

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA- UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

***Azospirillum brasilense* E UM ISOLADO SOLUBILIZADOR
DE FÓSFORO EM MILHO**

**Carime Moraes
Bióloga**

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA- UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

***Azospirillum brasilense* E UM ISOLADO SOLUBILIZADOR
DE FÓSFORO EM MILHO**

Carime Moraes

Orientador: Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias– Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em Microbiologia
Agropecuária

2016

M827a Moraes, Carime
Azospirillum brasilense e um isolado solubilizador de fósforo em milho / Carime Moraes. -- Jaboticabal, 2016
vii ,64 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Everlon Cid Rigobelo
Banca examinadora: Fábio Camilotti, Mariana Carina Frigieri, Gustavo Vitti Mõro, Dinalva Alves Mochi
Bibliografia

1. Bactérias promotoras de crescimento de plantas. 2. Solubilização de fosfato de rocha. 3. Adubação nitrogenada. 4. *Zea mays*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.858:633.15

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: *Azospirillum brasilense* E UM ISOLADO SOLUBILIZADOR DE
FÓSFORO EM MILHO

AUTORA: CARIME MORAES

ORIENTADOR: EVERLON CID RIGOBELLO

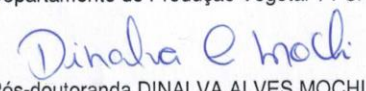
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em
MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. EVERLON CID RIGOBELLO
Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. FÁBIO CAMILOTTI
Centro Est. de Educação Tecnológica Paula Souza / FATEC - Jaboticabal/SP


Profa. Dra. MARIANA CARINÁ FRIGIERI
Centro Est. de Educação Tecnológica Paula Souza / FATEC - Jaboticabal/SP


Prof. Dr. GUSTAVO VITTI MÔRO
Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Pós-doutoranda DINALVA ALVES MOCHI
Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 23 de junho de 2016.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

CARIME MORAES – nascida em 26 de outubro de 1983, na cidade de Jaboticabal, SP, filha de Osvaldo Moraes e Maria de Fátima Rizzo Moraes, Bióloga, graduada pelo Centro Universitário de Araraquara (UNIARA) em Dezembro de 2005. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica – FAPESP no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV/Unesp de Janeiro 2003 a Dezembro de 2005, onde publicou trabalhos em congressos e revistas científicas. Em Março de 2007 ingressou no Curso de Pós Graduação em Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) / Unesp - Jaboticabal, recebendo o título de mestre em Junho de 2009. Ingressou no Curso de Doutorado do mesmo programa, em Agosto de 2012. Durante esse período participou de eventos apresentando trabalhos. Obteve o título de Doutora em Microbiologia na área de Microbiologia Agropecuária em Junho de 2016.

EPÍGRAFE

TUDO POSSO NAQUELE QUE ME FORTALECE (Filipenses 4:13)

A Deus, por toda força, coragem e sempre estar comigo em todos os momentos de minha vida.

Ao meu pai, Osvaldo Moraes pelo incentivo e amor.

A minha mãe Maria de Fátima, pelo amor, apoio e dedicação.

OFEREÇO

A Luiz Ézio pelo carinho e compreensão nos momentos difíceis.

Às minhas irmãs, Andreia e Patrícia, pela amizade e carinho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS e a NOSSA SENHORA DE APARECIDA pela saúde e coragem, iluminado os meus passos para vencer mais esta etapa da minha vida.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal pela oportunidade de realização do curso.

Ao meu orientador professor Dr. Everlon Cid Rigobelo pela oportunidade, confiança e apoio indispensável para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo Luiz Carlos de Assis por todo aprendizado, paciência, amizade e dedicação nos ensinamentos.

À banca examinadora: Prof. Dr. Fábio Camilotti, Prof. Dra. Mariana Carina Frigieri, Prof. Dr. Gustavo Vitti Môro e Dr. Dinalva Alves Mochi pelas valiosas considerações que contribuíram para a melhoria deste trabalho.

Ao prof. Dr. José Carlos Barbosa pela atenção e auxílio na realização das análises estatísticas.

Ao corpo docente do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agropecuária pela transferência de conhecimentos e contribuição para minha formação intelectual.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo por um ano e nove meses.

À Bibliotecária Núbia pelo auxílio nas correções da bibliografia citada.

As amigas especiais: Ana Carolina R. Machado e Dinalva A. Mochi por estarem ao meu lado nas horas difíceis, me confortando sempre.

Aos amigos do laboratório por todos os momentos compartilhados, tanto de trabalho quando os de descontração.

À Edna Maria Testa Dáquila e Rosangela Andrade Vaz pelo auxílio e carinho.

Ao Departamento de Produção Vegetal por ceder a estufa para a realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Gustavo Vitti Môro por gentilmente fornecer as sementes utilizadas no experimento e toda atenção prestada ao trabalho.

Aos funcionários da seção de Pós Graduação pelo esclarecimento e auxílio nas dúvidas.

À todos que contribuíram para a realização deste trabalho ou participaram deste momento.....muito obrigada por tudo!

A persistência é o caminho do êxito (Charles Chaplin)

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE TABELA	v
LISTA DE FIGURAS	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1. A cultura do milho (<i>Zea mays</i> L.)	3
3.2. Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCP)	5
3.3. Importância do fósforo (P)	8
3. 4. Importância do nitrogênio (N)	12
3.5. Benefícios da inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i>	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Plantio	17
4.2. Adubação	18
4.3. Isolado e preparo do inóculo	18
4.4. Inoculação	19
4.5. Avaliação	19
4.5.1. Determinação da altura e matéria seca da planta	19
4.5.2. Análises microbiológicas e química do solo	20
4.5.2.1. Análises microbiológicas do solo	20
4.5.2.1.1. Contagem de bactérias totais	20
4.5.2.1.2. Carbono da biomassa microbiana	21
4.5.2.2. Análises química do solo	23
4.5.2.2.1. Determinação da umidade do solo	23
4.5.2.2.2. Determinação da matéria orgânica do solo	23
4.5.2.2.3. Nitrogênio total Kjeldahl	24

4.5.2.2.4. Fósforo solúvel.....	24
4.5.2.2.5. Solubilização de fosfato insolúvel em meio de cultura líquido	25
4.5.2.2.6. Determinação do fosfato solúvel.....	25
5. Delineamento experimental e análise estatística.....	26
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
6.1. Altura, matéria seca de raiz e folha das plantas de milho	27
6.2. Contagem de bactérias totais, fósforo e nitrogênio total no solo	32
6.3. Matéria orgânica, umidade e carbono da biomassa microbiana do solo	37
6.4. Concentração de fosfato solúvel em meio de cultura líquido	40
7. CONCLUSÕES.....	43
8. REFÊRENCIAS	44

***Azospirillum brasilense* E UM ISOLADO SOLUBILIZADOR DE FÓSFORO EM MILHO**

RESUMO -A utilização de micro-organismos que auxiliam no crescimento e nutrição de plantas é uma alternativa promissora para reduzir a dependência de fertilizantes químicos, diminuindo os custos da produção agrícola e também os impactos ambientais causados. Objetivou-se avaliar a solubilização de fluorapatita pelas bactérias *A. brasilense* e S11 em meio de cultura e avaliar a capacidade desses isolados em promover o crescimento de plantas de milho, além de verificar as alterações químicas e microbiológicas ocorridas no solo decorrente da inoculação das bactérias. O teor de fósforo em meio de cultivo foi verificado diariamente por 7 dias. As plantas de milho foram cultivadas em potes plásticos de 12 dm³ preenchidos com latossolo vermelho escuro em ensaio conduzido em casa de vegetação. Os tratamentos foram dispostos em blocos casualizados, em fatorial (4x2x2), com cinco repetições. Os fatores foram: 1) Inoculação no solo (*A. brasilense*, bactéria solubilizadora de fósforo (S11), inoculação com as duas bactérias, controle). 2) Dois níveis de adubação fosfatada: fertilizado e não fertilizado com fosfato de rocha; 3) dois níveis de adubação nitrogenada em cobertura (ausência e presença). Os parâmetros da planta avaliados foram: altura, massa de matéria seca de parte aérea e raiz, enquanto no solo verificou-se a umidade, teor de matéria orgânica, contagem total de bactérias, nitrogênio total, fósforo e carbono da biomassa microbiana. O teor de fósforo solúvel no meio de cultivo variou de 5,26 a 13,56 µg P mL⁻¹ para *A. brasilense* e de 62,04 a 760,55 µg P mL⁻¹ para S11. A inoculação com S11 após 336 horas proporcionou o maior valor de fósforo solúvel no meio de cultivo. A aplicação de *A. brasilense* na ausência de adubação fosfatada aumentou em 10,2% e 28% a altura da planta e matéria seca de folha, respectivamente. Na ausência de adubação fosfatada e nitrogenada a aplicação de bactéria solubilizadora de fósforo aumentou em 44,1% a matéria seca de raiz e 32% a de folha. A umidade do solo não foi afetada pelos fatores avaliados, enquanto que a matéria orgânica foi incrementada pela adubação fosfatada e inoculação de *A. brasilense*. Após 60 dias da semeadura, a inoculação com S11 isolado ou em combinação com *A. brasilense*, resultou em aumentos de 4,2 e 3,5%, respectivamente, na densidade de bactérias no solo. A inoculação em conjunto de *A. brasilense* e S11 na presença de adubação fosfatada e nitrogenada em cobertura proporcionou o maior valor de nitrogênio total no solo. Aumento de 75,9% no fósforo do solo foi obtido com adubação fosfatada e inoculação com *A. brasilense*. A inoculação de *A. brasilense* associada a presença de adubação nitrogenada e na ausência de adubação fosfatada promoveu um aumento no carbono da biomassa microbiana.

Palavras-chave: adubação nitrogenada, bactérias promotoras de crescimento de plantas, fosfato de rocha, solubilização de fosfato, *Zea mays*

***Azospirillum brasilense* AND A PHOSPHORUS SOLUBILIZER ISOLATED IN MAIZE**

ABSTRACT - The use of microorganisms that help the plant growth and nutrition is a promising alternative to minimize the dependence of chemical fertilizers, reducing both costs and the environmental impacts. We aimed evaluate the fluorapatite solubilizing by *A. brasilense* and S11 bacteria in culture medium, as well evaluate its capacity of promote the maize growth. We also verified the chemical and biological changes in the soil due to the bacteria inoculation. The phosphate content in the cultivation medium was determined daily per 7 days. The maize plants were cultivated in plastic pots of 12dm³ filled out with an Oxisol in an experiment carried out under greenhouse condition. Treatments were arranged in a randomized blocks design in a factorial scheme (4x2x2), with five replications. The factors were: 1) Soil Inoculation (*A. brasilense*, the phosphorus solubilizing bacteria S11, inoculation with both bacteria, and control). 2) Two levels of phosphate fertilization: with and without rock phosphate. 3) Two levels of nitrogen topdressing fertilization (presence and absence). The evaluated plant parameters were: high, aerial and root parts dry matter mass, soil humidity, organic matter, total bacterial count, total nitrogen and phosphorus, and microbial biomass carbon. The soluble phosphorus content in the mean varied from 5.26 to 13.56 µg P mL⁻¹ to *A. brasilense* and from 62.04 to 760.55 µg P mL⁻¹ to S11. The S11 inoculation after 336 hours provided the highest soluble phosphorus content in the mean. When we used *A. brasilense* without the phosphate fertilization the plant was 10% taller and had 28% more dry matter. When we used the phosphorus solubilizing bacteria without neither nitrogen nor phosphorus there was an increase of 44.1% of root dry matter and 32% of leaves. The soil humidity was not affected by the evaluated factors, while the organic matter increased due to the phosphate fertilization and *A. brasilense* inoculation. After 60 days of seedling, the inoculation with S11 both isolated and combined with *A. brasilense* presented an increase of 4.2 and 3.5% of bacteria density, respectively. Inoculating both *A. brasilense* and S11 together to the phosphate and topdressing nitrogen fertilizer, there was a higher content of total nitrogen in the soil. We could observe an increase of 75.9% in the soil phosphorus when combined with phosphate fertilization and *A. brasilense* inoculation. *A. brasilense* inoculation together to the nitrogen fertilization and without the phosphate fertilization promoted an increase in the microbial biomass carbon.

