

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

CAIO PORTES INNOCENTI HELENE

**BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS
EM SOLOS ESTERELIZADOS COM ÔZONIO NA CULTURA DO
MILHO**

Ilha Solteira

2021

CAIO PORTES INNOCENTI HELENE

**BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS
EM SOLOS ESTERELIZADOS COM ÔZONIO NA CULTURA DO
MILHO**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Carvalho Minhoto Teixeira Filho
Co-orientador: Prof. Dr. Rodolfo de Niro Gazola

Ilha Solteira

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

H474b Helene, Caio Portes Innocenti .
Bactérias promotoras de crescimento de plantas em solos esterelizados com ôzônio na cultura do milho / Caio Portes Innocenti Helene. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2021
35 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Agrônômica) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, 2021

Orientador: Marcelo Carvalho Minhoto Teixeira Filho

Co-orientador: Rodolfo De Niro Gazola

Inclui bibliografia

1. Cultura do milho. 2. Bactérias promotoras de crescimento de plantas. 3. Ôzônio na agricultura .



João Josué Barbosa

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Diretor Técnico
CRB 8-5642

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ENGENHARIA - CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA

CURSO DE ENGENHARIA AGRONÔMICA

ATA DA DEFESA – TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TÍTULO: Bactérias promotoras de crescimento em solos esterilizados como zônio na cultura do milho

ALUNO: *Caio Portes Innocenti Helene*

RA: 152055169

ORIENTADOR: Marcelo Carvalho Minhoto Teixeira Filho

Aprovado (X) - Reprovado () pela Comissão Examinadora com Nota: 10 Comissão Examinadora:

Marcelo Carvalho Minhoto Teixeira Filho

Prof. Dr. Marcelo Carvalho Minhoto Teixeira Filho
Presidente (Orientador)

Rodolfo de Niro Gazola

Prof. Dr. Rodolfo de Niro Gazola

Natasha Mirella S. de Godoi

Me. Natasha Mirella Inhã Godoi

Caio P. I. Helene

Caio Portes Innocenti Helene

Ilha Solteira, 07 de dezembro de 2021.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida que tenho e pelos momentos que me proporciona, sempre colocando pessoas boas em meu caminho e me abençoando com saúde e proteção.

À minha família, por sempre me apoiar nos momentos difíceis, pelo amor e por fornecer a oportunidade de concluir os estudos para que eu busque sempre o melhor, em especial aos meus pais, Álvaro e Celisa, e aos meus irmãos Livia e Gabriel.

Ao Prof. Dr. Marcelo Carvalho Minhoto Teixeira Filho, pela confiança e auxílio nos trabalhos realizados.

Aos professores, Raissa Dinalli e Rodolfo Gazola por me acolherem como filho, por todo o conhecimento passado e transmitido que utilizarei pelo resto da minha vida, e por sempre iluminarem meu caminho nos momentos bons e também nos momentos ruins.

Aos meus amigos da turma L, por sempre me apoiarem e auxiliarem em momentos de dificuldade e por todos os ensinamentos aprendidos dentro e fora da sala de aula.

Às repúblicas Pai Sortero, Wiskynão, Mansa, Paranazona, Curva de Rio, Caneca Furada, San Tomé e Puleiro das Anjas pela irmandade e por proporcionarem os melhores anos da minha vida.

À gloriosa República Overgasmó, que me acolheu como parte dessa família, pela convivência por todos esses anos e principalmente por conceder amizades que levarei para a vida inteira, em especial aos amigos André, Alexandre, Caio, Erico, Lucas, Luis, Renan, Iago, Vinicius, Bruno, Allan, Mateus, Murillo, Marcos e Miguel.

Aos meus amigos de infância, Felipe Carnietto, Felipe Satolli, Felipe Silva, João Pedro, Guilherme, Marcelo, Rafael e Leonardo por sempre estarem ao meu lado e por todo o aprendizado durante esses muitos anos de amizade.

BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM SOLOS ESTERELIZADOS COM ÔZONIO NA CULTURA DO MILHO

RESUMO

O milho (*Zea mays*) é um alimento básico de extrema importância no cenário nacional, a produção no Brasil contribui com cerca de 80% da produção de grãos. Dentre os cereais cultivados no país, o milho é o mais expressivo, pois é cultivado em todas as regiões e possui uma notável diversificação de seu uso. Já as bactérias promotoras de crescimento de plantas, tem como objetivo aumentar a produtividade e minimizar a utilização de fertilizantes, tendo em vista que auxiliam na germinação e na emergência de plântulas, além de possuir características, como a fixação biológica de nitrogênio e o aumento do sistema radicular, podendo ter seu desempenho aprimorado pela a esterilização do solo com ozônio, que possui capacidade, de aumentar a oxidação do solo e isolar o efeito das bactérias. Desse modo o objetivo do trabalho foi verificar o potencial da cultura do milho inoculado com bactérias promotoras de crescimento em solos esterelizados com ozônio. O trabalho foi realizado em Ilha Solteira – SP, utilizou-se 8 tratamentos dispostos em fatorial 4x2, com três repetições. Os tratamentos consistiram por *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, *A. Brasilense* + *B. subtilis* aplicados via semente e a testemunha (sem inoculação), portanto a utilização das bactérias promotoras de crescimento associadas com solos esterelizados com ozônio, aumentaram o acúmulo e absorção de macro e micronutrientes importantes como o potássio, nitrogênio e o cálcio pelas plantas de milho, todos esses nutrientes de extrema importância para o desenvolvimento da cultura tendo em vista o crescimento das plantas, maior resistência a doenças e enchimento de grãos.

Palavras-chave: *Zea mays*..*Azospirillum brasilense*. ozônio na agricultura.

BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM SOLOS ESTERELIZADOS COM OZÔNIO NA CULTURA DO MILHO

ABSTRACT

Corn is a staple food of extreme importance on the national scene, corn production in Brazil contributes about 80% of grain production. Among the cereals grown in Brazil, corn is the most expressive, as it is grown in all regions of the country and has a remarkable diversification of its use. The growth-promoting bacteria, on the other hand, aim to increase productivity without the use of fertilizers, considering that they assist in germination and seedling emergence, in addition to having characteristics such as biological nitrogen fixation and an increase in the root system, its performance can be improved by sterilizing the soil with ozone, which has the capacity to increase soil oxidation and eliminate microorganisms. Thus, the objective of the work was to verify the potential of maize culture inoculated with growth-promoting bacteria in soils sterilized with ozone. The work was carried out in Ilha Solteira - SP, using 8 treatments arranged in a 4x2 factorial, with three replications. The treatments consisted of *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, *A. Brasilense* + *B. subtilis* applied via seed and control (without inoculation), therefore the use of growth-promoting bacteria associated with ozone-sterilized soils increased the accumulation and absorption of macro and important micronutrients such as potassium, nitrogen and calcium by maize plants, all of these nutrients of extreme importance for the development of the crop in view of plant growth, greater resistance to disease and grain growth.

