10S recebeu adubação NPK₁₀₀ e o T15S não recebeu adubação. Estes resultados avaliados conjuntamente com a produção de matéria seca da parte aérea da planta, mostraram que o consórcio de bactérias usados no inóculo 2 apresentou um potencial maior para uso nesta cultura, usando quantidades menores de adubos NPK.

Tabela 4: Valores médios do percentual de germinação, altura da planta e matéria seca da parte aérea de soja, resultante da inoculação de sementes e do solo.

Ensaio	Inóculo	Adubação NPK	Local do Inóculo	Germinação (%)	Altura da planta (cm/planta)	Matéria seca da parte aérea (g/planta)	Nº médio de vagens/planta	Nº médio de sementes/planta
T1S	SI	NPK _{100%}	-	67 a	34 a	2,53 ab	9,0 ab	9,0 ab
T2S	SI	NPK _{50%}	-	70 a	35 a	2,71 ab	9,5 ab	11,5 ab
T3S	SI	NPK ₀	-	67 a	35 a	3,06 ab	9,0 ab	14,0 ab
T4S	I-1	NPK _{100%}	Se	80 a	35 a	2,81 ab	9,0 ab	10,3 ab
T5S	I-1	NPK _{50%}	Se	73 a	31 a	2,39 ab	7,7 ab	2,7 ab
T6S	I-1	NPK ₀	Se	73 a	37 a	2,98 ab	4,0 b	8,7 ab
T7S	I-2	NPK _{100%}	Se	80 a	33 a	2,51 ab	1,7 b	1,7 b
T8S	I-2	NPK _{50%}	Se	77 a	32 a	2,31 ab	5,0 ab	4,7 ab
T9S	I-2	NPK ₀	Se	80 a	31 a	2,56 ab	7,0 ab	4,0 ab
T10S	I-1	NPK _{100%}	So	87 a	37 a	3,60 a	14,0 a	18,0 a
T11S	I-1	NPK _{50%}	So	77 a	38 a	3,52 ab	10,3 ab	11,3 ab
T12S	I-1	NPK ₀	So	73 a	38 a	3,44 ab	10,7 ab	14,3 ab
T13S	I-2	NPK _{100%}	So	70 a	40 a	3,68 a	9,7 ab	16,0 ab
T14S	I-2	NPK _{50%}	So	83 a	41 a	3,90 a	11,7 ab	15,3 ab
T15S	I-2	NPK ₀	So	73 a	40 a	3,74 a	15,0 a	17,7 a

SI = sem inóculo; I-2 = inóculo 1; I-2 = inóculo 2; Se = semente e So = solo. Médias seguidas da mesma letra, na coluna, diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5 %.

O fato da inoculação no solo proporcionar melhores resultados pode estar relacionado à maior facilidade de colonização da rizosfera. Para que os microrganismos possam interagir com a planta é fundamental o estabelecimento bacteriano na rizosfera, além disso, a habilidade das bactérias em sobreviver no solo é um fator determinante para o seu sucesso na colonização subsequente da rizosfera (Jjemba e Alexander, 1999; Sottero *et al.*, 2006). Quando o inóculo é aplicado nas sementes os microrganismos introduzidos, para se estabelecerem efetivamente na rizosfera, devem se mover do local da inoculação. Os microrganismos nem sempre são capazes de se mover e essa incapacidade pode estar relacionada às condições ambientais (Suslow, 1982; Sottero *et al.*, 2006). Estudando métodos de inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* na soja, Greenfield (1991) afirmou que a inoculação em sementes, em condições climáticas amenas, foi satisfatória. No entanto, em alta temperatura e clima seco é recomendada a inoculação no solo para maior proteção das bactérias. Neste estudo, os experimentos foram realizados no verão o que pode ter contribuído para a obtenção de melhores resultados quando os inóculos foram aplicados no solo.

Deve-se ressaltar que o potencial biotecnológico das formulações estudadas deve ser avaliado em condições de campo, pois segundo Thakuria *et al.* (2004), é difícil indicar os mecanismos necessários para a maior habilidade da bactéria em promover o crescimento da planta, mas acreditam que estes mecanismos de promoção, podem ser aumentados em condições de campo. Em estudo usando a inoculação de *B. subtilis* na cultura da soja em condições de campo, Araujo e Hungria (1999) observaram um aumento na nodulação e no Destaca-se ainda, que a redução na quantidade de nitrogênio e fósforo aplicados para aumentar o desenvolvimento

das culturas, é benéfica não só do ponto de vista econômico como também ambiental. O nitrogênio juntamente com o fósforo são os principais causadores do processo de eutrofização de corpos hídricos. A fertilização das águas causa grandes afloramentos de algas que quando morrem levam a um consumo de oxigênio que pode ser letal para algumas espécies de peixes.

4. Conclusões

Os inóculos utilizados apresentaram potencial biotecnológico para incrementar o desenvolvimento e a nutrição das plantas de milho e soja.