Keywords: nitrogen fertilization, plant growth-promoting bacteria, rock phosphate, phosphate solubilization, *Zea mays*

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Composição química do solo obtida anterior a implantação do experimento.....	18
Tabela 2. Altura, matéria seca de raiz (MSR) e folha (MSF) de plantas de milho após 60 dias da semeadura em função dos fatores inoculação (I), adubação fosfatada (P) e adubação nitrogenada (N).....	28
Tabela 3. Desdobramento da interação inoculação <i>versus</i> adubação fosfatada (IxP) para altura e matéria seca da folha (MSF) de plantas de milho após 60 dias da semeadura.....	29
Tabela 4. Desdobramento da interação inoculação <i>versus</i> adubação nitrogenada (IxN) para altura e matéria seca de raiz (MSR) de plantas de milho após 60 dias de semeadura.....	31
Tabela 5. Número total de unidades formadora de colônia de bactérias (UFC), fósforo solúvel (P) e nitrogênio (N) total (NT) no solo cultivado com milho após 60 dias da semeadura em função dos fatores inoculação (I), adubação fosfatada (P) e adubação nitrogenada.....	33
Tabela 6. Desdobramento da interação inoculação <i>versus</i> adubação fosfatada (IxP) para o número total de unidades formadora de colônia de bactérias (UFC), no solo cultivado com milho após 60 dias da semeadura.....	34

Página

Tabela 7.	Desdobramento da interação inoculação <i>versus</i> adubação fosfatada (IxP) para o fósforo solúvel (P) e nitrogênio (N) no solo cultivado com milho após 60 dias da semeadura.....	35
Tabela 8.	Desdobramento da interação inoculação <i>versus</i> adubação nitrogenada (IxN) para o fósforo solúvel (P) e nitrogênio (N) no solo cultivado com milho após 60 dias da semeadura.....	36
Tabela 9.	Matéria orgânica (M.O), umidade e carbono da biomassa microbiana (C.B.M), de solo cultivado com milho em função dos fatores inoculação (I), adubação fosfatada (P) e adubação nitrogenada (N).....	38
Tabela 10.	Desdobramento da interação inoculação <i>versus</i> adubação fosfatada (IxP) para matéria orgânica (M.O) e carbono da biomassa microbiana (C.B.M) de solo cultivado com milho.....	39
Tabela 11.	Desdobramento da interação inoculação <i>versus</i> adubação nitrogenada (IxN) para o carbono da biomassa microbiana (C.B.M) de solo cultivado com milho.....	40

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Concentração diária de fosfato solúvel em meio de cultura suplementado com fluorapatita e inoculado com *Azospirillum brasilense* e bactéria (S11) durante 7 dias 41

1. INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays L.*) possui uma grande importância na produção mundial de cereais. Este grão é usado na alimentação humana, animal e na geração de matérias-primas industriais (ARRUDA et al., 2013). Dentro da evolução mundial de produção, o Brasil tem destaque como terceiro maior produtor, com uma produção agrícola total de 83.336 milhões de toneladas (CONAB, 2016).

Para obter altos rendimentos na maioria das culturas, especialmente em milho, torna-se imprescindível o fornecimento de nitrogênio que, entre os nutrientes minerais, é um dos mais importantes e limitantes para a produtividade, sendo sua aplicação requerida em grandes quantidades (DOTTO et al., 2010). A utilização deste elemento envolve danos ambientais, como o aumento da concentração de nitrato na superfície da água e solo, perda de nitrato por lixiviação, volatilização da amônia e emissão de óxido nitroso durante a desnitrificação (KENNEDY et al. 2004).

Outro elemento muito importante e muito exigido pelas plantas de milho é o fósforo, pois este faz parte de diversas moléculas que mantêm o metabolismo celular, como os ácidos nucleicos, as proteínas e os aminoácidos (ACEVEDO et al., 2014). A disponibilidade deste nutriente no solo é bastante limitada, havendo a necessidade da aplicação de fertilizantes solúveis para o adequado crescimento das plantas (VIRUEL et al., 2014). Entretanto, os fertilizantes solúveis, além do alto custo e da grande quantidade requerida, têm como problema que boa parte do fósforo solúvel introduzido reage com componentes do solo, formando compostos pouco disponíveis (FERNÁNDEZ et al., 2012). Os fenômenos de fixação e precipitação de fósforo são altamente dependentes das condições do solo, tais como pH, teor de umidade, temperatura e os minerais já presentes no solo (WALPOLA; YOON, 2012).

As bactérias solubilizadoras de fósforo são capazes de converter fosfatos insolúveis na rizosfera em formas solúveis através da acidificação, quelação e produção de ácidos orgânicos (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999). A inoculação no solo com bactérias solubilizadoras de fósforo resultou em um aumento no crescimento da planta, rendimento e absorção de fósforo em várias culturas (HAMEEDA et al., 2008; XUAN et al., 2012; VIRUEL et al., 2014).

Considerando o elevado custo econômico e ambiental oriundo do processo de produção de fertilizantes minerais, aliado a uma grande importância econômica do milho no setor agrícola e industrial, torna-se importante a busca de métodos que possam reduzir a utilização destes fertilizantes, sem diminuição na produção agrícola. Uma alternativa é a utilização de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), capazes de melhorar o crescimento e rendimento de muitas espécies de interesse agrônomo e ecológico (PEDRAZA, 2008). Este grupo de bactérias é capaz de promover o crescimento da planta através de mecanismos, tais como a fixação biológica do nitrogênio (FBN), produção de fitohormônios (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006) e solubilização de fosfato (WALPOLA; YOON, 2013). Fazendo parte deste grupo estão linhagens do gênero *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium* e *Erwinia* (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999).

Os gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia* estão entre os micro-organismos diazotróficos mais estudados (COSTA et al., 2015). Diversos trabalhos têm relatado os efeitos positivos da interação entre milho e *Azospirillum* spp, proporcionando aumento na produção de matéria seca, no rendimento de grãos, produção de biomassa, estimulando o desenvolvimento da raiz, entre outros (SWEDRZYŃSKA; SAWICKA, 2000; HUNGRIA et al., 2010; LANA et al., 2012).

Assim, a utilização de micro-organismos solubilizadores de fosfato de rocha e fixadores de nitrogênio pode ter um papel importante no fornecimento de fósforo e nitrogênio para diferentes culturas (BALDOTTO et al. 2012), podendo agir como biofertilizantes, visando aumentar o crescimento e rendimento de plantas. A resposta da cultura do milho a fertilizantes é bem conhecida, no entanto, a combinação de inoculantes microbianos com fertilizantes tem demonstrado resultados variáveis.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

- a) Avaliar em ensaio de laboratório a eficiência de solubilização de fluorapatita em meio líquido por *A. brasilense* e bactéria solubilizadora de fósforo (S11);
- b) Avaliar o desenvolvimento da planta do milho e as alterações químicas e microbiológicas do solo inoculado com *A. brasilense* e com uma bactéria solubilizadora de fósforo (S11) em condições de casa de vegetação;
- c) Verificar em condições de casa de vegetação a influência das adubações nitrogenada e fosfatada no desempenho desses micro-organismos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. A cultura do milho (*Zea mays* L.)

O milho (*Zea mays* L.), originário da América, provavelmente da região onde hoje se situa o México, foi domesticado em um período entre 7.000 e 10.000 anos atrás (CANTARELLA; BULL, 1993); pertence à família das *Poaceas*, gênero *Zea*, classificado cientificamente como (*Zea mays* L.), é a única espécie cultivada do gênero. É uma espécie politípica, apresentando características que permitem seu cultivo em praticamente todos os continentes (FORNASIERI FILHO, 2007). Seu nome de origem indígena caribenha significa “sustento da vida”. O milho foi o alimento básico de várias civilizações importantes ao longo dos séculos, e sua domesticação ocorreu a partir de um ancestral selvagem, o teosinte (MILHO, 2016).

O milho é uma cultura de relevante importância internacional, ocupando posição de destaque entre as espécies agrícolas exploradas mundialmente, pois é um alimento de alto valor energético e de custo relativamente baixo, além de ser empregado em grande número de produtos (GALVÃO; BORÉM; PIMENTEL, 2015); além disso, apresenta diversas formas de utilização, que vão desde a alimentação

animal até a indústria de alta tecnologia. No mundo, o uso do milho em grão como alimentação animal representa 66% do consumo desse cereal; 25% é utilizado como alimento humano e em processos industriais, e o restante é utilizado como semente ou perdido (FORNASIERI FILHO, 2007); assim, é considerado uma espécie indispensável para a humanidade (GALVÃO; BORÉM; PIMENTEL, 2015).

Dentro da evolução mundial de produção de milho, o Brasil tem destaque como terceiro maior produtor, superado apenas pelos Estados Unidos e pela China, com uma produção agrícola total de 83.336 milhões de toneladas de grãos, com uma produtividade média de 5.432 em kg/ha em 15.341,8 milhões de hectares (CONAB, 2016). Apesar de estar entre os três maiores produtores, a produção brasileira está muito abaixo das previstas para este ano na China e nos Estados Unidos, equivalentes a 225 e 348 milhões de toneladas, respectivamente (USDA, 2015). Embora seja um produto de grande importância econômica, praticamente toda a produção brasileira de milho é consumida internamente, sendo que cerca de 70 a 80% é destinada aos setores de aves e suínos, para o preparo de rações (DUARTE et al., 2010).

Apesar de encontrar-se amplamente disseminada no Brasil, há predomínio das regiões Centro-Oeste e Sul, as quais representam aproximadamente 68% da área cultivada; já a região Sudeste contribui com apenas 16% da produção brasileira de milho, por ser uma das regiões com menor área cultivada (GALVÃO; BORÉM; PIMENTEL, 2015). Isto se deve tanto à sua multiplicidade de usos na propriedade rural quanto à tradição de cultivo desse cereal pelos agricultores brasileiros (MAGALHÃES et al., 2002). É praticada por todas as classes de produtores, tanto para o consumo próprio, no caso de pequenas propriedades, até grandes produtores, cujas produção destina-se ao abastecimento do mercado (PAVÃO; FERREIRA FILHO, 2011). Na agricultura familiar, o milho é de grande importância na subsistência das pessoas, por ser de alto valor energético e ser utilizado diretamente para o consumo humano na forma de milho cozido e também na forma de derivados, como pamonha, cural, farinha de milho, canjica, cuscuz, polenta, pães, pipoca, bolos, que são importantes fontes de energia (GALVÃO; BORÉM; PIMENTEL, 2015).

No Brasil, a produção de milho tem se caracterizado pela divisão da produção em duas épocas de plantio. Os plantios de verão, ou primeira safra, são realizados na época tradicional, durante o período chuvoso, que varia entre fins de agosto na região Sul até os meses de outubro/novembro no Sudeste e Centro Oeste (no Nordeste este período ocorre no início do ano). Mais recentemente, tem aumentado a produção obtida na chamada "safrinha", ou segunda safra. A "safrinha" se refere ao milho de sequeiro, plantado extemporaneamente, em fevereiro ou março, quase sempre depois da soja precoce, predominantemente na região Centro-Oeste e nos estados do Paraná e São Paulo. Verifica-se um decréscimo na área plantada no período da primeira safra devido à concorrência com a soja, o que tem sido parcialmente compensado pelo aumento dos plantios na "safrinha". Embora realizados em uma condição desfavorável de clima, os plantios da "safrinha" vem sendo conduzidos dentro de sistemas de produção que tem sido gradativamente adaptados a estas condições, o que tem contribuído para elevar os rendimentos das lavouras (DUARTE et al., 2010).

De acordo com Arruda et al. (2013), para obter alto rendimento do milho é necessária a aplicação de fertilizantes minerais no solo. No entanto, a utilização destes insumos, especialmente em não leguminosas, causa o desequilíbrio nos ecossistemas naturais, além de ser uma prática cara na agricultura. Desta forma, existe a necessidade de avanços nas pesquisas sobre micro-organismos que se encontram na rizosfera de diversos vegetais e que auxiliam na obtenção de nutrientes, diminuindo o custo e aumentando a produção. Assim, a utilização dos micro-organismos na forma de inoculantes biológicos pode ajudar o mercado agrícola, por substituir ou reduzir métodos tradicionais de adubação com fertilizantes.

3.2. Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCP)

Bactérias promotoras de crescimento são um grupo de bactérias que podem ser encontradas na rizosfera, na superfície de raiz e em associação com raízes (STAMENOV, 2012). São conhecidas na literatura como "plant growth-promoting

bactéria” (PGPB) ou “bactérias promotoras do crescimento de plantas” (BPCP), podem colonizar diferentes órgãos das plantas e exercem efeitos benéficos sobre as mesmas, podendo melhorar o fornecimento de nutrientes para a cultura através de vários mecanismos (KLOEPPER et al., 1989) e podem agir direta ou indiretamente (GLICK, 1995). Este grupo de bactérias é definido por um grupo de pesquisadores da China como bactérias que aumentam a produção (*Yield Increasing Bacteria* ou YIB) (PIÃO et al., 1992).

Os mecanismos diretos incluem a fixação biológica do nitrogênio, produção de fitohormônios como as auxinas e giberilinas, solubilização de minerais como o fósforo e ferro, produção de sideróforos, enzimas e indução de resistência sistêmica. Os mecanismos indiretos são basicamente relatados como biocontrole, incluindo produção de antibiótico, quelação de ferro disponível na rizosfera, síntese de enzimas extracelulares para hidrolisar a parede celular de fungo e competição por nichos dentro da rizosfera (CASTRO et al., 2009; ZAHIR et al., 2003), aumentar a resistência ao estresse, estabilizar agregados do solo e melhorar o conteúdo de matéria orgânica (HAYAT et al., 2010).

Segundo Vessey (2003), as bactérias promotoras de crescimento têm a habilidade de converter elementos indisponíveis para as plantas em formas disponíveis através de processos biológicos.

Os efeitos benéficos das BPCP também podem ser observados em plantas propagadas “*in vitro*” e “*in vivo*”, principalmente pelo aumento ocasionado na altura, área foliar, número de folhas, redução do tempo de aclimatização, maior sobrevivência de mudas, controle de doenças e aumento de produtividade (BALDOTTO et al., 2010). Sementes de arroz tratadas com linhagens de bactérias promotoras de crescimento apresentaram maior crescimento, aumento na massa seca de folha e raiz, na absorção de nutrientes e um alto conteúdo de clorofila (SHARMA et al. 2014; SALOMONE et al. 2012). De acordo com os autores, a aplicação das bactérias foi capaz de melhorar a qualidade e a produtividade da cultura do arroz.