Keywords: *Zea mays*.. *Azospirillum brasilense*. ozone in the agriculture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Aplicação do gás ozônio no solo para cultivo do milho. Ilha Solteira/SP, 2018.....	17
Figura 2	- Inoculação de <i>A.Brasilense</i> e <i>B. subtilis</i> em sementes do milho . Ilha Solteira/SP,2018.....	18
Figura 3	- Emergência inicial da cultura do milho, Ilha Solteira/SP,2018	18
Figura 4	- Aplicação de N, P, K no solo, duas plantas por vaso. Ilha Solteira/SP, 2018.....	19
Figura 5	- Desenvolvimento inicial das plantas de milho	34
Figura 6	- Desenvolvimento médio das plantas de milho.....	34
Figura 7	- Desenvolvimento final da plantas de milho.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Altura (H), índice de clorofila foliar (ICF), diâmetro do colmo (DC), comprimento da raiz (CR) e volume de raiz (VR) de plantas de milho em função dos tratamentos com inoculação das sementes e aplicação de ozônio no solo. Ilha Solteira/SP,2018	21
Tabela 2	- Concentração de macronutrientes de folhas de milho em função dos tratamentos com inoculação das sementes e aplicação de ozônio no solo. Ilha Solteira/SP,2018.....	22
Tabela 3	- Concentração foliar de nitrogênio em função da interação entre a inoculação das sementes e aplicação de ozônio no solo. Ilha Solteira/SP, 2018.....	23
Tabela 4	- Concentração de micronutrientes de folhas de milho em função dos tratamentos com inoculação das sementes e aplicação de ozônio no solo. Ilha Solteira/SP, 2018.....	23
Tabela 5	- Concentração foliar de manganês em função da interação entre a inoculação das sementes e aplicação de ozônio no solo. Ilha Solteira/SP, 2018.....	24
Tabela 6	- Concentração de macronutrientes das raízes de milho em função dos tratamentos com inoculação das sementes e aplicação de ozônio no solo. Ilha Solteira/SP,2018.....	25
Tabela 7	- Concentração de micronutrientes das raízes de milho em função dos tratamentos com inoculação das sementes e aplicação de ozônio no solo. Ilha Solteira/SP, 2018.....	25
Tabela 8	- Acúmulo de macronutrientes nas folhas e raízes de plantas de milho em função dos tratamentos com inoculação das sementes e aplicação de ozônio no solo. Ilha Solteira/SP, 2018.....	26
Tabela 9	- Acúmulo de cálcio na raiz de planta de milho em função da interação entre a inoculação das sementes e aplicação de ozônio no solo. Ilha Solteira/SP, 2018.....	27
Tabela 10	- Acúmulo de micronutrientes nas folhas e raízes de plantas de milho em função dos tratamentos com inoculação das sementes e aplicação de ozônio no solo. Ilha Solteira/SP, 2018.....	28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1	A cultura do Milho.....	11
2.2	Ozônio na Agricultura.....	12
2.3	Bactérias promotoras de crescimento de plantas.....	14
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1	Localização e Caracterização da Área Experimental.....	17
3.2	Delimitação Experimental e Tratamentos.....	17
3.3	Instalação e Condução do Experimento.....	17
3.4	Avaliações.....	19
3.5	Análise Estatística.....	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5	CONCLUSÕES.....	29
	REFERÊNCIAS.....	30
	FOTOS.....	34

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) dentre os cereias cultivados no Brasil tornou-se o mais expressivo, devido a sua alta produtividade e sua notável diversificação para seu uso. Por ser extremamente relevante para a agricultura brasileira, é cultivado em todas as regiões do país, tornando-se essencial em aspectos de segurança alimentar, na alimentação humana e principalmente animal, sendo possível sua produção em uma abundância de produtos como álcool, bebidas, combustíveis, óleos, etc (CONTINI et al., 2019).

A produção nacional do milho apresenta uma estimativa de ser um dos maiores destaques em relação à safra passada, que obteve com o milho segunda safra uma produção de 72,4 milhões de toneladas na safra de 2018/19. Já o milho primeira safra obteve uma produção de 26,2 milhões de toneladas. Dessa forma, considerando a primeira, segunda e terceira safras a suposição para a temporada 2019/20 é que a produção apresente um crescimento de 0,4%, resultando em 100,5 milhões de toneladas produzidas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB, 2019).

Considerando a diversidade na produção do milho e sua simples adaptação aos tipos de climas e temperaturas, é seguro dizer que a cultura se desenvolve bem em todas as regiões do território brasileiro. Obtendo maior destaque para o milho de primeira safra na região Sul do país, que retém mais de 45% da produção total. Já o milho segunda safra obteve aumento de 31,1% em relação a safra de 2017/18, nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Paraná (CONTINI et al., 2019).

Levando em consideração a produção mundial do milho, o Brasil encontra-se em terceiro lugar, o que contribui significativamente para a economia e para o avanço da agricultura no país. Porém, devido ao aumento da demanda mundial por esse grão, torna-se necessário o aumento da produtividade, além da utilização de práticas de manejo mais sustentáveis com o intuito de diminuir os impactos ambientais. Dessa forma as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs), aparecem como alternativa promissora para o incremento da produtividade da cultura e redução no uso de fertilizantes (ARAÚJO et al., 2012).

Essas bactérias residem naturalmente na maioria dos solos e são com frequência isoladas da rizosfera de diversas plantas cultivadas. Os efeitos benéficos dessas envolvem principalmente o auxílio na germinação de sementes, a emergência de plantulas e crescimento e desenvolvimento maior da cultura. Uma forma de ampliar o seu potencial é a utilização de solos esterelizados com ozônio, que ainda requer estudos na agricultura, porém seus benefícios como oxidante de microrganismos vem demonstrando resultados positivos (ANGIOLETTO et al., 2016).

Diante do exposto, objetivou-se verificar o potencial produtivo da cultura do milho inoculado com bactérias promotoras de crescimento em solos esterelizados com ozônio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do milho

O milho possui origem na América Central ou no México, e vem crescendo e evoluindo nos últimos 8 mil anos, porém através das grandes navegações e com a chegada de Cristóvão Colombo ao continente americano a cultura expandiu-se para outras partes do mundo, consolidando-se na Europa como fonte alimentar para as populações menos favorecidas. Diferentemente da Europa, na América do Sul o milho já era cultivado pelos povos indígenas, onde a maioria dos milhos cultivados eram grãos farináceos, entretanto, foi apenas após a chegada dos colonizadores, que o consumo do cereal em todo o território sul americano cresceu e tornou-se costume na alimentação da população (APROSOJA, 2019).

O milho é da família Gramineae (Poaceae), gênero *Zea* e espécie *Zea mays* L., é o cereal mais versátil para produção, sendo importante não só para alimentação humana, já que a maior parte de seu uso é destinada para a alimentação animal em forma de grão e representa cerca de 70 a 90% da produção total. Além disso apresenta uma importância social muito ampla no Brasil, já que é um cereal fundamental para a população de baixa renda, tendo em vista que a maioria dos seus produtores não possuem produção tecnológica e grandes extensões de terras para produção (MAGALHÃES et al., 2002).

Os grãos de milho possuem essa grande diversidade de utilização tanto para produção animal como humana, muito devido às suas elevadas qualidades nutricionais, possuindo quase todos os aminoácidos conhecidos, com exceção da lisina e do triptofano. Esses grãos normalmente pesam entre 250 a 300 mg, sendo sua composição média em base seca de 72% de amido, 9,5% de proteínas, 9% fibra e 4% óleo, sendo considerado um alimento fornecedor de energia tanto para alimentação animal quanto para a produção humana (RIBEIRO, 2016).

De acordo com o United States Department of America - USDA (2019), o principal produtor de milho no mundo é os Estados Unidos que lideram a produção com a estimativa para safra de 2019/20 de aproximadamente 347 milhões de toneladas, seguido da China, que na safra 2018/2019 chegou a produzir 225 milhões de toneladas. O Brasil aparece como terceiro maior produtor, obtendo uma estimativa para a safra de 2019/20 de 100,5 milhões de toneladas (CONAB, 2019).

No Brasil, o grão é produzido principalmente na região do Mato Grosso, que deve se manter na liderança como maior produtor de grãos pelos próximos 10 anos, segundo dados do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), o aumento até a

safrinha 2027/28 deve ser de 45,5% fazendo com que a produção aumente de 26,7 milhões de toneladas para 38,8 milhões de toneladas. Apesar dessa situação favorável para a região do Mato Grosso, a safra do milho 2017/18 demonstrou um decréscimo considerável em relação a safra anterior, principalmente nos estados do Paraná, São Paulo e Minas Gerais, fundamentalmente devido a diminuição de área plantada onde a soja predominava nas principais áreas de produção, porém, no princípio de que a demanda interna e externa pelo milho deve aumentar, acredita-se que haja um incremento de área resultando em uma produção maior.