No milho, o inóculo 1 contendo *B. subtilis* e *B. licheniformes* mostrou efeito benéfico, porém não apresentou indicativo de uso com redução da adubação NPK.

Os ensaios utilizando o inóculo 2 (*B. subtilis*, *B. licheniformes*, *B. amylolichefaciens* e *B.cereus*) no solo mostraram potencial de aplicabilidade no cultivo da soja, indicando a possibilidade de redução da adubação NPK, proporcionando ganhos econômicos e ambientais.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem à empresa Biotecnal Soluções Ambientais LTDA pelo auxílio financeiro prestado.

6. Referências

- ADESEMOYE, A.O. & KLOEPPER, J. W. 2009. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1-12.
- ADESEMOYE, A. O., TORBERT, H. A. & KLOEPPER, J. W. 2010. Increased plant uptake of nitrogen from 15N-depleted fertilizer using plant growth-promoting rhizobacteria. *Applied Soil Ecology*, 46, 54-58.
- AHMAD, F., AHMAD, I. & KHAN, M. S. 2008. Screening of free living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiology Research*, 163, 173-181.
- ARAUJO, F. F. 2008. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostra e desenvolvimento de milho, soja e algodão. *Ciência e Agrotecnologia*, 2, 456-462.
- ARAUJO, F. F. & HUNGRIA M. 1999. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum/B. elkanii*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34, 1633-1643.
- BABALOLA, O. O., OSIR, E. O., SANNI, A., ODHAIMBO, G. D. & BULIMO, W. D. 2003. Amplification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic ACC) deaminase from plant growth promoting rhizobacteria in Striga-infested soils. *African Journal of Biotechnology*, 2, 157-160.
- BENEDUZI, A., PERES, D., VARGAS, L. K., BODANESE-ZANETTINI, M. H. & PASSAGLIA, L. M. P. 2008. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting

activities of nitrogen-fixing *Bacilli* isolated from rice fields in South Brazil. *Applied Soil Ecology*, 39, 311-320.

BERNABEU, P. R., PISTORIO, M., TORRES-TEJERIZO, G., ESTRADA-DE LOS SANTOS, P., GALAR, M. L., BOIARDI, J. L. & LUNA, M. F. 2015. Colonization and plant growth-promotion of tomato by *Burkholderia tropica*. *Scientia Horticulturae*, 191, 113-120.

BHATTACHARYYA, P. N. & JHA, D. K. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1327-1350.

CANELLAS, L. P., SILVA, S. F., OLK, S. C. & OLIVARES, F. L. 2015. Foliar application of plant growth-promoting bacteria and humic acid increase maize yields. *Journal of Food Agriculture Environment*, 13,131-138.

CANBOLAT, M., BILEN, S., ÇAKMAKÇI, R., SAHIN, F., AYDI, A. 2006. Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seeding growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biology and Fertility of Soils*, 42, 350-357.

CAVALLET, L. E., PESSOA, A. C. S., HELMICH, J. J., HELMICH, P. R. & OST, C. F. 2000. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum* spp. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 4, 129-132.

CAZORLA, F. M., ROMERO, D., PEREZ-GARCIA, A., LUGTENBERG, B. J. J., DE VICENTE, A. & BLOEMBERG, G. 2007. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizosphere displaying biocontrol activity. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1950-1959.

CHAMANGASHT, S., ARDAKANI, M. R., KHAVAZI, K., ABBASZADEH, B. & MAFAKHERI, S. 2012. Improving lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth and yield by the application of biofertilizers. *Annals of Biological Research*, 3, 1876-1879.

COELHO, L. F., FREITAS, S. S., MELO, A. M. T. & AMBROSANO, G. M. B. 2007. Interação de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* e de *Bacillus* spp. com a rizosfera de diferentes plantas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 31, 1413-1420.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de Métodos de análise de solos. 2ª. ed. Rio de Janeiro: 2011.

FERREIRA, D. F. 2011. SISVAR: A computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35, 1039-1042.

FREITAS, S. S. & PIZZINATTO, M. A. 1997. Ação de rizobactérias sobre a incidência de *Colletotrichum gossypii* e promoção de crescimento em plântulas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). *Summa Phytopathologica*, 23, 36-41.

FREITAS, S. S. & PIZZINATTO, M. A. 1991. Interações de *Pseudomonas* sp. e *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* na rizosfera de tomateiro (*Lycopersi conesculentum*). *Summa Phytopathologica*, 17, 105-112.

FREITAS, S. S. & VILDOSO, C. I. A. 2004. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 28, 987-994.

GHOLAMI, A., SHAHSAVANI, S. & NEZARAT, S. 2009. The effect of plant growth promoting

rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 49, 19-24.

GLICK, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 109-114.