De acordo com sua relação com as plantas, as BPCP podem ser divididas em dois grupos: as bactérias simbióticas e as rizobactérias de vida livre (KHAN, 2005). As bactérias simbióticas vivem no interior de células de plantas, localizadas dentro

de estruturas especializadas, e produzem nódulos. Atualmente, as bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium* são as mais estudadas deste grupo, mas existem outros gêneros bacterianos que pertencem a essa categoria, como *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*. Já as rizobactérias de vida livre são bactérias que vivem fora da células vegetais e não produzem nódulos, mas acentuam o crescimento da planta, através da produção de compostos sinalizadores que estimulam diretamente o crescimento vegetal, aumentando a resistência das plantas, podendo ser incluídas nesta categoria as bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Burkholderia* (GRAY; SMITH, 2005).

Considerando seus efeitos sobre o crescimento vegetal, este grupo de bactérias pode ser classificados em benéficas, deletérias ou neutras (GRAY; SMITH, 2005; DOBBELAERE et al., 2003). Aquelas que estabelecem uma associação benéfica com as plantas têm sido isoladas, multiplicadas, formuladas e utilizadas como prática agronômica em alguns países, favorecendo o desenvolvimento e a produtividade das plantas (LUZ, 1996).

Segundo Guimarães et al. (2007), a aplicação de linhagens de bactérias promotoras de crescimento na forma de inoculantes biológicos é uma estratégia para aumentar a produção de alimento e reduzir a dependência de insumos baseados em fontes energéticas não renováveis, poluentes e economicamente insustentáveis. Os inoculantes bacterianos são capazes de aumentar o crescimento da planta, emergência de semente e melhorar o rendimento das culturas (MINORSKY, 2008), além de melhorar a resposta da planta a fatores de estresse do ambiente e proteger contra doenças (LUGTENBERG et al., 2002).

A utilização de inoculantes bacterianos contendo as linhagens *Pseudomonas alcaligenas* (PsA15), *Bacillus polymyxa* (BcP26) e *Mycobacterium phlei* (MbP18) em milho proporcionaram aumentos significativos na massa seca de folha e raiz, bem como no conteúdo de nitrogênio, fósforo e potássio de folhas e raiz da planta (EGAMBERDIYEVA, 2007). Wu et al. (2005) relataram não apenas os efeitos benéficos no crescimento, mas também na absorção de nitrogênio, fósforo e potássio pelas plantas de milho decorrentes da inoculação com agentes microbianos constituído por *Bacillus megaterium* e *Bacillus mucilaginosus*.

O efeito da inoculação de algumas espécies de bactérias promotoras de crescimento, como a *Pseudomonas* sp, *Archomobacter* sp., *Chryseobacterium* sp., *Herbaspirillum* sp., *Burkholderia* sp. e *Arthrobacter* sp e *A. brasilense* no desenvolvimento de milho foi estudado por Arruda et al. (2013), que verificaram aumentos significativos de 50-68% na matéria seca de raiz, 25-54% na matéria seca de folha e de 27% e 55% para o teor de fósforo na folha, quando a inoculação foi realizada com *Burkholderia* sp, e *Archomobacter* sp., respectivamente.

Dobbelaere et al. (2001) avaliaram o efeito da inoculação de algumas espécies de *Azospirillum* no crescimento de importantes culturas agrícolas e relataram um aumento significativo no peso seco da raiz e da parte aérea de plantas inoculadas, resultando em um melhor desenvolvimento e produtividade da planta.

Bactérias associadas a raízes de plantas de batata doce foram isoladas e testadas quanto à capacidade de promover o crescimento de tubérculos de batata. Todos os isolados testados promoveram um aumento significativo no comprimento de folha e raiz, assim como na massa seca e fresca em comparação com plantas não inoculadas (DAWWAM et al., 2013).

3.3. Importância do fósforo (P)

Depois do nitrogênio, o fósforo (P) é o nutriente mais limitante para o desenvolvimento das plantas (BARROTI; NAHAS, 2000). Este elemento constitui cerca de 0,2% do peso seco das plantas, participa de várias funções importantes como metabolismo de energia, fotossíntese, respiração, fixação do nitrogênio, regulação de enzimas, movimento de nutrientes dentro da planta e transferência de características genéticas (DNA) (VIRUEL, 2014). O fósforo é um elemento essencial para o estabelecimento e desenvolvimento, pois melhora todo o sistema radicular e, conseqüentemente, a parte aérea (GONÇALVES et al., 2000). Sua deficiência causa redução do crescimento e da produção, menor perfilhamento, comprometimento da floração e da granação das espigas e atraso na maturação (NAHAS, 1991).

A planta adquire fosfato da solução do solo, predominantemente nas formas HPO_4^{2-} , quando em pH menor que 7,2, e H_2PO_4^- quando em pH maior que 7,2

(WAKELIN et al., 2004). No entanto, na solução do solo a concentração de fósforo é geralmente muito baixa (2 a 5 μm); deste modo, a absorção de P é um processo ativo que acontece contra um forte gradiente de concentração, tendo em vista que, no citoplasma, deve-se manter uma concentração entre 5 e 10 Mm (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Segundo Nahas (1991), o Brasil apresenta um dos solos mais velhos do mundo, contendo altos teores de componentes que retêm fósforo, competindo assim com as raízes da planta. Os solos agricultáveis contêm uma grande reserva de fósforo, devido a aplicações regulares. Contudo, uma larga proporção do fósforo inorgânico na forma solúvel é rapidamente absorvido pelo solo logo após a aplicação de adubos fosfatados, tornando-se indisponível para a planta (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999; IGUAL et al., 2001). Cerca de 80% do fósforo aplicado no solo torna-se indisponível para as plantas, por ser imobilizado, adsorvido e/ou transformado em uma forma orgânica (GYANESHWAR et al., 2002). Os fenômenos de adsorção e precipitação que ocorrem no solo são geralmente dependentes do pH e do tipo de solo (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999).

Devido à alta exigência das plantas e à baixa disponibilidade no solo, esse nutriente é quase sempre muito limitante ao crescimento delas, sendo necessária a aplicação de grande quantidade desse elemento nas culturas; dessa forma, a adubação fosfatada torna-se bastante dispendiosa, além de acarretar problemas ambientais. Uma alternativa ao emprego do processo químico tradicional é a aplicação de fosfato de rocha natural, que representa um menor custo para a fertilização de plantas, especialmente em países onde a disponibilidade de materiais para a produção de fertilizantes fosfatados é limitado. No entanto, os fosfato de rocha são de solubilidade limitada, e sua disponibilidade para as plantas é reduzida comparada a outras formas de fosfato (HAYNES, 1984) e também dependente da espessura e da origem dos fosfatos; assim, os fosfatos de rocha de origem sedimentar podem ser mais solúveis que os fosfatos de origem ígnea e metamórfica (HAMMOND et al., 1986)

O mecanismo denominado de solubilização é uma alternativa para a transformação de fosfatos inorgânicos em fosfatos solúveis. Esse fenômeno ocorre principalmente devido à ação de alguns micro-organismos presentes no solo, como bactérias e fungos (NAHAS, 1991). O emprego de micro-organismos solubilizadores

de fosfato pode aumentar a quantidade de P prontamente disponível para a planta. Estes micro-organismos excretam ácidos orgânicos de baixo peso molecular que, por mecanismos de quelação e reações de troca, aumentam acentuadamente a concentração de P em solução (GERKE, 1992; GULATI et al. 2010). Dessa maneira, em solos, a solubilização de fosfatos por bactérias é responsável por frações que variam de 1 a 50% do total de fosfato disponível às plantas. A presença de micro-organismos solubilizadores de fósforo tem sido constatada na maioria dos solos investigados (JONES et al., 1991; NAHAS et al., 1994), bem como na superfície de sementes (KATZNELSON et al., 1962).

Mesmo a diversidade de bactérias solubilizadoras de fósforo presentes no solo sendo grande, os níveis populacionais geralmente são baixos, ocorrendo competição com outras bactérias comumente associada à rizosfera (IGUAL et al., 2001). Dessa forma, para que a quantidade de fósforo liberado por esses organismos seja suficiente para promover o crescimento vegetal, deve-se promover a inoculação desses micro-organismos em concentrações elevadas (VESSEY, 2003).

Devido ao potencial desses micro-organismos, vários estudos estão sendo realizados para avaliar a habilidade de diferentes espécies em solubilizar compostos fosfatados inorgânicos insolúveis, tais como fosfato tricálcico, fosfato dicálcio, hidroxiapatita e fosfato rochoso. Entre os gêneros que são conhecidos com esta capacidade, estão as *Pseudomonas*; *Burkholderia*; *Rhizobium*; *Agrobacterium*; *Azotobacter* e *Erwinia* (GOLDSTEIN et al., 1999; RODRIGUEZ et al., 2000; VERMA et al., 2001). A utilização de micro-organismos solubilizadores de fósforo é uma alternativa viável ao uso da adubação convencional para melhorar o aproveitamento do fósforo já existente no solo, representando um mecanismo de promoção de crescimento de plantas (SILVA FILHO; VIDOR, 2002).

Aumentos no crescimento de plantas e absorção de nutrientes como consequência da inoculação com bactérias solubilizadoras de fósforo foram relatadas em várias culturas. Em milho, Hameeda et al. (2008) testaram a habilidade de cinco linhagens de bactérias solubilizadoras de fósforo em promover o crescimento da planta. Estes autores obtiveram um aumento de 99% na matéria seca com a inoculação da linhagem EB 67 e 94% para a linhagem CDB 35 sob

condições de casa de vegetação; os mesmos autores verificaram um aumento de 85% e 64%, comparado ao tratamento controle (sem inoculação) na produção de grãos quando as sementes de milho foram tratadas com as linhagens EB 67 e CDB 35, respectivamente. A inoculação com *Bacillus megaterium*, *B. subtilis* e *Pseudomonas corrugata* resultou em aumento de 122,4%, 135,2% e 194,3%, respectivamente, no rendimento de grãos de milho comparado ao tratamento controle (KUMAR et al., 2007). A resposta de milho (*Zea mays* L.) à inoculação com bactérias solubilizadoras de fósforo foi verificada por (VIRUEL et al., 2014) sob condições controladas e condições de campo em Tucumán, na Argentina. Os autores constataram um aumento significativo na altura da planta de 45% e de 40% no peso seco da folha tratadas com *Pseudomonas tolaasii* IEXb.

A avaliação nutricional e o crescimento inicial de milho (*Zea mays* L.) em resposta à inoculação de bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio e solubilizadora de fosfato de rocha, em formulação simples ou mista, foi estudada por Baldotto et al. (2012) e os resultados mostraram que as plantas de milho que receberam as bactérias, tanto dizotróficas quanto as solubilizadoras de fosfato, apresentaram maiores teores foliares de nitrogênio e fósforo nas folhas e apresentaram características de crescimento mais elevadas.

Em arroz, a inoculação de sementes de arroz (variedade IR42) com *Azospirillum lipoferum* linhagem 34H promoveu aumento na massa fresca e seca de folha e no conteúdo de fósforo na planta (MURTY; LADHA, 1988). Aumentos na comprimento de folha e raiz, bem como na matéria seca e no teor de fósforo, foram observados em plantas de feijão mungo (*Vigna radiata* [L.] Wilczek) tratadas com as bactérias solubilizadoras *Pantoea agglomerans* e *Burkholderia anthina* (WALPOLA; MIN-HO, 2013).

Selvakumar et al. (2011) avaliaram o efeito do tratamento de sementes de trigo variedade VL 8040 com *Pseudomonas lurida* linhagem MR2H3 em solos não esterilizado e constataram que plantas tratadas com a bactéria obtiveram um aumento de 47,5% e 13,3% no comprimento de raiz e parte aérea, respectivamente, em comparação com o controle (não inoculado), além do aumento de 26,31%, 40% e 47,16% no teor de nitrogênio, potássio e fósforo, respectivamente. Já Babana e Antoun (2005) verificaram que a inoculação de *Pseudomonas* sp. BR2 em sementes

de trigo proporcionou um aumento de 128% no rendimento de matéria seca de raiz e melhorou a emergência de sementes.

3. 4. Importância do nitrogênio (N)

O nitrogênio é um nutriente essencial ao crescimento, desenvolvimento e produção das plantas, é fundamental para a vida devido à sua participação em moléculas essenciais aos processos vitais como os ácidos nucléicos, proteínas, polissacarídeos, entre outros (NOVOA; LOOMIS, 1981; XU et al., 2012).

Apesar do nitrogênio ser o nutriente mais abundante dos elementos do ar atmosférico (aproximadamente 77% por volume), os animais e as plantas não são capazes de metabolizá-lo na forma gasosa e retirá-lo diretamente do ar. A obtenção de nitrogênio da atmosfera requer a quebra de uma ligação tripla covalente que existe entre dois átomos, para produzir amônia (NH_3) ou nitrato (NO_3^-) (TAIZ; ZEIGER, 2013); para isso é necessário o fornecimento de temperatura e pressão muito elevadas (fixação industrial), processo que consome muita energia e não é economicamente viável.

O nitrogênio é um nutriente absorvido em grande quantidade pelas plantas, devendo estar disponível em alta concentração no solo (POTTKER, 2000). É considerado um dos principais fatores limitantes ao rendimento de grãos de milho e o que mais onera custo de produção da cultura (ARAÚJO et al., 2004). Sabe-se, por exemplo, que a adubação nitrogenada representa cerca de 40% do custo total de produção da cultura do milho (BARROS NETO, 2008).

Na maioria dos solos tropicais, a produção das culturas é severamente limitada pela deficiência de nitrogênio, o que as torna dependentes da aplicação de adubos nitrogenados sintéticos (BERLAMINO et al., 2003). As doses de nitrogênio indicadas para a cultura do milho podem alcançar valores superiores a 150 Kg.ha^{-1} segundo Amado et al. (2002), valor que pode variar conforme a quantidade de matéria orgânica presente no solo e cultivar utilizada (DALLA SANTA et al., 2004).