A produção de milho é denotada pelo plantio em duas épocas sendo elas: a primeira safra ou safra de verão e a segunda safra ou safrinha; as primeiras safras são realizadas em todos os estados do território brasileiro na época habitual de plantio, ou seja, no período chuvoso, que ocorre no final de agosto nas regiões Sul, Sudoeste e Centro-Oeste, até os meses de outubro/novembro, já na região Nordeste o período chuvoso acontece no início do ano. Segundo a CONAB, a segunda safra ou safrinha nos estados de Rondônia, Tocantins e em algumas regiões da Bahia e Sergipe são plantadas como safra de inverno. Levando em consideração que o milho safrinha refere-se ao milho sequeiro, ele é plantado fora da época ideal, normalmente sendo cultivado de janeiro a março ou até no máximo em meados de abril, habitualmente logo após a soja precoce, e tem como predominância em sua produção a região Centro-Oeste e os estados do Paraná, São Paulo e Minas Gerais. Devido a isso, as condições de clima para a produção não são consideradas favoráveis, porém os sistemas de produção da safrinha vem evoluindo ocasionando uma maior adaptação para superar essas condições, o que vem contribuindo para aumentar os rendimentos das lavouras também nessa época (EMBRAPA, 2015).

2.2. Ozônio na Agricultura

Os problemas ambientais na área da agricultura, vem crescendo gradativamente com o passar do tempo, em todos os lugares do mundo, sendo um dos principais, a ocorrência de doenças devido a microorganismos patogênicos, tais como bactérias, vírus, parasitas e fungos. Com isso, a solução é o desenvolvimento de novas tecnologias que consigam diminuir o risco de infecções de uma forma inovadora, sendo assim a forma mais promissora de tecnologia ambiental, a aplicação de ozônio na água, solo, e matéria orgânica (EBIHARA et al., 2011).

O ozônio é basicamente uma molécula composta por três átomos de oxigênio (O₃),

que se formam a partir do rompimento destas moléculas devido a radiação ultravioleta que vem do sol, os átomos separados combinam-se individualmente com outras moléculas de oxigênio formando o ozônio. Tendo em vista que o ozônio é formado por átomos de oxigênio, é seguro dizer que ele possui grande poder como oxidante, o que o torna muito eficaz na destruição de vírus e bactérias, principalmente em sua forma gasosa o que resulta em um grande esterelizador, alterando as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, água ou matéria orgânica (EBIHARA et al., 2012). Apesar de seus efeitos como esterelizador já serem comprovados, há alguns relatos do efeito negativo como um produto altamente tóxico e poluente, que pode chegar a limitar o crescimento e desenvolvimento de plantas, porém, esses estudos limitam-se aos efeitos do O₃ na superfície do solo, entretanto os efeitos desse gás nas comunidades microbianas do solo e nos processos subterrâneos nos ecossistemas florestais ainda requerem conhecimento e estudos sobre seus pontos negativos e positivos (CHEN et al., 2019).

Embora a utilização do ozônio na agricultura ainda seja pouco utilizada, já é um fato que este em contato com bactérias ou vírus causa uma reação radical que rompe as membranas celulares das bactérias, e destroem a capsula do ácido nucleico que envolvem os vírus, portanto uma grande parte das doenças que afligem as principais culturas são provenientes de vírus, bactérias ou nematóides presentes no solo, e a proposta da aplicação de ozônio no solo vem demonstrando resultados positivos no combate a esses patógenos presentes no solo, isso muito em função do grande poder de esterelização do próprio ozônio (EBIHARA et al., 2011).

A principal forma para controle de insetos e a eliminação de doenças na agricultura ainda é a utilização dos pesticidas, inseticidas, fungidas e herbicidas, que são classificados como produtos químicos e seu uso é extremamente eficiente e necessário para o bom desenvolvimento das principais culturas na área agrícola, porém sua utilização em excesso somada com as aplicações às vezes demasiadas de fertilizantes, que são utilizados para o crescimento das plantas, podem resultar em contaminação do lençol freático, do próprio ecossistema da área de cultivo e até mesmo da saúde humana. Portanto o tratamento do solo com ozônio aparece como uma alternativa de alto potencial e de baixo custo para reduzir o uso de produtos químicos na agricultura, tendo em vista que ele oxida rapidamente os causadores de doenças e ajuda na decomposição de substâncias orgânicas (NAGATOMO et al., 2016).

Segundo Mitsugi et al. (2014), a aplicação de ozônio na agricultura com o objetivo de esterelizar o solo busca principalmente resultados sobre como o gás altera a qualidade do solo e isso pode ser avaliado principalmente através das mudanças características do

pH do solo, o teor de nutrientes inorgânicos, as mudanças na acidez e na quantidade de nutrientes nitrogenados, as alterações nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, e principalmente no teor de fungos, bactérias e vírus que permaneceram no DNA do solo.

A aplicação do ozônio no solo em si não é algo tão simples, podendo ser feita com dois modelos práticos para o tratamento de pequenas áreas e pequenas quantidades de solo, sendo a primeira mais complexa que envolve a agitação do solo com um cultivador que basicamente leva o ozônio ao solo. Já o segundo método é mais simplificado e consiste na utilização da difusão, onde o solo é coberto por uma chapa ou lona e o gás é injetado dentro do espaço entre a superfície do solo e a chapa fazendo com que ele se locomova do mais concentrado para o menos concentrado, e deve ser realizado em ambiente fechado para que não ocorra vazamento do gás. Para grandes áreas agrícolas, o principal método desenvolvido é a barreira dielétrica que gera uma descarga com altas concentrações de ozônio (NAGATOMO et al., 2015).

2.3 Bactérias promotoras de crescimento em plantas

A utilização de fertilizantes químicos, melhoramento genético de plantas, manejos culturais e aplicações de inseticidas e herbicidas são atualmente as principais formas de aumento de produtividade das principais culturas. Contudo, o aproveitamento de bactérias promotoras de crescimento tem o intuito de reduzir a utilização de produtos químicos e ainda manter o nível de produtividade de uma forma menos agressiva ao meio ambiente (GALVÃO et al., 2014).

As BPCPs são um conjunto de microrganismos de vida livre, que possuem o potencial de estimular o crescimento e o desenvolvimento das plantas, elas são capazes de se colonizar tanto na região rizosférica, nas superfícies radiculares, assim como nos tecidos internos do vegetal. Usualmente essas bactérias favorecem o crescimento pois sustentam a demanda vegetal por nutrientes e água, como atuar no aumento da resistência das plantas a pragas e doenças, podendo reagir de forma direta ou indiretamente (GLICK, 2012).

Esse conjunto de microrganismos de vida livre chamados de BPCPs, tem se mostrado essencial para o ecossistema e a ecologia pois tem a capacidade de suprir nutrientes como o nitrogênio, fósforo e ferro. Portanto, os microrganismos que se alojam no interior das plantas e não causam danos nitidos as plantas são chamados de endofíticos e possuem características como a fixação biológica de nitrogênio, aumento do sistema radicular e a produção de fitohormônio. (BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

Entretanto, o conceito de BPCPs que foi determinado para essas rizobactérias podem ter mecanismos de simbiose diferentes e, portanto, assim se manifestar pelo menos de três maneiras distintas, ou seja, elas são divididas em categorias básicas de interações, sendo elas neutras, negativas ou positivas. (WHIPPS,2001). Segundo Beattie (2006), a maioria das rizobactérias associadas através da inoculação estabelece uma relação neutra com a planta hospedeira, não demonstrando nenhum efeito visível no crescimento e na fisiologia do hospedeiro.

A forma negativa de interação é quando apesar da inoculação com a planta hospedeira funcionar, as rizobactérias influenciam desfavoravelmente as plantas, de forma a produzir substâncias fitotóxicas que prejudicam o bom funcionamento da fisiologia da planta, ocasionando em uma planta com menor qualidade fisiológica e crescimento reduzido. Entretanto, em contra partida dessas bactérias que interagem de forma negativa, temos as que comprovadamente exercem um conjunto de mecanismos positivos em suas plantas hospedeiras, de forma direta, auxiliando no crescimento, na solubilização de nutrientes, na fixação de nitrogênio, na produção de reguladores de crescimento entre outros, ou de forma indireta com a estimulação do desenvolvimento de micorrizas e remoção de substâncias tóxicas. (BHATTACHARRYA; JHA, 2012).

Segundo Martinez-Viveros et. al. (2010), as BPCPs apresentam uma diversidade em sua associação com as células das raízes das plantas, elas podem ser classificadas como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas extracelulares ou intracelulares. As rizobactérias de crescimento extracelulares encontram-se na rizosfera ou nos espaços entre as células do cortex da raiz, entretanto as intracelulares se localizam geralmente em lugares específicos dentro dos nodulos estruturais das células das raízes. Alguns dos principais gêneros bacterianos mais utilizados nos estudos dessas bactérias, como o *Azospirillum* e o *Bacillus* fazem parte do grupo de rizobactérias de crescimento extracelular de plantas (GRAY., SMITH., 2005).