GOMES, A. M. A., MARIANO, R. L. R., SILVEIRA, E. B., MESQUITA, J. C. P. 2003. Isolamento, seleção de bactérias e efeito de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. *Horticultura Brasileira*, 21, 699-703.

GREENFIELD, P. L. 1991. The influence of method of inoculation and certain herbicides on nodulation and seed yield of soybeans. *South African Journal of Plant and Soil*, 8, 119-123.

GRIFFIN, D. H. Fungal physiology. 2nd ed. New York: Wiley-Liss; 1994.

HUNGRIA, M., CAMPO, R. J., SOUZA, F. M. & PEDROSA, F. O. 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasiliense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*, 331, 413-420.

JJEMBA, P. K. & ALEXANDER, M. 1999. Possible determinants of rhizosphere competence of bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 623-632.

JOSEPH, B., PATRA, R. R. & LAWRENCE, R. 2007. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Plant Production*, 2, 141-152.

LAZZARETTI, E. & BETTIOL, W. 1997. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado a base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. *Scientia Agrícola*, 54, 89-96.

LAVIE, S. & STOTZKY, G. 1986. Interactions between clay mineral and siderophores affect the respiration of *Histoplasma capsulatum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 51, 74-79.

LIMA, F. F., NUNES, L. A. P. L., FIGUEIREDO, M. V. B., ARAÚJO, F. F., LIMA, L. M. & ARAÚJO, A. S. F. 2011. *Bacillus subtilis* e adubação nitrogenada na produtividade do milho. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 6, 657-661.

LUZ, W. C. 2001. Evaluation of plant growth-promoting and bioprotecting rhizobacteria on wheat crop. *Fitopatologia Brasileira*, 26, 597-600.

MAO, J. D., JOHNSON, R. L., LEHMANN, J., OLK, D. C., NEVES, E. G., TOMPSON, M. L. & SCHMIDT-ROHR, K. 2012. Abundant and stable char residues in soil: Implications for soil fertility and carbon sequestration. *Environmental Science and Technology*, 46, 9571-9576.

MARQUES, A. P. G. C., PIRES, C., MOREIRA, H., RANGEL, A. O. S. S. & CASTRO, P. M. L. 2010. Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 1229-1235.

RICHARDSON, A. E. 2000. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28, 897-906.

RODRIGUES, E. P., RODRIGUES, L. S., DE OLIVEIRA, A. L. M., BALDANI, V. L. D., TEIXEIRA, K. R. S., URQUIAGA, S. & REIS, V. M. 2008. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Soil*, 302, 249-261.

- RODRÍGUEZ, H. & FRAGA, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17, 319-339.
- SCHROTH, M. N. & HANCOCK, J. G. 1982. Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. *Science*, 216, 1376-1381.
- SILVEIRA, A. P. D., FREITAS, S. S., SILVA, L. R. C., LOMBARDI, M. L. C. O. & CARDOSO, E. J. B. N. 1995. Interações de micorrizas arbusculares e rizobactérias promotoras do crescimento em plantas de feijão. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 19, 205-211.
- SOTTERO, A. N., FREITAS, S. S., DE MELO, A. M. T. & TRANI, P. E. 2006. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 30, 225-234.
- SUSLOW, T. V. 1982. Role of root colonizing bacteria in plant growth. In: Mount MS, Lary GH., eds. *Phytopathogenic Prokaryotes*. London, Academic Press, 2, 187-223.
- TANK, N. & Saraf, M. 2003. Phosphate solubilization, exopolysaccharide production and indole acetic acid secretion by rhizobacteria isolated from *Trigonella graecum*. *Indian Journal of Microbiology*, 43, 37-40.
- THAKURIA, D., TALUKDAR, N. C., GOSWAMI, C., HAZARIKA, S., BORO, R. C. & KHAN, M. R. 2004. Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. *Current Science India*, 86, 978-985.
- TSAVKELOVA, E. A., CHERDYNTSEVA, T. A. & NETRUSOV, A. I. 2005. Auxin production by bacteria associated with orchid roots. *Microbiology*, 74, 46-53.
- VESSEY, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571-586.
- WANI, P. A. & KHAN, M. S. 2010. *Bacillus* species enhance growth parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in chromium stressed soil. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3262-3267.
- WANI, P. A., KHAN, M. S. & ZAIDI, A. 2007. Synergistic effects of the inoculation with nitrogen fixing and phosphate solubilizing rhizobacteria on the performance of field grown chickpea. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 170, 283-287.
- YASMIN, S., RAHAMAN, M. & HAFEEZ, F. Y. 2004. Isolation, characterization and beneficial effects of rice associated plant growth promoting bacteria from Zansibar soils. *Journal of Basic Microbiology*, 44, 241-252.
- ZAADY, E., PEREVOLOTSKY, A. & OKON, Y. 1993. Promotion of plant growth by inoculum with aggregated and single cell suspensions *Azospirillum brasilense* Cd. *Soil Biology and Biochemistry*, 25, 819-823.