Grande parte dos fertilizantes nitrogenados adicionados ao solo é volatilizada, consumida por bactérias quimiolitotróficas (que voltam a reduzir o nitrato, liberando

óxido nitroso e óxido nítrico na atmosfera) ou lixiviada, sendo levada pela água até o lençol freático, contaminando-o, e o excesso pode chegar a rios e lagoas e causar a eutrofização destes ambientes (LEWIS et al., 1984).

Desta forma, a fixação biológica do nitrogênio (FBN), processo pelo qual o nitrogênio atmosférico é transformado em NH_3 biologicamente útil para os organismos, aparece como uma alternativa de acentuada importância no suprimento de nitrogênio para as culturas e para o manejo sustentável dos solos (HUNGRIA et al., 2000; GLIESSMAN, 2001). Este processo é realizado na natureza apenas por um seleto grupo de procariotos, bactérias capazes de fixar o nitrogênio do ar e o fazem graças a complexos enzimáticos denominados nitrogenase (BALDANI et al., 2002), sendo que a reação pode ocorrer à temperatura ambiente e pressão atmosférica, o que ocorre graças a um sistema enzimático apropriado (REIS et al., 2006). Para espécies vegetais como o milho, a fixação biológica do nitrogênio proporciona um acréscimo de 20 a 30% na aquisição deste elemento (MOREIRA et al., 2010). Estima-se que a fixação biológica do nitrogênio contribua com 65% da entrada anual de nitrogênio na terra, enquanto que a produção industrial contribui com 24% e a fixação não biológica com cerca de apenas 10% (HUNGRIA et al., 2001).

Dentre os organismos fixadores de nitrogênio encontrados em associações com gramíneas, as espécies do gênero *Azospirillum* constituem um dos grupos mais estudados (CACERES, 1982). Este grupo de bactéria ganhou grande destaque mundial a partir da década de 1970, com a descoberta realizada pela pesquisadora da Embrapa Dra. Johanna Döbereiner, em seu primeiro trabalho com bactérias diazotróficas, realizado em 1953, no qual relatou pela primeira vez a ocorrência de bactérias do gênero *Azotobacter* em solos ácidos. Até então, já se conhecia o potencial de espécies deste gênero em fixar nitrogênio atmosférico, porém só haviam sido isoladas em solos do continente Europeu e Asiático. Döbereiner e Ruschel (1958), após cinco anos isolaram e descreveram a bactéria *Beijerinckia fluminensis* da rizosfera da cana de açúcar em solos tropicais, demonstrando o potencial dos diazotróficos em associação com gramíneas. Em 1975, Döbereiner e Day descobriram a capacidade de fixação biológica do nitrogênio no gênero *Spirillum*, posteriormente nomeado para *Azospirillum* (TARRAND et al., 1978).

Segundo Döbereiner e Day (1976), *Azospirillum* spp. compreende bactérias diazotróficas de vida livre, amplamente encontradas em solos de clima tropical e subtropical, são encontradas em associação com as raízes de gramíneas de grande importância econômica como milho, arroz, trigo e diversas forrageiras, além de outras espécies de vegetais. De 30 a 90% das amostras de solo coletadas, em todo o mundo, contêm *A. brasilense* ou *A. lipoferum*. O *Azospirillum* spp. colabora para a nutrição de plantas, seja através de fixação biológica do nitrogênio ou através da produção de hormônio vegetais que atuam no aumento do sistema radicular pela produção de substâncias promotoras de crescimento, aumentando não apenas o número de radículas, mas também o diâmetro das raízes laterais e adventícias, ampliando assim o volume de solo explorado e promovendo, conseqüentemente, ganhos em rendimento (OKON; VANDERLEYDEN, 1997).

Pesquisas sobre melhor entendimento da interação *Azospirillum* spp. “versus” planta estão sendo desenvolvidas de modo a alcançar a eficiência do uso de bactérias diazotróficas em associação com diversas culturas.

3.5. Benefícios da inoculação com *Azospirillum brasilense*

Como dito anteriormente, bactérias do gênero *Azospirillum* são fixadores de nitrogênio de vida livre e são encontrados em estreita associação com as raízes das plantas. Elas são capazes de exercer efeitos benéficos sobre o crescimento das plantas e melhorar o rendimento sob uma variedade de condições ambientais (OKON; VANDERLEYDEN, 1997). Além da capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico, podem sintetizar fitohormônios (CASSÁN et al., 2011), atuar na solubilização de fosfato inorgânico (VERMA et al., 2001) e estimular o desenvolvimento do sistema radicular (LAMBRECHT et al., 2000).

Resultados positivos da associação entre *Azospirillum* spp. em milho têm sido demonstrado em vários trabalhos, sendo que a inoculação, na maioria dos casos, promoveu aumento na produção de grãos, matéria seca, rendimentos de grãos, germinação de sementes e acúmulo de nitrogênio nas plantas (OKON; LABANDERA-GONZÁLEZ, 1994; SALOMONE; DÖBEREINER, 1996; BODDEY;

DÖBEREINER, 1988; NUR et al., 1980; FALLIK; OKON, 1996). O sucesso da inoculação pode estar diretamente relacionado com a especificidade da interação entre espécies ou genótipos de plantas e as espécies ou estirpes das bactérias, assim como fatores relacionados ao ambiente (HUNGRIA, 2011; BRACCINI et al., 2012). Muñoz-Garcia et al. (1991) constataram aumento da ordem de 54 a 86% na matéria seca de raízes, e de 23 a 64% no peso seco da parte aérea, quando sementes de milho do híbrido (UAP 77) foram inoculadas com *A. brasilense*.

Efeitos positivos da inoculação de *Azospirillum* spp., associada ou não a doses de adubação nitrogenada, foram constatados em importantes culturas. Em milho, Costa et al. (2015) constataram que os tratamentos que receberam inoculante apresentaram maior crescimento em altura (9,5% e 16%), biomassa seca do colmo (49% e 6,75%) e biomassa seca da raiz (123% e 97%), para inoculante aplicado via semente ou pulverizado, respectivamente. Araújo et al. (2015) avaliaram o efeito da inoculação com *A. brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na produtividade, parâmetros fitoquímicos e nutricionais de milho, e concluíram que a fertilização nitrogenada associada à inoculação de *A. brasilense* e *H. seropedicae* influenciou positivamente no rendimento de grãos, matéria seca de folha, peso da espiga, diâmetro da espiga, número de grãos por espiga, conteúdo de clorofila e teor de nitrogênio, potássio e zinco das folhas.

Mais benefícios foram relatados ao avaliar o desenvolvimento e produtividade do milho, em resposta à inoculação com *A. brasilense* em dois genótipos de milho, cultivados em anos, locais e manejos diferentes. Neste estudo, constatou-se que na ausência da aplicação do nitrogênio em cobertura a inoculação promoveu incremento de 7,2% na massa seca de parte área e de 15,4% e 7,4% na produção de grãos no primeiro e segundo ano do experimento, respectivamente (LANA et al., 2012). Em trigo, verificou-se um aumento significativo no rendimento de grãos, quando a inoculação de *Azospirillum* (RAM-7) foi associada a 100% da dose recomendada de nitrogênio, enquanto o tratamento que recebeu apenas a inoculação aumentou em apenas 7,4% (DALLA SANTA, 2004).

Dartora et al. (2013) avaliaram as respostas da cultura do milho obtida na fase reprodutiva e vegetativa, decorrente da inoculação de *A. brasilense* e *H. seropedicae* associada à adubação nitrogenada e constataram que a inoculação combinada das

estirpes proporcionou incrementos de 12% na matéria seca de parte aérea e 7% na produtividade em relação à testemunha, indicando benefícios da combinação de bactérias diazotróficas. Aumento médio de 17% na produtividade foi observado por Cavallet et al. (2000), quando as sementes foram inoculadas com *Azospirillum* spp. associada com a aplicação de nitrogênio em cobertura. Enquanto que, para sementes do híbrido (DKB 390 YG) de milho inoculadas com *A. brasilense*, observou-se um acréscimo de 9,4% na produtividade (KAPPES et al., 2013).

Estudo avaliando a promoção de crescimento decorrente da aplicação de fertilização com fósforo associado a inoculação de *A. brasilense* e *H. seropedicae* foi realizado por Inagaki et al. (2014), e os resultados mostraram que a inoculação com *A. brasilense* e *H. seropedicae* aumentou em 52% a matéria seca de raiz, 42% o volume de raiz e 25% a altura de plantas de milho híbrido (30F53H), indicando que a aplicação das bactérias proporcionou aumento na solubilização do fósforo, ou melhor, a sua melhor utilização pelo sistema radicular, enquanto a inoculação de sementes com *A. brasilense*, associada à fertilização de fósforo, aumentou em 23% o conteúdo de clorofila das folhas.

Salomone e Döbereiner (1996), estudando a resposta de vários genótipos de milho decorrente da inoculação de quatro estirpes de *Azospirillum* spp. isoladas na Argentina e três de raízes de sorgo e milho isoladas no Brasil, constataram aumento de peso de grãos, variando em diferentes genótipos, da ordem de 1.700 a 7.300 kg ha⁻¹; entretanto, segundo os autores, os resultados são muito influenciados pelas condições de solo, ambiente e genótipos de planta.

A qualidade fisiológica de sementes de milho dos híbridos simples AG7098 e 2B707, e das variedades sintéticas experimentais, V2 e V4 inoculadas com *A. brasilense*, foi avaliada por Pereira et al. (2015). Segundo os autores, os híbridos foram responsivos à inoculação para massa de matéria seca de raiz e os genótipos diferem em relação à inoculação com *A. brasilense*.

Ensaio desenvolvidos pela Embrapa Soja, testando diferentes estirpes de *A. brasilense* e *A. lipoferum* em milho e trigo, demonstraram que a inoculação com *A. brasilense* proporcionou incrementos de 24 a 30% no rendimento de grãos da cultura do milho em relação ao controle (sem inoculação), resultando na

identificação das primeiras estirpes autorizadas para a produção de inoculantes comerciais no Brasil (HUNGRIA et al., 2010).

Entretanto, resultados divergentes quanto aos benefícios ocasionados pela inoculação com *A. brasilense* também são encontrados na literatura. Campos et al. (2000), avaliando o inoculante a base de *Azospirillum* spp. na cultura do milho em condições de campo, não encontraram diferenças estatísticas para as variáveis: número de plantas, número de espigas, estatura de plantas e rendimento de grãos. Resultados semelhantes para a produtividade do milho verde foram verificados por Domingos Neto et al. (2013), decorrentes da inoculação com *A. brasilense* estirpe Ab-V5 e Ab-V6. Para a mesma cultura, Rodrigues et al. (2014) não constataram efeito positivo da inoculação na produção de grãos de trigo. O benefício da inoculação com bactérias diazotróficas depende de fatores como genótipo da planta, estirpes selecionadas, inter-relação entre ambos e o meio ambiente (SALA et al., 2007).

A otimização dessa possível simbiose *Azospirillum* spp-milho poderá resultar em incrementos de produtividade e em diminuição dos custos de produção, principalmente na aquisição de adubos nitrogenados que são usados intensamente na cultura do milho (OKON; VANDERLEYDEN, 1997).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Plantio

O ensaio foi realizado em condições de casa de vegetação localizada no Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, FCAV-UNESP, Jaboticabal-SP. Quatro sementes de milho (*Zea mays* L.) do híbrido comercial 2B707 PW (Dow Agro Sciences) foram semeadas em vasos plásticos de 12 dm³ preenchidos com LATOSSOLO VERMELHO Eutrófico típico (EMBRAPA, 2006) de textura argilosa,

(55g de argila Kg⁻¹ de solo). A caracterização química do solo, na camada de 0-20 cm, foi determinada segundo metodologia de Van Raij e Quaggio (1983) (Tabela 1).

Uma semana após a emergência, foi realizado o desbaste, deixando-se 2 plantas por vaso. Todas as plantas receberam diariamente irrigação uniforme, para manter 70% da capacidade de campo, e foram mantidas sob regime de luz natural em temperatura média foi 25± 2°C.

Tabela 1: Composição química do solo obtida anterior a implantação do experimento.

Prof.	pH	MO	P (resina)	Ca	K	Mg	H+Al	SB	T	V
(cm)	(CaCl ₂)	g dm ⁻³	mg dm ⁻³			mmol _c dm ⁻³				%
0-20	5,9	9	20	28	11,2	6	16	45,2	61,2	74

4.2. Adubação

Todas as plantas receberam 350 kg/ha de NPK (20-0-20) como fertilizante de base, e os tratamentos recebidos foi nitrogênio em cobertura, aplicado 30 dias após a emergência, sendo a ureia (45% de N) fonte deste macronutriente. Para os tratamentos que receberam a adubação fosfatada, aplicou-se no momento da semeadura 98 kg/ha de apatita de Araxá, que pertence ao grupo das fluorapatitas, de baixa solubilidade e lenta assimilação.

4.3. Isolado e preparo do inóculo

Foi utilizada a linhagem Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense* obtido a partir da formulação líquida de um produto comercial denominado Qualyfix Gramínea (Brasilquímica) e o isolado denominado S11 (solubilizador de fósforo), o qual foi obtido da rizosfera de um Latossolo Vermelho Escuro com milho, selecionado por solubilizar fosfato de cálcio *in vitro* em ensaios anteriores (dados não mostrados). Os

isolados encontram-se estocado em tubos de ensaios contendo meio BDAL (batata, dextrose, extrato de levedura e ágar) segundo Kucey (1983) e mantido sob refrigeração a 4°C no Laboratório de Microbiologia do Solo da FCAV/UNESP de Jaboticabal.