O gênero de bactérias conhecidas como *Azospirillum* são chamadas de associativas, pois selecionam uma parte do nitrogênio fixado e sem desvios encaminham para a planta associada (HUNGRIA, 2011). Além disso possuem a capacidade de estimular o crescimento radicular principalmente através do *Azospirillum brasilense* que libera ácido indol-acético, giberilinas e citocininas que promovem o crescimento das raízes, aumentam a absorção de água e minerais, resulta em uma planta mais vigorosa e produtiva, ainda há relatos de melhoria em parâmetros fotossintéticos das folhas, como por exemplo um aumento no índice de clorofila e uma maior produção de biomassa (TIEN et al.,1979; BASHAN et al., 2004).

De acordo com Penot et al. (1992), para que a inoculação entre as plantas e as bactérias ocorra com sucesso, elas devem possuir uma certa afinidade, ou seja, elas precisam estar em sintonia para que assim o desenvolvimento da cultura realize-se da

melhor forma possível, isso calha também para o gênero *A. brasilense* que demonstrou interações favoráveis com a cultura do trigo (WANI et al., 1985) e com a cultura do milho (GARCIA DE SALAMONE et al., 1996).

No tocante o gênero *Bacillus subtilis* é outra bactéria habitante natural do solo, normalmente utilizada para produção de antibióticos, além de ser um excelente agente de biocontrole em doenças agronômicas através da produção de enzimas e fitohormônios que proporcionam benefícios para as plantas, com isso o *Bacillus* pode ser considerado uma rizobactéria promotora de crescimento em plantas pois, a produtos formulados a partir do *B. subtilis* para o tratamento de sementes desde o ano de 1983 nos EUA para diferentes culturas, tipos de solos e de climas, obtendo melhores resultados principalmente em culturas folhosas e hortaliças (WELLER, 1988).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização e Caracterização da Área Experimental

O trabalho foi desenvolvido durante o período de outubro de 2018 até março de 2019, em casa de vegetação com tela de antiafídeo nas laterais e cobertura de plástico, posicionada no Campus 2 da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS/UNESP).

3.2 Delineamento Experimental e Tratamentos

A cultura estudada foi o milho, sendo utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 8 tratamentos dispostos em fatorial 4 x 2, com três repetições. Os tratamentos foram constituídos por *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, *A. Brasilense* + *B.subtilis* aplicados via semente e a testemunha (sem inoculação) associados com ou sem a aplicação de ozônio, totalizando 24 parcelas (vasos de 11 L).

3.3 Instalação e Condução do Experimento

Os vasos foram preenchidos com solo oriundo da área experimental pertencente à Faculdade de Engenharia – UNESP, localizada em Selvíria/MS, sendo classificado como LATOSSOLO VERMELHO Distrófico, textura argilosa (SANTOS et al., 2013) .

No dia 26/10/2018 foi feita a esterilização do solo em uma lona com um gerador de ozônio da marca Wier (modelo Ozplus) com capacidade de produzir 15 g h⁻¹ de O₃, em uma sala (15 m²) fechada sendo o tempo de esterilização do solo de 1 hora e 30 minutos (Figura 1).

Figura 1 - Aplicação do gás ozônio em solo para cultivo do milho. Ilha Solteira/SP, 2018.



Ainda no dia 26/10/2018 antes da semeadura as sementes foram inoculadas com 200 mL do inoculante líquido para 50000 sementes, a inoculação foi feita através de conta gotas que assegurava a quantidade correta do volume do inoculante. A semeadura foi realizada manualmente sendo semeadas 5 sementes por vaso, sendo observado a emergência inicial em alguns vasos no dia 29/10/2018 (Figuras 2 e 3).

Figura 2 –Inoculação de *A. Brasilense* e *B. subtilis* em sementes do milho. Ilha Solteira/SP, 2018.



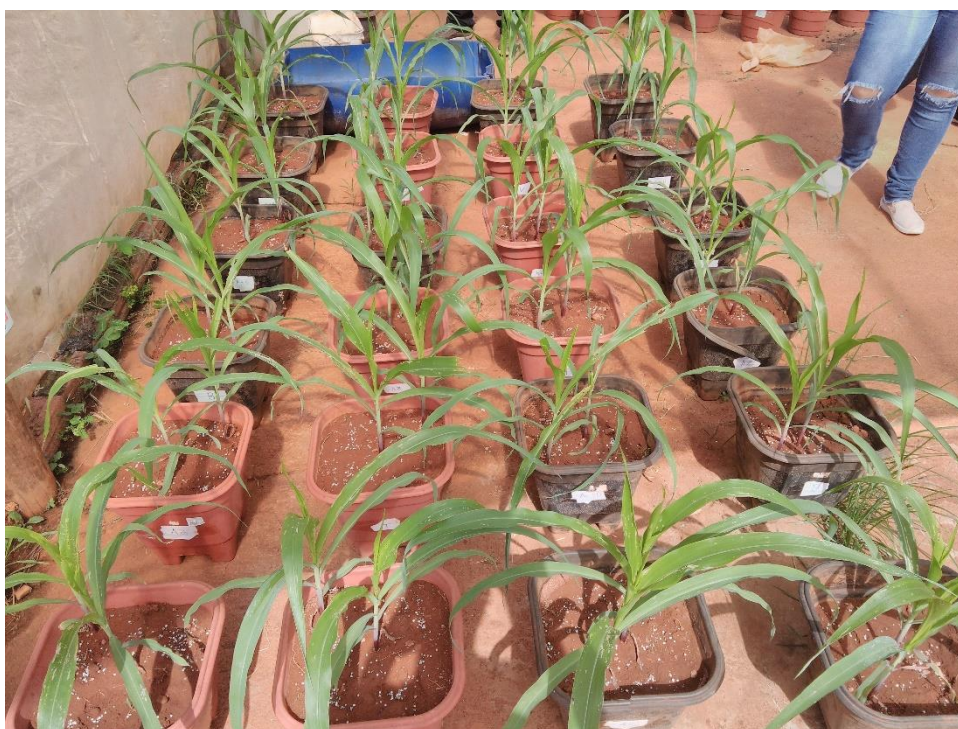
Fonte: próprio autor

Figura 3 –Emergência inicial da cultura do milho. Ilha Solteira/SP, 2018.



Já no dia 13/11/2018 foi feita a remoção de algumas plantas daninhas como a do gênero *Urochloa*, e o desbaste de 3 plantas do milho, mantendo assim apenas 2. Durante o dia 21/11/2018 a segunda planta foi removida, mantendo apenas uma para análise, além disso foi feita a aplicação de N, P e K manualmente na dosagem de 15 mg dm³ de N (ureia), 45 mg dm³ de P₂O₅ (superfosfato simples) e 25 mg dm³ de K₂O (KCl) (Figura 4).

Figura 4 – Aplicação de N, P e K no solo, duas plantas por vaso. Ilha Solteira/SP, 2018.



Fonte: próprio autor

Dia 07/02/2019 o experimento foi desmontado para que no dia 25/02/2019 as amostras fossem levadas para o processo de moagem, para posteriormente serem encaminhadas para as análises no laboratório de nutrição de plantas na semana do dia 25/03/2019.

3.4 Avaliações

1-Altura das plantas

A altura das plantas foram medidas através de uma régua (cm) considerando o nível do solo até o topo da haste principal.

2- Índice de clorofila foliar (ICF)

Foi realizada a leitura de ICF de 2 folhas por planta com o clorofilômetro manual portátil (Falker) modelo CFL 1030, que utiliza três faixas de frequência de luz, levando em consideração a presença de clorofila dos tipos a e b, determinando-se assim, o ICF (FALKER, 2009), ou seja a medida obtida é de forma indireta do teor de clorofila na folha, o aparelho é utilizado no meio da folha da planta.

3- Diâmetro

Para dimensionar o diâmetro dos caules da plantas foi utilizado um paquímetro, que é um instrumento que mede com precisão a largura de pequenos objetos, o paquímetro foi posicionado aproximadamente na altura média dos caules obtendo assim o diâmetro de cada planta.

4- Volume e comprimento das raízes

O comprimento das raízes foi obtido através de uma régua (cm) após as raízes terem sido lavadas e estendidas em uma superfície plana, já o volume foi alcançado através do método da proveta, onde utilizou-se uma proveta de 1000ml, acrescentando um volume de água conhecido e imergindo as raízes na água, sendo o volume radicular equivalente ao volume de água deslocado na proveta, expresso em cm³.

5- Matéria seca do sistema radicular e da parte aérea

A cultura do milho foi desbastada e o experimento desmontado, as plantas foram removidas dos vasos e lavadas para remover o excesso de solo preso nas raízes e folhas. Em seguida, com a ajuda de uma tesoura manual, parte aérea e sistema radicular foram separados, sendo armazenados em sacos de papel, apropriadamente identificados e levados a estufa a 65° C, por 72 horas para a secagem da material. As amostras foram pesadas em uma balança analítica e os valores demonstrados em g planta⁻¹

6- Análise Nutricional

Quando já determinado a matéria seca das folhas e do sistema radicular, as amostras foram moídas individualmente e enviadas para análise para o Laboratório de Nutrição de Plantas da Universidade Estadual Paulista, campus de Ilha Solteira, para que assim se obtesse a concentração de macro e micronutrientes, de acordo com a metodologia descrita por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997).

3.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste F de variância e teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação de médias das aplicações de BPCPs e o ozônio, utilizando-se do programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O índice de clorofila foliar é de extrema importância para a análise do experimento, pois ele está ligado diretamente com o crescimento e a capacidade da cultura de se adaptar a ambientes disntintos, além de revelar o potencial fotossintético das plantas que podem ser influenciados pela temperatura, pela água, nutrientes disponíveis e por diversos fatores bióticos e abióticos. (TAIZ e ZEIGER, 2004). Segundo os resultados obtidos o ICF foi o único que apresentou variância ao teste de tukey, a 5% de probabilidade (Tabela 1). .

Tabela 1- Altura (H), índice de clorofila foliar (ICF), diâmetro do colmo (DC), comprimento de raiz (CR) e volume de raiz (VR) de plantas de milho em função dos tratamentos com inoculação das sementes e aplicação de ozônio no solo. Ilha Solteira/SP, 2018.

Inoculação	ICF	H	DC	CR	VR
	adim.	cm	mm	cm	cm ³
Testemunha	27,1 a	84,5 a	15,6 a	72,5 a	50,0 a
<i>A. brasilense</i>	31,1 a	85,0 a	15,4 a	79,7 a	53,0 a
<i>B. subtilis</i>	29,0 a	93,2 a	15,6 a	69,7 a	52,5 a
<i>A. brasilense</i> + <i>B. subtilis</i>	31,0 a	89,8 a	15,7 a	73,5 a	40,0 a
D.M.S. (5%)	2,7	17,2	1,6	24,8	16,1
Ozônio					
Sem	31,6 a	87,7 a	15,4 a	73,4 a	49,2 a
Com	27,5 b	88,5 a	15,8 a	74,2 a	48,6 a
D.M.S. (5%)	2,7	9,0	0,9	13,0	8,4
C.V. (%)	10,49	11,81	6,43	20,36	19,89
F _{Inoculação x Ozônio}	0,59 ^{ns}	0,32 ^{ns}	1,39 ^{ns}	0,50 ^{ns}	0,19 ^{ns}

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

ns - não significativo a 5 % pelo teste F.

Fonte: Elaboração do próprio autor.

Portanto não houve efeito da aplicação das bactérias no ICF das plantas de milho, a esterilização do solo com ozônio resultou em plantas com menor ICF. A elevada concentração de ozônio inibe a atuação de microrganismos responsáveis pelo fornecimento de nitrogênio (N) ao solo (CHEN et al., 2019). Nesse sentido, há menor disponibilidade de N para as plantas no solo esterilizado e, conseqüentemente, menor concentração de N e síntese de clorofila nas folhas, o que justifica a menor leitura de ICF.

Para a cultura do milho a absorção de nutrientes pelo solo é essencial, sendo os macronutrientes utilizados para a produção e enchimento dos grãos, aqueles que são exigidos em maior quantidade são o nitrogênio e o potássio, que fornecem uma produtividade linear. Sendo o potássio mais absorvido no tempo de desenvolvimento vegetativo, já o nitrogênio possui picos de absorção máxima, sendo eles na formação da espiga e na fase reprodutiva (COELHO, 2006).

É notável a importância dos macronutrientes para o desenvolvimento do milho, portanto a concentração de macronutrientes nas folhas do milho foram analisadas, e podem ser observados os resultados na tabela abaixo (Tabela 2).

Tabela 2- Concentração de macronutrientes de folhas de milho em função dos tratamentos com inoculação das sementes e aplicação de ozônio no solo. Ilha Solteira/SP, 2018.

Inoculação	N	P	K	Ca	Mg	S
	g kg ⁻¹					
Testemunha	25,3	2,5 a	18,0 a	5,1 a	2,5 a	1,6 a
<i>A. brasilense</i>	25,9	2,3 a	16,3 a	4,9 a	2,4 a	1,4 a
<i>B. subtilis</i>	25,3	2,3 a	17,5 a	5,2 a	2,3 a	1,3 a
<i>A. brasilense</i> + <i>B. subtilis</i>	26,7	2,6 a	18,2 a	5,2 a	2,5 a	1,4 a
D.M.S. (5%)	3,4	0,5	3,0	0,9	0,7	0,3
Ozônio						
Sem	26,3	2,5 a	17,0 a	4,9 a	2,4 a	1,4 a
Com	25,2	2,3 a	18,0 a	5,3 a	2,5 a	1,4 a
D.M.S. (5%)	1,8	0,3	1,6	0,5	0,4	0,2
C.V. (%)	8,04	12,64	10,36	10,78	17,94	14,91
F Inoculação x Ozônio	5,75**	1,14 ^{ns}	0,18 ^{ns}	0,99 ^{ns}	0,22 ^{ns}	1,01 ^{ns}

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ns e ** - não significativo e significativo a 1% pelo teste F, respectivamente.

Fonte: Elaboração do próprio autor.

De acordo com os resultados analisados, não houve diferença ao teste de Tukey a 5% e não houve significância ao teste F a 1% para os nutrientes P, K, Ca, Mg e S sendo o único com resultados a serem discutidos o do nitrogênio. Segundo Chen et. al. (2019), é notável que a esterilização realmente faz com que o solo se torne mais limpo, e a oxidação de microorganismos aconteça mais rapidamente e de forma mais efetiva, o que facilitou a ação das bactérias promotoras de crescimento para aumentar a fixação de nitrogênio no solo, para ser absorvido pelas plantas de milho fazendo assim, com que sua concentração fosse maior.

Entretanto quando exposto a altas concentrações de O₃, o ciclo de nitrogênio no solo sofre alterações, ocasionando no aumento da desnitrificação que eleva a emissão de N₂O que não é assimilável pelas plantas, fazendo com que assim a concentração foliar de N em solos sem ozônio fosse maior do que aqueles com a esterilização (CHEN et al.,

2019), porém mais uma vez a esterilização do solo com ozônio ressaltou o efeito das bactérias, pois, a inoculação com ambas das bactérias resultaram em uma concentração maior de N nas folhas, pois desempenharam bem a sua função, já que, selecionaram o nitrogênio fixado e sem desvios já encaminharam para a planta associada, no caso o milho resultando em uma concentração foliar maior de nitrogênio (PANDOLFO et al., 2015). Resultados que podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3. Concentração foliar de nitrogênio em função da interação entre a inoculação das sementes e aplicação de ozônio no solo. Ilha Solteira/SP, 2018.

Inoculação	Ozônio	
	Sem	Com
	N (g kg ⁻¹)	
Testemunha	28,8 a	21,8 bB
<i>A. brasilense</i>	25,1 a	26,6 AB
<i>B. subtilis</i>	25,7 a	24,9 AB
<i>A. brasilense</i> + <i>B. subtilis</i>	25,8 a	27,6 A
D.M.S. (5%) linha	3,6	
D.M.S. (5%) coluna	4,8	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaboração do próprio autor.