Para a utilização nos ensaios, 0,2 mL de cada bactéria foi inoculado em erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de caldo nutriente com pH 7,0 e foram mantidos em BOD a 28° C por 24 horas. Após esse período, procedeu-se à homogeneização das amostras; as suspensões foram diluídas em água destilada esterilizada e as concentrações ajustadas em 1×10^7 e 3×10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) mL⁻¹ das bactérias S11 e *A. brasilense*, respectivamente.

4.4. Inoculação

Com o auxílio de uma pipeta, aplicou-se uniformemente 20 mL da suspensão contendo cada bactéria sobre o solo, paralelo às sementes no momento da semeadura. O tratamento controle recebeu 20 mL de água destilada esterilizada. Já para o tratamento com a inoculação conjunta de *A. brasilense* e S11 foi aplicado sobre o solo um volume igual de 10 mL de cada suspensão bacteriana com suas respectivas concentrações.

4.5. Avaliação

4.5.1. Determinação da altura e matéria seca da planta

As plantas foram colhidas após 60 dias de cultivo, quando se avaliou a altura (cm), medindo-se da superfície do solo até o ápice da planta, com o auxílio de uma trena. As plantas de todos os tratamentos foram recolhidas e seccionadas em folhas e raiz, lavadas três vezes com água deionizada, acondicionadas em sacos de papel,

identificadas e levadas à estufa de circulação forçada de ar a $65\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 72 h, para posterior pesagem.

4.5.2. Análises microbiológicas e química do solo

O solo foi coletado da rizosfera em quatro pontos aleatórios, sendo as amostras reunidas em amostra compostas, peneiradas em peneira de malha de 2mm. As amostras, totalizando 200g, foram divididas em duas partes, sendo a primeira mantida em sacos plásticos à temperatura de 4°C até o momento de utilização para contagem de bactérias totais, determinação de umidade e matéria orgânica e a segunda seca ao ar e conservada em temperatura ambiente (28°C) para determinação do fósforo solúvel, nitrogênio total e carbono da biomassa microbiana.

4.5.2.1. Análises microbiológicas do solo

4.5.2.1.1. Contagem de bactérias totais

Para a contagem de bactérias totais, amostras de 10g de solo rizosférico úmido foram adicionadas em erlenmeyers de 250 mL contendo 95 mL de solução de pirofosfato 0,1% (p/v) e submetidas à diluição em série, de acordo com o método proposto por Wollum (1982) até a concentração de 10^{-4} . Para isso, 1 mL da suspensão de cada solo foi transferido para tubo de ensaio 18 x 180 mm, contendo 9 mL de solução de pirofosfato de sódio e deste tubo para outro com o mesmo volume da solução de pirofosfato de sódio, até atingir a diluição desejada. Alíquotas de 0,1 mL da diluição (10^{-4}) de cada amostra foi transferida para placas de Petri contendo 20 mL do meio de Bunt e Rovira (1955), pH 7,4. Em seguida, as placas contendo o inóculo microbiano foram mantidas em BOD a 30°C por 72 horas e, após este período, realizou-se a contagem do número de colônias existentes, conforme Vieira e Nahas (2005), com auxílio de uma lupa com aumento de 6 vezes.

4.5.2.1.2. Carbono da biomassa microbiana

Para a determinação do carbono da biomassa microbiana utilizou-se o método de irradiação-extração, adaptando o método proposto por Islam e Weil (1998) e Ferreira, Camargo e Vidor (1999), que consiste na utilização de energia eletromagnética (micro-ondas) para promover o rompimento celular e liberar os composto intracelulares para posterior extração e quantificação do carbono.

Foram pesados 10 g de solo seco em erlenmeyers de 250 mL, sempre em duas amostras, uma para ser irradiada e outra não irradiada (controle). A capacidade de retenção de água (CRA) das amostras foi ajustada em 70%. Uma parte das amostras foi submetida a irradiação, de acordo com o tempo previamente calculado, de acordo com as equações (1 e 2).

$$\text{Equação 1: } P = \frac{C_p \times K \times \Delta t \times m}{t}$$

Sendo:

P= Potência real do aparelho de micro-ondas em W;

C_p= 1,0 J. ml⁻¹. °K⁻¹, capacidade térmica da água;

K= 4,184, fator de correção de Caloria m⁻¹. K⁻¹ para Watt (J.S⁻¹);

ΔT= Variação de temperatura da água em 2 minutos de exposição, em °C;

m= 1000 g, massa de água, em grama;

t= 120 s, tempo de exposição da água a radiação do micro-ondas

Em seguida determinou-se o tempo de exposição das amostras à irradiação do micro-ondas, usando a fórmula:

$$\text{Equação 2: } t = \frac{r \times m_t}{P}$$

Sendo:

t= tempo de exposição das amostras à irradiação do micro-ondas;

r= 800 J. g⁻¹ de solo, quantidade de energia irradiada durante a exposição;

m_t= massa total das amostras a serem irradiadas;

P= potência do aparelho em W

Em seguida, para a extração das amostras irradiadas e não irradiadas, foram adicionados 40 mL de solução extratora de sulfato de potássio 0,5 M e agitadas em agitador horizontal a 175 rpm durante 30 minutos. Após a agitação, as amostras permaneceram em repouso por 30 minutos e foram filtradas em papel de filtro, recolhendo-se o extrato que foi armazenado em câmara fria (7° C). Para a determinação, foi pipetado 10 mL de cada extrato filtrado em erlenmeyer de 125 mL, foram adicionados 2 mL de solução de dicromato de potássio 0,066M e 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após o resfriamento, foram adicionados 50 mL de água destilada e, novamente após o resfriamento, foram acrescentadas 4 gotas do indicador ferroin. A titulação foi realizada com solução de sulfato ferroso amoniacal 0,033M. Em cada avaliação foram feitas 4 provas em branco, sendo duas contendo todos os reagentes e 10 mL de dicromato de potássio (0,5M), e 2 apenas com os reagentes sem o sulfato de potássio.

Para a obtenção dos valores do carbono presente na biomassa microbiana utilizou-se a equação 3.

$$\text{Equação 3: } C_{\text{Irr, Nirr}} = \frac{(V_b - V_m) \times (\text{conc. sulfato ferroso}) \times 3 \times 100 \times (\text{volume extrator})}{(\text{volume extrato}) \times (\text{peso do solo})}$$

Onde:

V_b = média do volume gasto na titulação dos brancos;

V_m = média dos volumes gasto na titulação das amostras (triplicatas);

concen. sulfato ferroso= 0,03 M

3- resultado da relação entre o número de mols de Cr_2O_7^- que reage com Fe^{++} , multiplicado pelo número de mols de Cr_2O_7 que reage com Carbono, multiplicado pela massa atômica do Carbono (12).

1000= fator de conversão de unidades

volume extrator= 40 mL, volume de K_2SO_4 0,5 M utilizado na extração;

Volume do extrato= 10 mL, volume da alíquota do extrato titulada

peso do solo= 10 gramas

4.5.2.2. Análises química do solo

4.5.2.2.1. Determinação da umidade do solo

A determinação da umidade foi realizada utilizando-se um cadinho de porcelana, onde foram pesados 10 g de solo úmido, essas amostras foram colocadas em estufa a 105° C por 24 horas. Depois de retirado da estufa o cadinho foi imediatamente colocado em um dessecador com sílica indicadora de umidade. Pesou-se o cadinho mais a amostra seca. A umidade foi determinada pela diferença do valor do peso obtido da amostra úmida subtraindo o valor do peso seco da amostra seca multiplicado por 100, igual a porcentagem de umidade do solo.

$$U\% = \{ (m_{\text{solo úmido}} - m_{\text{solo seco}}) / m_{\text{solo úmido}} \} \times 100 \]$$

Onde:

U = umidade (%)

m = massa de solo (g)

4.5.2.2.2. Determinação da matéria orgânica do solo

O teor de matéria orgânica foi determinado pelo método de incineração, em que foram pesados 10 g de solo seco, em triplicata, nos cadinhos de porcelana com seus pesos já aferidos e foram acondicionados em mufla a 550°C por 24 horas. Após o resfriamento do cadinho, até aproximadamente 100° C, as amostras foram retiradas da mufla e mantidas em um dessecador com sílica indicadora de umidade no seu interior, seguida da pesagem do cadinho mais amostra após combustão. A matéria orgânica foi determinada pela diferença do peso obtido, ou seja, amostra seca, menos amostra após a combustão. Os teores foram expressos em (%) de matéria orgânica do solo.

4.5.2.2.3. Nitrogênio total Kjeldahl

O nitrogênio total foi determinado conforme proposto por Bremner e Mulvaney (1982). Pesou-se 1 g de solo seco em tubo de ensaio tipo Kjeldahl de 100 mL e adicionaram-se 1,1 g de mistura catalítica e 3,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, procedendo-se à digestão, por 3 horas. Após o resfriamento do frasco, completou-se com uma proveta o volume para 15 mL com água deionizada. Em seguida, procedeu-se a destilação. Adicionaram-se 20 mL de NaOH 10 M, iniciando-se a destilação do nitrogênio, recolhendo-se 30 mL em erlenmeyer de 50 mL, contendo, previamente pipetado, 5 mL de solução indicadora de ácido bórico. Em seguida, titulou-se o destilado com solução de ácido sulfúrico 0,02 M até a mudança de cor de verde para rosa. Em cada avaliação, fez-se um branco omitindo-se o solo. O teor de nitrogênio total foi calculado com base numa curva padrão determinada com solução de sulfato de amônia.

4.5.2.2.4. Fósforo solúvel

Para a determinação do fosfato solúvel, empregou-se o método de Watanabe e Olsen (1965). Foram pesados 0,6 g de solo seco e transferidos para um erlenmeyer de 125 mL. A extração das amostras foi realizada adicionando-se 12 mL de solução extratora de bicarbonato de sódio 0,5 M, pH 8,5. Agitou-se, por 30 minutos, em agitador horizontal, e filtrou-se em papel de filtro Whatman nº 40. O filtrado foi armazenado em câmara fria (7 °C) até o momento da determinação. Para isso, foram pipetados 2 mL do filtrado em tubo de ensaio 18 x 180 mm, adicionando a estes 0,2 mL de solução de ácido sulfúrico 5 M e 0,8 mL do “Reagente B” (descrito a seguir). Todos os tubos foram agitados e incubados em banho-maria, a 45 °C, por 20 minutos. Após incubação, a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 820 nm. Em cada avaliação, foi feito um branco com 2 mL de bicarbonato de sódio 0,5 M, pH 8,5, em substituição ao extrato de solo. Os cálculos foram efetuados com base numa curva padrão com solução de KH_2PO_4 , contendo 100 ug p/ml⁻¹.

Preparo do “Reagente A”: foram dissolvidos 12 g de molibdato de amônio em 250 mL de água destilada e 0,208 g de tartarato duplo de antimônio e potássio em 100 mL de água destilada. As duas soluções foram adicionadas juntamente com uma solução de 1000 mL de ácido sulfúrico 5 M (138,9 mL de ácido sulfúrico em água destilada q.s.p. 1000 mL). O volume foi ajustado para 2000 mL, homogeneizado e guardado na geladeira em frasco âmbar.

Preparo do “Reagente B”: dissolveram-se 1,056 g de ácido ascórbico em 200 mL do “Reagente A”, no momento do uso (solução não pode ser armazenada).

4.5.2.2.5. Solubilização de fosfato insolúvel em meio de cultura líquido

A atividade de solubilização de fluorapatita por *A. brasilense* e S11 foi determinada em frasco erlemeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido, com pH 7,0, contendo por litro: 0,1 g de NaCl, 1 g de NH_4Cl , 0,2 g de KCl, 0,1 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10g de glicose, 0,5 g de extrato de levedura (NAHAS et al., 1994), suplementado com 5 g L^{-1} de fluorapatita (Apatita de Araxá). A inoculação de cada isolado foi realizada pela transferência de 0,2 mL de uma suspensão obtida a partir de colônias crescidas por 24 horas em caldo nutriente na concentração de 1×10^7 UFC mL^{-1} . Após a inoculação, as culturas foram incubadas, sem agitação, a 28°C por 7 dias. Diariamente foram retirados 4 frascos de cada cultura bacteriana. Posteriormente, as soluções foram centrifugadas a 9000 rpm por 15 minutos e, no sobrenadante, determinou-se o teor de fosfato conforme procedimento descrito no item (4.5.2.2.6).

4.5.2.2.6. Determinação do fosfato solúvel

Para a determinação do fosfato solúvel utilizou-se a metodologia descrita por Ames (1966). Foram adicionados 0,1 mL do sobrenadante em tubos de ensaio 18 x 180 mm, adicionando a estes 1,5 mL de água destilada e 1,4 mL da solução R

(descrito a seguir). Todos os tubos foram agitados e incubados em banho-maria, a 45 °C, por 20 minutos. Após incubação, a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 820 nm. Os cálculos foram efetuados com base numa curva padrão com solução de KH_2PO_4 0,0002 mol L⁻¹.

Solução A: foram dissolvidos 10g de ácido ascórbico em 100mL de água deionizada.

Solução B: foi dissolvido 1,25g de molibdato de amônio em 30 mL de água deionizada. A esta solução foi acrescentado 7,3 mL de ácido sulfúrico concentrado e completou-se o volume para 300 mL.

Solução R: misturou-se a solução A e a solução B na proporção de uma parte de solução A para seis partes de solução B (no momento da determinação).

5. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento adotado foi em Blocos Casualizados (DBC), com os tratamentos arranjos em esquema fatorial (4x2x2). O primeiro fator correspondeu à inoculação no solo com bactérias: a) *A. brasilense* (AZ), b) isolado (S11), c) combinação de AZ+S11 e d) controle (sem inoculação); o segundo fator compreendeu: a) presença ou b) ausência de fertilização fosfatada e o terceiro fator: a) presença ou b) ausência de adubação nitrogenada em cobertura. Os experimentos foram realizados com cinco repetições, sendo cada repetição duplicada para minimizar o risco de perda de parcelas.

A análise de variância foi realizada pelo teste F, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados referentes à contagem de bactérias totais foram transformados em log (x). Para a execução das análises foi utilizado o programa Agroestat versão 1.0 (BARBOSA; MALDONADO, 2010).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Altura, matéria seca de raiz e folha das plantas de milho

A altura da planta e matéria seca de raiz não foram incrementadas pela inoculação de bactérias (I), adubação fosfatada (P) e nitrogenada em cobertura (N). Para a matéria seca de folha, observou-se aumento de 35% no tratamento com a inoculação da bactéria S11 e de 19,5% para a inoculação com *A. brasilense*, em relação ao controle. Quanto ao fator presença e ausência de adubação fosfatada e nitrogenada, o teste F não foi significativo para altura e matéria seca de raiz. Interações significativas foram verificadas entre a inoculação de bactérias e fertilização com fósforo (IxP) para altura e matéria seca de folha e interação entre a inoculação e adubação nitrogenada (IxN) para altura e matéria seca de raiz (Tabela 2).

A presença de fósforo, associado à inoculação de bactérias (AZ, S11 e AZ+S11) não incrementou a altura da planta, sendo estatisticamente igual ao controle (66,12 cm). No entanto, quando inoculado somente a bactéria *A. brasilense* (sem adubação), a altura das plantas foi 10,2% maior do que a observada no controle, diferindo significativamente de todos os tratamentos (Tabela 3). A altura das plantas diferiu ($p > 0,01$) quando houve a inoculação de *A. brasilense* associada à adubação fosfatada, comparando com a altura das plantas quando receberam a inoculação da mesma bactéria sem a adubação fosfatada (Tabela 3).

Tabela 2. Altura, matéria seca de raiz (MSR) e folha (MSF) de plantas de plantas de milho após 60 dias da semeadura em função dos fatores inoculação (I), adubação fosfatada (P) e adubação nitrogenada.

Inoculação (I)	Altura (cm) ^a	MSR (g planta ⁻¹) ^b	MSF (g planta ⁻¹) ^c
Controle ⁽¹⁾	67,68a	1,39a	1,29b
AZ ⁽²⁾	70,25a	1,46a	1,54ab
S11 ⁽³⁾	68,0 a	1,61a	1,74a
AZ+S11 ⁽⁴⁾	68,13a	1,60a	1,31b
Teste F	0,81 ^{ns}	2,33 ^{ns}	7,86**
D.M.S	0,26	0,26	0,28
Fósforo (P)			
Sem P	69,53a	1,55a	1,47a
Com P	67,53a	1,47a	1,37a
Teste F	2,30 ^{ns}	1,38 ^{ns}	7,16*
D.M.S	2,60	0,13	0,15
Nitrogênio (N)			
Sem N	68,93a	1,53a	1,60a
Com N	68,12a	1,50a	1,34b
Teste F	0,39 ^{ns}	0,20 ^{ns}	12,32**
D.M.S	2,60	0,14	0,15
Teste F (interações)			
IxP	8,76**	1,45 ^{ns}	3,65*
IxN	3,23*	4,64**	0,80 ^{ns}
PxN	0,23 ^{ns}	0,82 ^{ns}	2,93 ^{ns}
IxPxN	0,64 ^{ns}	0,97 ^{ns}	3,34*
C.V. (%)	7,54	18,21	20,55

^{a,b,c}Valores originais. Médias seguida pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo a 1% de probabilidade. * Significativo a 5% de probabilidade. ns: Não significativo, D.M.S: Diferença mínima significativa. C.V: Coeficiente de variação. ⁽¹⁾Não inoculado. ⁽²⁾AZ: inoculado com *A. brasilense*. ⁽³⁾S11: inoculado com bactéria solubilizadora de fósforo. ⁽⁴⁾AZ+S11: inoculado com *A. brasilense* e bactéria solubilizadora de fósforo.

Tabela 3. Desdobramento da interação inoculação *versus* adubação fosfatada (lxP) para altura e matéria seca de folha (MSF) de plantas de milho após 60 dias da semeadura^a.

Tratamento	Altura (cm)		Teste F	MSF (g planta ⁻¹)		Teste F
	Sem P	Com P		Sem P	Com P	
Controle ⁽¹⁾	69,25Ab	66,12Aa	1,46 ^{ns}	1,41Abc	1,16Ab	2,69 ^{ns}
AZ ⁽²⁾	76,37Aa	64,12Ba	22,43**	1,80Aab	1,28Bab	11,44**
S11 ⁽³⁾	67,00Ab	69,12Aa	0,67 ^{ns}	1,86Aa	1,62Aa	2,46 ^{ns}
AZ+S11 ⁽⁴⁾	65,50Bb	70,75Aa	4,12*	1,22Ac	1,41Aab	1,53 ^{ns}
Teste F	6,93**	2,64 ^{ns}		8,17**	3,34*	

^aValores originais. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, ou minúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo a 1% de probabilidade. *Significativo a 5% de probabilidade. n.s: não significativo. ⁽¹⁾Não inoculado. ⁽²⁾AZ: inoculado com *A. brasilense*. ⁽³⁾S11: inoculado com bactéria solubilizadora de fósforo. ⁽⁴⁾AZ+S11: inoculado com *A. brasilense* e bactéria solubilizadora de fósforo.

Estudos mostram que a inoculação de bactérias associada à adubação fosfatada proporciona um melhor desenvolvimento da planta. A inoculação em conjunto de *Herbaspirillum seropedicae* (HIII 206) e *Burkholderia* sp. (UENF114111), combinada com aplicação de fosfato de rocha, melhorou significativamente a altura, número de folhas e matéria seca de parte aérea do milho (BALDOTTO et al., 2012). Inagaki et al. (2014) verificaram que a adubação com superfosfato simples, associada a inoculação de milho com *A. brasiliense* e *H. seropedicae* após 21 dias de cultivo, resultou em uma maior altura da planta comparado ao tratamento controle, divergindo do encontrado neste trabalho; no entanto, a fonte de fósforo utilizada neste estudo não foi a fluorapatita.

Para o teor de matéria seca de folha (MSF), a inoculação da bactéria S11 na presença ou ausência de adubação fosfatada promoveu um aumento significativo comparado com o tratamento controle. Entretanto, não houve um aumento significativo para o mesmo parâmetro analisado quando a bactéria inoculada foi o *A. brasilense* (Tabela 3).

Incrementos na matéria seca foliar podem permitir uma produção maior de biomassa e, conseqüentemente, maior produção (PEREIRA et al., 2015). A produção de matéria seca de parte aérea e raiz pode estar associada à produção de fito-hormônios como as auxinas, giberilinas e citocininas (MOREIRA et al., 2010). Walpola e Yoon (2013) constataram aumento na matéria seca de folha de feijão com a inoculação em conjunto de duas linhagens de bactérias solubilizadoras de fósforo quando na presença de fosfato tricalcicum. O tratamento das sementes de milho híbrido (Surabhi), com uma formulação à base de turfa e contendo as linhagens EB 67 e 35 CDB de bactérias solubilizadoras de fósforo, aumentou o comprimento da parte aérea, emergência de plântulas, matéria seca e produção de grãos de milho (HAMEEDA et al., 2008).

Contrariando nossos resultados para o aumento de matéria seca de folhas com a inoculação de *A. brasilense*, Reis Júnior et al. (2008) observaram um aumento na matéria seca de folha de milho inoculada com *A. amazonense* comparado ao tratamento não inoculado. Dartora et al. (2013) observaram que a combinação de estirpes Ab-V5 de *A. brasilense* e SmR1 de *H. seropedicae* proporcionou incrementos na matéria seca de parte área, no diâmetro basal do caule e rendimento de grãos de milho. Possivelmente, os resultados encontrados por estes autores foram conseqüências dos genótipos, linhagens de bactérias, associações de isolados e condições ambientais, diferentes das do presente estudo.

Para a altura da planta, a análise de variância demonstrou que, na ausência do nitrogênio, não houve diferença significativa entre os tratamentos, embora no tratamento com as bactérias em conjunto (AZ+S11) tenha havido um incremento na altura da planta (71,62 cm). Na presença do nitrogênio, apenas os tratamentos com *A. brasilense* e esta, combinada com S11, diferiram entre si (Tabela 4).

Avaliando o efeito da aplicação de *A. brasilense* em combinação com dose de nitrogênio de cobertura, Costa et al. (2015) obtiveram, após 60 dias de cultivo, um aumento de 11,2% na altura em relação ao controle. Dartora et al. (2013) e Lana et al. (2012) não obtiveram respostas para a altura de plantas inoculadas com *A. brasilense* associada à adubação nitrogenada, assim como os resultados obtidos no presente trabalho. Araújo et al. (2015) também não verificaram efeito para altura da planta, inserção da espiga, diâmetro do caule, comprimento da espiga, número e

peso de 1000 grãos para a inoculação com *A. brasilense* e *H. seropedicae* associada à adubação nitrogenada em cobertura.

Tabela 4. Desdobramento da interação inoculação *versus* adubação nitrogenada (lxN) para altura e matéria seca de raiz (MSR) de plantas de milho após 60 dias da semeadura^a.

Tratamentos	Altura (cm)		Teste F	MSR (g planta ⁻¹)		Teste F
	Sem N	Com N		Sem N	Com N	
Controle ⁽¹⁾	66,75Aa	68,62Aab	0,53 ^{ns}	1,18 Bb	1,60 Aa	8,89**
AZ ⁽²⁾	68,50Aa	72,00Aa	1,83 ^{ns}	1,53 Aab	1,40 Aa	0,99 ^{ns}
S11 ⁽³⁾	68,87Aa	67,25Aab	0,39 ^{ns}	1,70 Aa	1,52 Aa	1,60 ^{ns}
AZ+S11 ⁽⁴⁾	71,62Aa	64,62Bb	7,32**	1,71 Aa	1,48 Aa	2,64 ^{ns}
Teste F	1,22 ^{ns}	2,82*		6,25**	0,72 ^{ns}	

^aValores originais. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, ou minúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Significativo a 1% de probabilidade. *Significativo a 5% de probabilidade. n.s: não significativo. ⁽¹⁾Não inoculado. ⁽²⁾AZ: inoculado com *A. brasilense*. ⁽³⁾S11: inoculado com bactéria solubilizadora de fósforo. ⁽⁴⁾AZ+S11: inoculado com *A. brasilense* e bactéria solubilizadora de fósforo.

Considerando a matéria seca de raiz (MSR), aumentos de 44,1% e 45% em relação ao controle foram observados nos tratamentos inoculados com a bactéria S11 e inoculação conjunta (AZ+S11) ($p > 0,01$), respectivamente, na ausência de adubação nitrogenada. Não houve diferenças significativas ($p < 0,01$) para a inoculação de bactérias associada à adubação nitrogenada comparando-se com o tratamento controle (Tabela 4).

A aplicação no solo ou via semente de bactéria solubilizadora de fósforo foi relatada por melhorar a biomassa seca de raiz em importantes culturas (KHALAFALLAH et al., 1982). A aplicação de *A. brasilense*, via semente ou aplicação foliar, aumentou em 123% e 97%, respectivamente, a matéria seca de raiz (COSTA et al., 2015) e aumentos de 113,65 e 17,74% na matéria seca de raiz foram obtidos para as variedades de milho AG7098 e 2B707, respectivamente (PEREIRA

et al., 2015). A inoculação de sementes com *A. brasiliense* e *H. seropedicae* aumentou em 52% a matéria seca de raiz (INAGAKI et al., 2014). Em ensaio de campo, Hungria et al. (2010) verificaram que a inoculação com as linhagens AbV5 e Ab V6 de *A. brasiliense* foram mais efetivas no crescimento de raiz e produtividade de milho e trigo. Aumento na matéria seca do milho em resposta à inoculação pode ser atribuído aos estímulos fornecidos por bactérias diazotróficas devido à capacidade de produzir fitohormônios, estimulando o desenvolvimento da raiz, aumentando não apenas o número de radículas, mas também o diâmetro das raízes laterais e adventícias, resultando em alta capacidade de absorver água e nutrientes (SALOMONE; DÖBEREINER, 1996).

6.2. Contagem de bactérias totais, fósforo e nitrogênio total no solo

O número de unidade formadora de colônias de bactérias (UFC) no solo inoculado com a bactéria S11e quando associada à bactéria *A. brasilense* aumentou significativamente ($p > 0,01$) comparando-se com o controle (Tabela 5). A concentração de fósforo solúvel no solo no tratamento inoculado com a bactéria *A. brasilense* (180, 15 $\mu\text{g P g}^{-1}$ solo seco) diferiu significativamente dos demais tratamentos. Para o nitrogênio, os maiores valores (50 $\mu\text{g N g}^{-1}$ solo seco) foram verificados para a inoculação em conjunto de *A. brasilense* e S11 (Tabela 5).

Para a contagem de bactérias totais, as interações significativas foram verificadas para o fator inoculação *versus* adubação fosfatada (IxP) e inoculação *versus* adubação fosfatada *versus* adubação nitrogenada (IxPxN). Para o nitrogênio total no solo e o fósforo disponível, todas as interações foram significativas (Tabela 5).

Tabela 5. Número total de unidades formadora de colônia de bactérias (UFC), fósforo solúvel (P) e nitrogênio total (NT) no solo cultivado com milho após 60 dias da semeadura em função dos fatores inoculação (I), adubação fosfatada (P) e adubação nitrogenada (N).

Inoculação (I)	UFC ($n \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ solo seco) ^a	P ($\mu\text{g P g}^{-1}$ solo seco) ^b	NT ($\mu\text{g N g}^{-1}$ solo seco) ^c
Controle ⁽¹⁾	11,05b	129,62b	43,20b
AZ ⁽²⁾	10,46b	180,15a	38,86b
S11 ⁽³⁾	19,97a	130,79b	40,07b
AZ +S11 ⁽⁴⁾	17,96a	138,85b	50,32a
Teste F	16,27**	31,89**	8,30**
DM.S	0,15	15,91	6,71
Fósforo (P)			
Sem P	15,51a	127,63b	43,80a
Com P	14,21b	162,08a	42,42a
Teste F	4,37*	66,23**	0,61 ^{ns}
D.M.S	0,08	8,50	3,58
Nitrogênio (N)			
Sem N	14,81a	155,90 a	41,98a
Com N	14,90a	133,81b	44,24a
Test F	0,43 ^{ns}	27,29**	1,60 ^{ns}
D.M.S	0,08	8,50	3,58
Teste F (interações)			
IxP	4,16**	40,17**	6,42**
IxN	0,82 ^{ns}	33,58**	14,33**
PxN	1,07 ^{ns}	25,63**	9,69**
IxPxN	5,90**	36,76**	4,04*
C.V. (%)	2,27	11,67	16,55

^{a,b,c}Valores originais, mas análise estatística realizada com dados transformados em $\log(x)$ para número total de bactérias. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Significativo a 1% de probabilidade. *Significativo a 5% de probabilidade. n.s: não significativo. D.M.S: Diferença mínima significativa. C.V: Coeficiente de variação.

⁽¹⁾Não inoculado. ⁽²⁾AZ: inoculado com *A. brasilense*. ⁽³⁾S11: inoculado com bactéria solubilizadora de fósforo. ⁽⁴⁾AZ+S11: inoculado com *A. brasilense* e bactéria solubilizadora de fósforo.

Na presença e ausência de adubação fosfatada, os maiores valores numéricos para contagem de bactérias totais ocorreu para a inoculação com S11. O número de unidades formadoras de colônias de bactérias para o tratamento com a inoculação de *A. brasilense* não diferiu significativamente do controle na presença e ausência da adubação fosfatada, bem como a inoculação do *A. brasilense* e S11 na ausência da adubação fosfatada (Tabela 6).

Tabela 6. Desdobramento da interação inoculação *versus* adubação fosfatada (IxP) para o número total de unidades formadora de colônia de bactérias (UFC), no solo cultivado com milho após 60 dias da semeadura^a.

Tratamento	UFC (n x 10 ⁶ g ⁻¹ solo seco)		Teste F
	Sem P	Com P	
Controle ⁽¹⁾	7,01 Ab	6,96 Ab	0,43 ^{ns}
AZ ⁽²⁾	7,12 Aab	6,78 Bb	17,54**
S11 ⁽³⁾	7,25 Aa	7,29Aa	0,26 ^{ns}
AZ+S11 ⁽⁴⁾	7,22 Aab	7,23Aa	0,02 ^{ns}
Teste F	3,61*	17,27**	

^aMédias em valores originais, mas a análise estatística realizada com dados transformados em log (x). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, ou minúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo a 1% de probabilidade. *Significativo a 5% de probabilidade. n.s: não significativo. ⁽¹⁾Não inoculado. ⁽²⁾AZ: inoculado com *A. brasilense*. ⁽³⁾S11: inoculado com bactéria solubilizadora de fósforo. ⁽⁴⁾AZ+S11: inoculado com *A. brasilense* e bactéria solubilizadora de fósforo.

Walpola e Yoon (2013) verificaram que a maior população de bactérias ($8,36 \times 10^6$ UFC g⁻¹ solo) foi registrado em solos inoculados com bactérias solubilizadoras quando na presença de fósforo. Segundo Moda et al. (2014), as populações de bactérias e fungos do solo não foram alteradas pela utilização de fosfato de Araxá, fosfato de Bayóvar, superfosfato triplo e fosfato de Cuba. Diferente do obtido no presente estudo Inagaki et al. (2015), verificaram que a inoculação de *A. brasilense*, linhagem Ab-V5, resultou em aumento na quantidade de bactérias no solo de milho.

Os maiores valores numéricos de fósforo solúvel (237,53 e 227,67 µg P g⁻¹ solo seco) foram obtidos no tratamento inoculado com *A. brasilense* na presença de fósforo (Tabela 7) e na ausência de adubação nitrogenada (Tabela 8). Na ausência de adubação fosfatada e na presença de adubação nitrogenada, a concentração de fósforo solúvel não diferiu entre os demais tratamentos (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7. Desdobramento da interação inoculação *versus* adubação fosfatada (lxP) para o fósforo solúvel (P) e nitrogênio (N) no solo cultivado com milho após 60 dias da semeadura^a.

Tratamento	P (µg P g ⁻¹ solo seco)			N (µg N g ⁻¹ solo seco)		
	Sem P	Com P	Teste F	Sem P	Com P	Teste F
Controle ⁽¹⁾	124,22Aa	135,02Ab	1,63 ^{ns}	47,88Aa	38,51Bbc	6,90*
AZ ⁽²⁾	122,77Ba	2 37,53Aa	184,02**	43,02Aab	34,69Bc	5,45*
S11 ⁽³⁾	128,80Aa	132,78Ab	0,22 ^{ns}	35,38Bb	44,76Aab	6,90*
AZ+S11 ⁽⁴⁾	134,73Aa	142,98 Ab	0,95 ^{ns}	48,93Aa	51,71Aa	0,61 ^{ns}
Teste F	0,81 ^{ns}	71,25**		5,99**	8,73**	

^aValores originais. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, ou minúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

**Significativo a 1% de probabilidade.*Significativo a 5% de probabilidade. ns: não significativo. ⁽¹⁾Não inoculado. ⁽²⁾AZ: inoculado com *A. brasilense*. ⁽³⁾S11: inoculado com bactéria solubilizadora de fósforo. ⁽⁴⁾AZ+S11: inoculado com *A. brasilense* e bactéria solubilizadora de fósforo.

Tabela 8. Desdobramento da interação inoculação *versus* adubação nitrogenada (lxN) para fósforo (P) e nitrogênio (N) no solo cultivado com milho após 60 dias da semeadura^a.

Tratamento	P ($\mu\text{g P g}^{-1}$ solo seco)		Teste F	N ($\mu\text{N g}^{-1}$ solo seco)		Teste F
	Sem N	Com N		Sem N	Com N	
Controle ⁽¹⁾	129,12 Ab	130,12 Aa	0,01 ^{ns}	151,70 Aa	34,69 Bc	22,72**
AZ ⁽²⁾	227,67 Aa	132,62 Ba	126,25**	35,04 Bb	42,68 Abc	4,58**
S11 ⁽³⁾	133,08 Ab	128,50 Aa	0,29 ^{ns}	32,95 Bb	47,19 Aab	15,91**
AZ+S11 ⁽⁴⁾	133,73 Ab	143,98 Aa	1,47 ^{ns}	48,23Aa	52,40 Aa	1,36 ^{ns}
Teste F	64,11**	1,37 ^{ns}		13,78**	8,84**	

^aValores originais. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, ou minúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. **Significativo a 1% de probabilidade. n.s: não significativo. ⁽¹⁾Não inoculado. ⁽²⁾AZ: inoculado com *A. brasilense*. ⁽³⁾S11: inoculado com bactéria solubilizadora de fósforo. ⁽⁴⁾AZ+S11: inoculado com *A. brasilense* e bactéria solubilizadora de fósforo.

A inoculação de bactérias solubilizadoras de fósforo na presença de fosfato de rocha proporcionou os maiores valores de fósforo disponível no solo comparado com o tratamento controle (LINU et al., 2009). Walpola e Yoon (2013) constataram que a aplicação em conjunto de *Pontoea agglomerans* e *Burkholderia anthina* com fosfato tricalcicum proporcionou o maior valor (201, 25 mg Kg⁻¹ solo) de fósforo no solo.

Para a concentração de nitrogênio total, os maiores valores numéricos encontrados foram observados nos tratamentos que receberam a inoculação mista de *A. brasilense* + S11, seguido pelo tratamento que recebeu a bactéria S11, na presença de adubação fosfatada (Tabela 7) e nitrogenada em cobertura (Tabela 8). A inoculação mista de bactéria solubilizadora de fósforo *Pseudomonas chlororaphis* e fixadora de nitrogênio *Arthrobacter pascens* resultou em altas concentrações de fósforo disponível e nitrogênio no solo (XUAN et al. 2012).

6.3. Matéria orgânica, umidade e carbono da biomassa microbiana do solo

A matéria orgânica (M.O) e umidade do solo não apresentaram diferença significativa para os fatores inoculação (I), adubação fosfatada (P) e nitrogenada em cobertura (N). Para o teor de matéria orgânica no solo, foi verificadas interações significativas ($p > 0,05$) entre os fatores inoculação *versus* adubação fosfatada (Tabela 9).

O carbono da biomassa microbiana (C.B.M) foi significativamente influenciado pela inoculação de bactérias (I), adubação fosfatada (P) e nitrogenada (N). O teor de carbono obtido no tratamento S11 ($41,56 \mu\text{g C g}^{-1}$ solo seco) e Az+S11 ($38,76 \mu\text{g C g}^{-1}$ solo seco) não diferiram entre si ($p < 0,01$), mas em relação ao controle observa-se redução de 88,2 % e 96,5%, respectivamente (Tabela 9). Apesar do aumento verificado no número de bactérias totais nos tratamentos S11 e AZ +S11 quando associado a adubação fosfatada (Tabela 6), não foi observado esse aumento no valor de carbono da biomassa microbiana, ao contrário disso, os teores de carbono da biomassa foram menores para os tratamentos que receberam a inoculação microbiana. Assim, a diferença verificada entre aumento na contagem de bactérias total e diminuição da CBM poderia ser explicada pois a primeira análise quantifica apenas o número de bactérias, já a segunda considera o carbono de todos os micro-organismos presentes na amostra de solo. Logo, pode ter ocorrido um aumento do número de bactérias, mas uma diminuição do número total de micro-organismos.

A adubação com fluorapatita causou uma redução significativa ($p > 0,05$) no carbono da biomassa (Tabela 9). Possivelmente devido ao fato da apatita de Araxá ser insolúvel e de lenta e gradual liberação do fósforo (ARAÚJO; MELO, 2012). Fertilizantes inorgânicos são usados principalmente para aumentar a disponibilidade de nutrientes para as plantas (MARSCHNER et al., 2003), no entanto, podem afetar a população, composição e causar mudanças nas comunidades do solo (YUAN, 2013).

A adubação nitrogenada em cobertura proporcionou um incremento significativo ($p < 0,05$) no carbono da biomassa microbiana, $70,88 \mu\text{g g}^{-1}$ de C no solo, (Tabela 9).

Tabela 9. Matéria orgânica (M.O), umidade e carbono da biomassa microbiana (C.B.M), de solo cultivado com milho em função dos fatores inoculação (I), adubação fosfatada (P) e adubação nitrogenada (N).

Inoculação (I)	M.O (g 100g solo) ^a	Umidade (%) ^b	C.B.M ($\mu\text{g C g}^{-1}$ solo seco) ^c
Controle ⁽¹⁾	11,51a	17,88a	78,21a
AZ ⁽²⁾	11,43a	19,43a	78,20a
S11 ⁽³⁾	11,67a	17,91a	41,56b
AZ+S11 ⁽⁴⁾	11,41a	18,53a	38,76b
Teste F	0,53 ^{ns}	2,43 ^{ns}	5,90**
D.M.S	0,59	1,75	34,07
Fósforo (P)			
Sem P	11,40a	18,72a	70,10a
Com P	11,61a	18,15a	48,26b
Teste F	1,72 ^{ns}	1,47 ^{ns}	5,82*
D.M.S	0,31	0,93	18,20
Nitrogênio (N)			
Sem N	11,39a	18,05a	47,55b
Com N	11,62a	18,33a	70,80a
Teste F	2,07 ^{ns}	2,80 ^{ns}	6,59*
D.M.S	0,31	0,93	18,20
Teste F (interações)			
IxP	3,78*	0,44 ^{ns}	7,11**
IxN	0,37 ^{ns}	0,92 ^{ns}	3,41*
PxN	2,89 ^{ns}	0,01 ^{ns}	2,42 ^{ns}
IxPxN	0,27 ^{ns}	1,57 ^{ns}	8,03**
C.V. (%)	5,49	10,12	61,19

^{a,b,c}Valores originais. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo a 1% de probabilidade. *Significativo a 5% de probabilidade. ns: não significativo. D.M.S: Diferença mínima significativa. C.V: Coeficiente de variação. ⁽¹⁾Não inoculado. ⁽²⁾AZ: inoculado com *A. brasilense*. ⁽³⁾S11: inoculado com bactéria solubilizadora de fósforo. ⁽⁴⁾AZ+S11: inoculado com *A. brasilense* e bactéria solubilizadora de fósforo.