Em relação aos micronutrientes, a exigência é menor em relação aos macros, porém sua importância para o desenvolvimento da cultura do milho é indiscutível, pois a deficiência ou excesso de qualquer um deles pode levar a desorganização de processos metabólicos, problemas de fitotoxicidade e até mesmo redução na produtividade (COELHO, 2006). Portanto a análise da concentração desses micronutrientes segue em anexo na tabela abaixo (Tabela 4).

Tabela 4. Concentração de micronutrientes de folhas de milho em função dos tratamentos com inoculação das sementes e aplicação de ozônio no solo. Ilha Solteira/SP, 2018.

Inoculação	Cu	Fe	Mn	Zn
	mg kg ⁻¹			
Testemunha	9,5 a	271,0 a	80,7 a	48,2 a
<i>A. brasilense</i>	7,2 a	231,0 a	85,5 a	53,8 a
<i>B. subtilis</i>	5,8 a	164,3 a	84,3 a	51,2 a
<i>A. brasilense</i> + <i>B. subtilis</i>	6,8 a	247,8 a	82,3 a	53,7 a
D.M.S. (5%)	7,0	160,3	17,9	16,1
Ozônio				
Sem	7,7 a	263,1 a	86,7 a	49,2 a
Com	7,0 a	194,2 a	79,7 a	54,2 a
D.M.S. (5%)	3,7	84,0	9,4	8,4 a
C.V. (%)	25,98	20,27	13,03	18,89
F Inoculação x Ozônio	0,53 ^{ns}	0,43 ^{ns}	5,22 ^{**}	1,15 ^{ns}

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

ns e ** - não significativo e significativo a 1 % pelo teste F, respectivamente.

Fonte: Elaboração do próprio autor.

Observado a Tabela 4 o Cu, Fe e Zn não foram influenciados pela inoculação das sementes e nem pela esterilização com ozônio, sendo o manganês o único nutriente que sofreu intervenção. Portanto os resultados a serem debatidos são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Concentração foliar de manganês em função da interação entre a inoculação das sementes e aplicação do ozônio no solo. Ilha Solteira/SP, 2018.

Inoculação	Ozônio	
	Sem	Com
	Mn (mg kg ⁻¹)	
Testemunha	95,7 a	65,7 bB
<i>A. brasilense</i>	89,3 a	81,7 AB
<i>B. subtilis</i>	89,0 a	79,7 AB
<i>A. brasilense</i> + <i>B. subtilis</i>	72,7 b	92,0 aA
D.M.S. (5%) linha	18,8	
D.M.S. (5%) coluna	25,3	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaboração do próprio autor.

O manganês é conhecido por ser pouco móvel no floema da planta, além disso a sua disponibilidade no solo como nutriente, para a planta varia de acordo com seu estado de oxidação, a forma disponível as plantas é reduzida e absorvida, já a forma oxidada se torna insolúvel, portanto não é assimilada (MARSCHNER, 1995). Devido a isso a concentração foliar do Mn em solos sem a presença de ozônio foi maior, pois o O₃ possui efeito oxidante transformando Mn⁺² para Mn⁺⁴ no solo reduzindo assim a quantidade de Mn, para ser assimilado pelas plantas do milho.

Toda via, quando inoculadas com as bactérias promotoras de crescimento em plantas, a concentração foi maior em solos com a esterilização, pois tanto o *bacillus* como o *Azospirillum*, eles diminuem a oxidação do solo e também aumentam a fixação de nitrogênio, portanto como o manganês atua como um ativador de enzimas, principalmente na síntese de clorofila e também na fotossíntese, e o N é componente das moléculas desses dois processos, ao aumentar a quantidade de N automaticamente a concentração de Mn também aumentou (FAGERIA, 2001).

As raízes das plantas do milho são o caminho para a chegada dos nutrientes para o desenvolvimento das folhas do caule e dos grãos, por isso são essenciais, portanto foram analisados as concentrações de macro e micronutrientes das raízes do milho. Os macronutrientes não apresentaram resultados significantes como indica a Tabela 6.

Tabela 6. Concentração de macronutrientes das raízes de milho em função dos tratamentos com inoculação das sementes e aplicação de ozônio no solo. Ilha Solteira/SP,2018.

Inoculação	N	P	K	Ca	Mg	S
	g kg ⁻¹					
Testemunha	16,3 a	1,8 a	6,9 a	5,4 a	2,2 a	5,0 a
<i>A. brasilense</i>	18,2 a	1,7 a	8,2 a	5,4 a	2,0 a	5,0 a
<i>B. subtilis</i>	17,8 a	1,4 a	8,9 a	5,6 a	2,5 a	5,1 a
<i>A. brasilense</i> + <i>B. subtilis</i>	17,7 a	2,0 a	7,4 a	5,3 a	2,2 a	5,2 a
D.M.S. (5%)	3,8	1,2	3,4	1,8	1,0	1,7
Ozônio						
Sem	17,0 a	1,7 a	8,2 a	5,6 a	2,2 a	4,9 a
Com	18,0 a	1,8 a	7,5 a	5,3 a	2,3 a	5,2 a
D.M.S. (5%)	2,0	0,6	1,8	0,9	0,5	0,9
C.V. (%)	13,03	14,76	26,31	19,60	26,33	20,83
F _{Inoculação x Ozônio}	0,86 ^{ns}	1,26 ^{ns}	0,41 ^{ns}	1,81 ^{ns}	0,27 ^{ns}	0,30 ^{ns}

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

ns - não significativo a 5 % pelo teste F.

Fonte: Elaboração do próprio autor.

Já a avaliação com os micronutrientes, o cobre se destacou e apresentou resultados significantes e a serem discutidos (Tabela 7).

Tabela 7. Concentração de micronutrientes das raízes de milho em função dos tratamentos com inoculação das sementes e aplicação de ozônio no solo. Ilha Solteira/SP,2018.

Inoculação	Cu	Fe	Mn	Zn
	mg kg ⁻¹			
Testemunha	13,3 a	6604,0 a	82,3 a	36,7 a
<i>A. brasilense</i>	18,5 a	5644,0 a	78,7 a	38,0 a
<i>B. subtilis</i>	20,2 a	5897,8 a	72,2 a	39,5 a
<i>A. brasilense</i> + <i>B. subtilis</i>	22,2 a	6651,3 a	70,8 a	41,2 a
D.M.S. (5%)	15,6	2911,7	32,3	14,8
Ozônio				
Sem	23,0 a	6092,6 a	82,7 a	35,1 a
Com	14,1 b	6306,0 a	69,3 a	42,6 a
D.M.S. (5%)	8,1	1525,0	16,9	7,8
C.V. (%)	27,07	28,43	25,76	23,13
F _{Inoculação x Ozônio}	0,94 ^{ns}	0,39 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,77 ^{ns}

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

ns - não significativo a 5 % pelo teste F.

Fonte: Elaboração do próprio autor.

O Cu é o nutriente que forma complexos com ácidos orgânicos, para serem absorvidos pelas plantas, portanto em solos onde não houve a esterilização, os complexos orgânicos se formaram normalmente, portanto a absorção do cobre ocorreu naturalmente, entretanto onde houve a presença de ozônio a quantidade de Cu absorvido pelas raízes foi menor, pois o ozônio reduz a presença dos complexos orgânicos do solo, já que diminui significativamente a diversidade microbiana, fazendo com que, dessa forma o Cu disponível para as plantas fosse menor, devido a isso, as quantidades de cobre nas raízes obtiveram uma concentração inferior (MITSUGI et al., 2014).

Após a análise das concentrações de macro e micronutrientes tanto nas raízes como também nas folhas, foi considerado o acúmulo desses mesmos nutrientes tanto na parte aérea como nas raízes. Os resultados do acúmulo de macronutrientes podem ser observados na Tabela 8.

Tabela 8. Acúmulo de macronutrientes nas folhas e raízes de plantas de milho em função dos tratamentos com inoculação das sementes e aplicação de ozônio no solo. Ilha Solteira/SP,2018.

Inoculação	g planta ⁻¹					
	N	P	K	Ca	Mg	S
Parte aérea						
Testemunha	0,44 a	0,04 a	0,32 a	0,09 a	0,04 a	0,03 a
<i>A. brasilense</i>	0,49 a	0,04 a	0,30 a	0,09 a	0,04 a	0,02 a
<i>B. subtilis</i>	0,44 a	0,04 a	0,31 a	0,09 a	0,04 a	0,02 a
<i>A. brasilense</i> + <i>B. subtilis</i>	0,51 a	0,05 a	0,35 a	0,10 a	0,04 a	0,02 a
D.M.S. (5%)	0,16	0,02	0,11	0,03	0,02	0,01
Ozônio						
Sem	0,46 a	0,04 a	0,29 b	0,08 b	0,04 a	0,02 a
Com	0,49 a	0,04 a	0,35 a	0,10 a	0,05 a	0,02 a
D.M.S. (5%)	0,08	0,01	0,06	0,01	0,01	0,01
C.V. (%)	20,63	26,30	20,78	17,63	23,33	24,49
F Inoculação x Ozônio	0,71 ^{ns}	0,11 ^{ns}	0,10 ^{ns}	1,17 ^{ns}	0,36 ^{ns}	0,01 ^{ns}
Raiz						
Testemunha	0,08 a	0,01 a	0,03 a	0,02	0,01 a	0,02 a
<i>A. brasilense</i>	0,10 a	0,01 a	0,04 a	0,03	0,01 a	0,03 a
<i>B. subtilis</i>	0,09 a	0,01 a	0,04 a	0,03	0,01 a	0,03 a
<i>A. brasilense</i> + <i>B. subtilis</i>	0,07 a	0,01 a	0,04 a	0,02	0,01 a	0,02 a
D.M.S. (5%)	0,04	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01
Ozônio						
Sem	0,08 a	0,01 a	0,04 a	0,02	0,01 a	0,02 a
Com	0,09 a	0,01 a	0,04 a	0,02	0,01 a	0,02 a
D.M.S. (5%)	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
C.V. (%)	29,00	47,63	29,13	25,82	33,94	35,84
F Inoculação x Ozônio	0,59 ^{ns}	0,73 ^{ns}	0,89 ^{ns}	3,87 [*]	1,22 ^{ns}	0,15 ^{ns}

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

ns e * - não significativo e significativo a 5% pelo teste F, respectivamente.

Fonte: Elaboração do próprio autor.

Observando o apuramento atingido dos macronutrientes, apenas o K e o Ca obtiveram resultados a serem discutidos. O potássio apresentou maior acúmulo na parte aérea onde houve a esterilização do solo com ozônio do que nos vasos testemunhas.

Segundo Oliveira et. al. (2004) o potássio assimilável pelas plantas é aquele presente na solução do solo, que está a disposição para suprir as necessidades nutricionais das culturas, porém o solo apresenta também o K-fixado, que não está disponível para as plantas, pois está retido nas entrecamadas de argila do solo. Entretanto, pode se tornar disponível quando é substituído nas entrecamadas por outros cátions como por exemplo o NH₄⁺ e o H⁺ se tornando assim um K⁺ de reposição na solução do solo para posteriormente ser absorvido pelas plantas de milho.

Levando isso em consideração, os solos onde houve doses aplicadas de O₃, estudos indicam que as quantidades de NH₄⁺ e H⁺ aumentam com a sua aplicação, isso se deve ao

fato de as substâncias orgânicas serem decompostas mais rapidamente formando assim maiores quantidades desses cátions (NAGATOMO et al., 2013). Com isso aumentou a quantidade de K^+ na solução do solo para serem absorvidos pelas plantas de milho, pois o K-fixado trocava com os outros cátions liberando o potássio que estava fixado para suprir o potássio que havia sido absorvido da solução do solo, resultando dessa maneira em um maior acúmulo de potássio na parte aérea pois a disponibilidade de potássio no solo também foi maior.

Já o cálcio também apresentou resultado significativo tanto na parte aérea como também nas raízes, resultados que podem ser analisados na Tabela 9.

Tabela 9. Acúmulo de cálcio na raiz de plantas de milho em função da interação entre a inoculação das sementes e aplicação de ozônio no solo. Ilha Solteira/SP, 2018.

Inoculação	Ozônio	
	Sem	Com
Ca (g planta ⁻¹)		
Testemunha	0,03	0,02 B
<i>A. brasilense</i>	0,02 b	0,04 aA
<i>B. subtilis</i>	0,03	0,02 B
<i>A. brasilense</i> + <i>B. subtilis</i>	0,02	0,02 B
D.M.S. (5%) linha	0,01	
D.M.S. (5%) coluna	0,01	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaboração do próprio autor.

Conforme demonstrado pelas Tabelas 8 e 9, o Ca conquistou resultados consideráveis, uma vez que a inoculação com o *azospirillum brasilense* e a esterilização com o ozônio permitiram seu maior acúmulo na porção aérea e também nas raízes. Esse desempenho ocorre devido a associação do Ca com íons como o NO_3^- , que facilitam a sua assimilação e absorção pelas plantas. Tendo isso em mente o *A. brasilense* é reconhecido por aumentar e fixar maiores quantidades de nitrogênio, além disso o O_3 no solo aumenta a velocidade de oxidação de íons, fazendo com que a transformação de nitrito para nitrato aconteça mais rapidamente, resultando dessa maneira em uma maior quantidade de NO_3^- disponível no solo, que é um íon que se associa com o cálcio, dessa forma disponibilizando também maiores quantidades de Ca. (MITSUGI et al., 2014).

O zinco é conhecido por ser limitante no solo, devido a sua baixa disponibilidade por muitas vezes estar retido na matéria orgânica, ou adsorvido nas argilas, portanto seu contato com o ozônio aumentou a sua disponibilidade no solo, tendo assim um maior acúmulo na parte aérea das plantas de milho, devido ao fato do O_3 oxidar a matéria orgânica do solo liberando dessa maneira o zinco retido no solo fazendo com que sua disponibilidade fosse maior (CHEN et al., 2019). Resultados que podem ser observados na Tabela 10.

Tabela 10. Acúmulo micronutrientes nas folhas e raízes de plantas de milho em função dos tratamentos com inoculação das sementes e aplicação de ozônio no solo. Ilha Solteira/SP,2018.

Inoculação	Cu	Fe	Mn	Zn
	mg planta ⁻¹			
Parte aérea				
Testemunha	0,16 a	4,71 a	1,41 a	0,86 a
<i>A. brasilense</i>	0,12 a	4,38 a	1,62 a	1,02 a
<i>B. subtilis</i>	0,10 a	2,82 a	1,48 a	0,91 a
<i>A. brasilense</i> + <i>B. subtilis</i>	0,13 a	4,75 a	1,59 a	1,04 a
D.M.S. (5%)	0,10	3,07	0,51	0,40
Ozônio				
Sem	0,12 a	4,54 a	1,50 a	0,85 b
Com	0,14 a	3,79 a	1,55 a	1,06 a
D.M.S. (5%)	0,05	1,61	0,27	0,21
C.V. (%)	48,65	44,61	20,33	25,39
F Inoculação x Ozônio	1,19 ^{ns}	0,52 ^{ns}	2,45 ^{ns}	0,64 ^{ns}
Raiz				
Testemunha	0,07 a	35,13 a	0,42 a	0,19 a
<i>A. brasilense</i>	0,10 a	32,06 a	0,43 a	0,21 a
<i>B. subtilis</i>	0,09 a	29,51 a	0,36 a	0,20 a
<i>A. brasilense</i> + <i>B. subtilis</i>	0,08 a	23,89 a	0,26 a	0,15 a
D.M.S. (5%)	0,08	23,03	0,24	0,12
Ozônio				
Sem	0,10 a	28,47 a	0,37 a	0,16 a
Com	0,07 a	31,83 a	0,36 a	0,22 a
D.M.S. (5%)	0,04	12,06	0,12	0,06
C.V. (%)	59,36	22,66	39,33	39,02
F Inoculação x Ozônio	1,79 ^{ns}	0,74 ^{ns}	0,66 ^{ns}	1,23 ^{ns}

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

ns - não significativo a 5 % pelo teste F.

Fonte: Elaboração do próprio autor.

5 CONCLUSÕES

A esterilização do solo com ozônio aumentou o acúmulo de macronutrientes de extrema importância como o potássio e cálcio, além de obter resultados positivos também com o zinco e quando inoculado com as bactérias, o desempenho das mesmas foram favorecidos devido a isolação de microrganismos do solo, obtendo dessa maneira uma maior concentração e acúmulo, de nutrientes como o próprio nitrogênio e também o mangânes que possuem grande importância no desenvolvimento da cultura do milho, principalmente na fase de enchimento de grãos. Porém em alguns casos seu efeito foi negativo diminuindo as concentrações de N, Mn nas folhas de milho e Cu nas raízes.

REFERÊNCIAS

- ANGIOLETTO, E. et al. Ozônio na recuperação de solos e recursos hídricos contaminados por mineração. **Criciúma: UNESC**. 2016. 247p.
- ARAUJO, F. F., L. M. Guaberto, e I. F. Da Silva, 2012. **Bioprosperação de rizobactérias promotoras de crescimento em *Brachiaria brizantha***. Revista Brasileira. Zootecnia. 41: 521-527.
- ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES DE SOJA E MILHO DO ESTADO DO MATO GROSSO DO SUL – APROSOJA. **A história do milho**. 2019. Disponível em <http://www.aprosoja.com.br/soja-e-milho/a-historia-do-milho>. Acesso em : 25 abr. 2020.
- BASHAN, Y.; BASHAN, L.E. Bacteria – Plant growthpromoting. In: HILLEL, D. BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Emergence in Agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, abr. 2012.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; LUZ, E. **Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003)**. Canadian Journal of Microbiology, v. 50, n. 8, p. 521-577, 2004.
- BEATTIE, G. A. 2006. **Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances**. In: S.S. Gnanamanickam (ed). Plant –Associated Bacteria. Springer, Netherlands, pp: 1-56.
- BHATTACHARYYA, P. N; JHA, Dhruva K. Plant growth-promoting rhizobacteria(PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327-1350, 2012.
- CHEN, Zhan et al. Elevated O₃ alters soil bacterial and fungal communities and the dynamics of carbon and nitrogen. **Science of The Total Environment**, v. 677, p. 272-280, 2019.
- COELHO, Antonio Marcos. Nutrição e adubação do milho. **Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica**, 2006.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO- CONAB. **Produção de grãos no Brasil deve ser de 238,9 milhões de toneladas**, 2019. Disponível em < <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/2933-producao-de-graos-no-brasil-deve-ser-de-238-9-milhoes-de-toneladas>> . Acesso em : 10 abr. 2020.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Safra recorde de grãos deve chegar a 240,7 milhões de toneladas**, 2019. Disponível em < <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/2966-safra-recorde-de-graos-deve-chegar-a-240-7-milhoes-de-toneladas>> . Acesso em : 10 abr. 2020.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO- CONAB. **ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA DE GRÃOS | v. 6 - Safra 2018/19**, v. 6 - Safra 2018/19 - Décimo segundo levantamento, Brasília, p. 1-126setembro 2019.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira grãos, Safra 2017/18**: quarto levantamento. Brasília: Brasília. 2018. v. 5, p. 1-132.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Perspectivas para a agropecuária**. Brasília: Brasília. 2018 v, 6. – safra 2018/2019, ISSN :2318-3241.

CONTINI, Elisio et al. Milho: caracterização e desafios tecnológicos. **Brasília Embrapa (Desafios do Agronegócio Brasileiro, 2)**, 2019.

CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; ALVARENGA, R. C.; GONTIJO NETO, M. M.; VIANA, J. H. M.; OLIVEIRA, M. F.; SANTANA, D. P. Manejo da cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. p. 1-12 (Circular técnico, 87).

EBIHARA, Kenji et al. On-site ozone treatment for agricultural soil and related applications. **Przegląd Elektrotechniczny**, v. 87, n. 7, p. 148-152, 2011.

EBIHARA, Kenji et al. Recent development of ozone treatment for agricultural soil sterilization and biomedical prevention. **Przegląd Elektrotechniczny**, v. 88, n. 6, p. 92-94, 2012.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- EMPRABA. Cultivo do Milho, 2015. Disponível em https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducaolf6_1galceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-2&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=7905&p_r_p_-996514994_topicoId=8658. Acesso em: 4 ago. 2020.

FAGERIA, V. D. **Nutrient interactions in crop plants**. *Journal of Plant Nutrition*, New York, v. 24. n. 6, p.1269-1290, 2001.

FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA LTDA. **Manual do medidor eletrônico de teor clorofila (ClorofiLOG/CFL 1030)**. Porto Alegre: Falker Automação Agrícola. 2009. Retrieved from <http://www.falker.com.br/download.php>.

FERREIRA, D. F. Um programa para análises e ensino de estatística. In: **Revista Científica Symposium**, Lavras. 2008. p. 36-41.

GALVÃO, J. C. C., MIRANDA, G. V., TROGELLO, E. E FRITSCHÉ-NETO, R. (2014). Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. *Revista Ceres*, 61, 819-828.<http://dx.doi.org/10.1590/0034-737x201461000007>.

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

- GLICK, B. R. **Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications**. *Scientifica*, v. 2012, p. 963401, 2012.
- GRAY, E.J., SMITH, D.L. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.* 37, 395–412.
- HUNGRIA, Mariangela. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. **Embrapa Soja-Documents (INFOTECA-E)**, 2011.
- MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, N. Fisiologia do milho. Sete Lagoas: Embrapa CNPMS, 2002. 23p. Circular Técnica, 22
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.
- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. 2. ed. London: Academic, 1995. 889 p.
- MARTÍNEZ-VIVEROS, O.; JORQUERA, M. A.; CROWLEY, D. E.; GAJARDO, G.; MORA, M. L. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 10, n. 3, p. 293–319, 2010.
- MITSUGI, Fumiaki et al. Properties of soil treated with ozone generated by surface discharge. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 42, n. 12, p. 3706-3711, 2014.
- NAGATOMO, Takuya et al. Fundamental study on ozone treatment of soil for agricultural application. In: **2013 Second IIAI International Conference on Advanced Applied Informatics**. IEEE, 2013. p. 121-124.
- NAGATOMO, Takuya et al. Study on ozone treatment of soil for agricultural application of surface dielectric barrier discharge. **Japanese Journal of Applied Physics**, v. 55, n. 1S, p. 01AB06, 2015.
- OLIVEIRA, R.H.; ROSOLEM, C.A. & TRIGUEIRO, R.M. Importância do fluxo de massa e difusão no suprimento de potássio ao algodoeiro como variável de água e potássio no solo. *R. Bras. Ci. Solo*, 28:439-445, 2004a.
- PAES, M. C. D. Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 75). Sete Lagoas, MG: Dezembro, p.6. 2006.
- PANDOLFO, Carla Maria et al. Desempenho de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* associado a doses de nitrogênio em cobertura. **Embrapa Soja-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2015.
- PATERNIANI, E. et al. O valor dos recursos genéticos de milho para o Brasil: uma abordagem histórica da utilização do germoplasma. In: UDRY, C.W.; DUARTE, W. (Org.). Uma história brasileira do milho: o valor dos recursos genéticos. Brasília: Paralelo 15, 2000. p.11-41.
- PENOT, I.; BERGES, N ; GUIGUENE, C.; FAGES, J. Characterization of *Azospirillum* associated with maize (*Zea mays* L.) in France using biochemical tests and plasmid profiles. *Canadian Journal of Microbiology*, v.38, p.798-803, 1992.
- RIBEIRO, Sergio Silva. Cultura do Milho no Brasil Corn crop in the Brazil.2014.Disponível em <https://www.researchgate.net/publication/291425590> Acesso em : 25 abr .2020.
- SANTOS, H. G. dos *et al.* **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**, 3ª

Edição. Embrapa Solos, Brasília, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*, Tradução de Eliane Romanato Santarém et al. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p

TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, v. 37, n. 5, p. 1016–1024, 1979.

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

WELLER D M Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1988.

Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52, 487–511.

FOTOS DO EXPERIMENTO**Figura 5.** Desenvolvimento inicial das plantas de milho.

Fonte: Dados do próprio autor.

Figura 6. Desenvolvimento médio das plantas de milho.

Fonte: Dados do próprio autor.

Figura 7. Desenvolvimento final das plantas de milho.



Fonte: Dados do próprio autor.