A inoculação de *A. brasilense*, associada à adubação fosfatada, proporcionou incremento significativo ($p < 0,01$) no teor de matéria orgânica do solo ($11,92 \mu\text{g C g}^{-1}$ solo seco), quando comparado à inoculação da bactéria na ausência de fósforo (Tabela 10). Possivelmente, esse aumento pode ser devido ao papel desempenhado pelo fósforo na divisão celular e desenvolvimento de novos tecidos (HAMEEDA et al. 2008), na transferência e utilização de energia pelas plantas (VIRUEL et al., 2014) e na constituição de vários compostos vitais ao metabolismo dos vegetais (FORNASIERI FILHO, 1997), estimulando o crescimento do sistema que, posteriormente, foi decomposta por micro-organismos do solo.

Tabela 10. Desdobramento da interação inoculação *versus* adubação fosfatada (IxP) para matéria orgânica (M.O) e carbono da biomassa microbiana (C.B.M) de solo cultivado com milho^a.

Tratamento	M.O (g 100g solo seco)		Teste F	C.B.M ($\mu\text{g C g}^{-1}$ solo seco)		Teste F
	Sem P	Com P		Sem P	Com P	
Controle ⁽¹⁾	11,36Aa	11,66Aa	0,86 ^{ns}	78,91Aab	77,50Aa	0,01 ^{ns}
AZ ⁽²⁾	10,94Ba	11,92Aa	9,64**	122,59Aa	122,59Aa	24,03**
S11 ⁽³⁾	11,64Aa	11,69Aa	0,03 ^{ns}	52,13Abc	52,13Abc	1,36 ^{ns}
AZ+S11 ⁽⁴⁾	11,66Aa	11,16Aa	2,53 ^{ns}	26,77Ac	26,77Ac	1,75 ^{ns}
Teste F	2,24 ^{ns}	2,08 ^{ns}		10,23**	2,78 ^{ns}	

^aValores originais. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, ou minúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo a 1% de probabilidade. n.s.: Não significativo. ⁽¹⁾Não inoculado. ⁽²⁾AZ: inoculado com *A. brasilense*. ⁽³⁾S11: inoculado com bactéria solubilizadora de fósforo. ⁽⁴⁾AZ+S11: inoculado com *A. brasilense* e bactéria solubilizadora de fósforo.

A associação da adubação nitrogenada com *A. brasilense* não promoveu um aumento no teor de carbono (Tabela 11). Diferente do obtido neste estudo, Treseder (2008) constatou aumento da biomassa microbiana em função da aplicação de nitrogênio, provavelmente devido à multiplicação em número de células dos micro-organismos decorrente do fornecimento de nitrogênio. Chu et al. (2007) observaram aumento no carbono da biomassa decorrente da aplicação de nitrogênio, concluindo

que o aumento da biomassa pode ser devido ao aumento da biomassa da raiz e maior produção de exsudato decorrente do fornecimento da fertilização. Ao avaliar o efeito da fertilização nitrogenada sobre o carbono da biomassa microbiana, Li et al. (2013), verificaram aumento de 46,23% no carbono da biomassa na camada de (0-1cm) de solo, decorrente da aplicação de ureia como fonte de nitrogênio.

Tabela 11. Desdobramento da interação inoculação *versus* adubação nitrogenada (IxN) para o carbono da microbiana (C.B.M) de solo cultivado com milho^a.

Tratamento	CBM ($\mu\text{g C g}^{-1}$ solo seco)		Teste F
	Sem N	Com N	
Controle ⁽¹⁾	85,95Aa	70,45Aab	0,73 ^{ns}
AZ ⁽²⁾	45,09Bab	111,31Aa	13,38**
S11 ⁽³⁾	31,00Ab	52,13Ab	1,36 ^{ns}
AZ+S11 ⁽⁴⁾	28,18Ab	49,31Ab	1,36 ^{ns}
Teste F	4,33**	4,98**	

^aValores originais. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, ou minúscula na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. **Significativo a 1% de probabilidade. n.s.: Não significativo. ⁽¹⁾Não inoculado. ⁽²⁾AZ: inoculado com *A. brasilense*. ⁽³⁾S11: inoculado com bactéria solubilizadora de fósforo. ⁽⁴⁾AZ+S11: inoculado com *A. brasilense* e bactéria solubilizadora de fósforo.

6.4. Concentração de fosfato solúvel em meio de cultura líquido

A concentração de fósforo solúvel no meio de cultivo variou de 7,08 a 13,56 $\mu\text{g/g P mL}^{-1}$ para *A. brasilense* e de 7,08 a 274,16 $\mu\text{g/g P mL}^{-1}$, para S11 (Figura 1). A concentração máxima de fósforo para S11 foi verificado após 168 horas e para *A. brasilense* após 120 horas de incubação. A partir de 24 horas de incubação

verificou-se que a produção de fósforo por S11 foi significativamente maior que *A. brasilense*, perdurando-se até 168 horas (Figura 1).

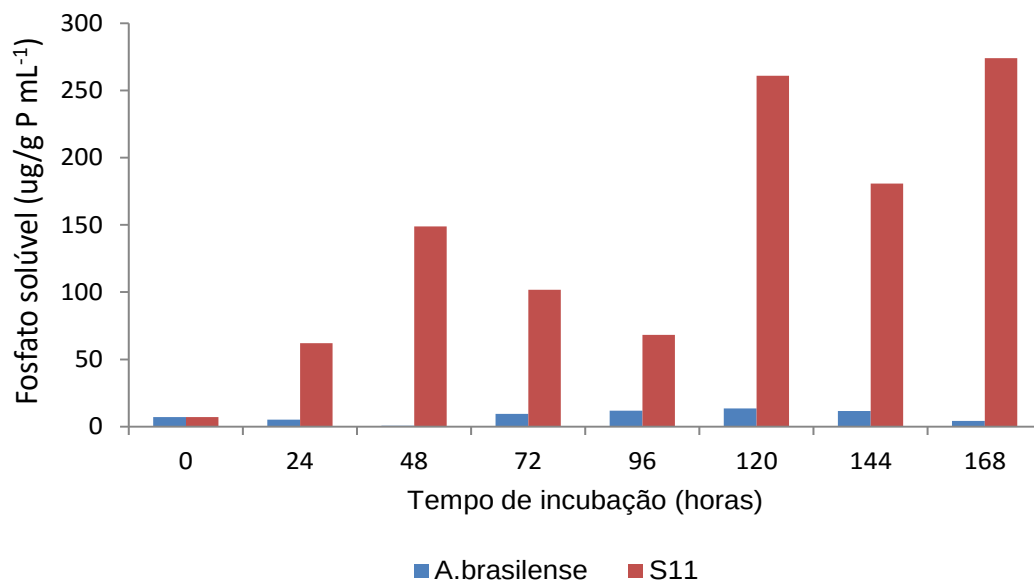


Figura 1. Concentração diária de fosfato solúvel em meio de cultura suplementado com fluorapatita e inoculado com *Azospirillum brasilense* e bactéria (S11) durante 7 dias.

Os fosfatos inorgânicos insolúveis podem ser transformados em fosfatos solúveis através de um mecanismo denominado de solubilização (NAHAS, 1991). A solubilização de fosfato em meio sólido pode ser avaliada pela formação de um halo transparente ao redor da colônia, em contraste com o meio opaco (KANG et al., 2002) ou pela solubilização de fosfato em meio líquido adicionado de fontes insolúveis desse elemento (KUMAR; BEHL; NARULA, 2001).

Segundo Oteino et al. (2015), a solubilização de fosfato é um dos principais mecanismos de promoção de crescimento vegetal realizado por bactérias associadas a plantas. Esse fenômeno tem sido atribuído a inúmeros mecanismos, muitas vezes interdependentes como o crescimento do micro-organismo, a produção de ácidos e a diminuição de pH (BARROSO; NAHAS, 2005). Vários fatores influenciaram a capacidade de solubilização desses micro-organismos, como tipo de fosfato a ser solubilizado (NAHAS, 1996; BARROTI; NAHAS, 2000), a fonte de

carbono e nitrogênio disponível (NAUTIYAL, 1999) e o tipo de planta cultivada (GRAYSTON; CAMPBELL, 1995).

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que o grau de solubilização de fosfato variou com o tipo de micro-organismo envolvido. Resultado semelhante foi verificado por Grupta et al. (2007) ao analisar a capacidade de solubilização de fosfato de rocha e fosfato tricalcium por bactérias e fungos. Os autores constataram que, de um total de 253 bactérias e 62 fungos isolados a partir de solo de mina e de manganês, apenas 19 bactérias e 12 fungos foram capazes de solubilizar fósforo.

A habilidade em solubilizar fosfato de rocha de Araxá, fosfato de Gafsa e fosfato de Patos de Minas por isolados de bactérias e fungos foi estudada por Nahas et al. (1996). Os autores constataram que, dentre as bactérias avaliadas, *Pseudomonas cepacia* foi a mais eficiente na solubilização, enquanto que a maior atividade de solubilização foi observada para a inoculação do fungo *Penicillium purpurogenum* e *P. implicatum*.

Souchie et al. (2005), ao avaliar a capacidade e a eficiência de solubilização de Apatita de Araxá, CaHPO_4 , AlPO_4 e em meio líquido, por quatro isolados de bactérias solubilizadoras da família *Enterobacteriaceae*, constataram um aumento de cerca de 1,3 e 13 vezes no fósforo solúvel em meio líquido incubado com AlPO_4 e apatita de Araxá, respectivamente. Bactérias isoladas de treze solos foram testadas por Nahas et al. (1994) quanto à capacidade de solubilização de fosfato insolúvel em meio de cultura líquido. Os autores verificaram que o teor de fósforo solúvel variou de 609 a 1291 $\mu\text{g/mL}$, e que apenas cinco bactérias produziram teores de fósforo superior 1000 $\mu\text{g/m}$. Segundo Silva Filho e Vidor (2000), o crescimento, a capacidade e o potencial de solubilização dos micro-organismos variam tanto entre os isolados testados quanto entre as fonte de fósforo avaliadas.

7. CONCLUSÕES

- A bactéria S11 é solubilizadora de fluorapatita em meio de cultivo
- No milho a matéria seca de folha foi incrementada pela inoculação da bactéria (S11) associada ou não a adubação fosfatada. Já a matéria seca de raiz foi favorecida pela inoculação de *A. brasilense* isolada ou associada a bactéria (S11) (AZ+S11), quando na ausência de adubação nitrogenada.
- No solo a contagem de unidades formadoras de colônia de bactéria foi incrementada pela inoculação da bactéria (S11) isolada ou associada com *A. brasilense* (AZ+S11), quando na presença de adubação fosfatada, enquanto a aplicação de *A. brasilense* associada a adubação fosfatada e ausência de adubação nitrogenada aumentou o teor de fósforo solúvel.
- A associação *A. brasilense* e bactéria (S11) (AZ+S11), na planta foi efetiva apenas para a matéria seca de raiz, quando aplicada na ausência de adubação nitrogenada. No solo essa associação de bactérias favoreceu a contagem de bactéria totais e o nitrogênio total quando na presença de adubação fosfatada e nitrogenada.
- A adubação com fluorapatita afeta o desempenho de *A. brasilense*.

8. REFERÊNCIAS

ACEVEDO, E.; GALINDO- CASTAÑEDA.; PRADA, F.; NAVIA, M.; ROMERO, H. M. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Colombia. **Applied Soil Ecology**, Netherlands, v. 80, n.1, p. 26-33, 2014.

AMADO, T. J. C.; MIELNICZUK, K. J.; AITA, C. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema de plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa MG, v. 26, n.1, p. 241-248, 2002.

AMES, B. N. Assay of inorganic phosphate and phosphatases. **Methods in Enzymology**, Maryland Heights, v. 8, p. 115-116, 1966.

ARAÚJO, L. A. N.; FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P. Adubação nitrogenada na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 8, p. 771-777, 2004.

ARAÚJO, A. S. F.; MELO, W. J. Biomassa microbiana do solo. Teresina: Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí, 2012.150 p.

ARAÚJO, E. O.; MERCANTE, F. M.; VITORINO, A. C. T. Effect of nitrogen fertilization associated with inoculation of *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* on corn. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 10, n. 3, p. 137-145, 2015.

ARRUDA, L.; BENEDUZI, A.; MARTINS, A.; LISBOA, B.; LOPES, C.; BERTOLO, F.; PASSAGLIA, L. M. P.; VARGAS, L. K. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul state (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, Netherlands, v. 63, p. 15-22, 2013.

BABANA, A. H.; ANTOUN, H. Biological system for improving the availability of Tilemsi phosphate rock for wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivated in Mali. **Nutrient cycling in agroecosystems**, Dordrecht, v. 72, n.2, p. 147-157, 2005.

BALDANI, J. I.; REIS, V. R. S.; Teixeira, K. R. S.; BALDANI, V. L. D. Potencial Biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: SERAFINE, L.A., BARROS, N.M., AZEVEDO, J.L. (Org). **Biotechnologia**: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p. 195-232.

BALDOTTO, L. E. B., BALDOTTO, M. A., OLIVARES, F. L., VIANA A.P., SMITH, R. B. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, n. 2, p. 349-360, 2010.

BALDOTTO, L. E. B.; SILVA, L. G. Jr. dos S.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; BALDOTTO, M. A. Initial growth of maize in response to application of rock phosphate, vermicompost and endophytic bacteria. **Revista Ceres**, Viçosa MG, v. 59, n. 2, p. 262-270. 2012.

BARBOSA, J.C.; MALDONADO JR., W. **AgroEstat**: sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos. Versão 1.0. Jaboticabal: Departamento de Ciências Exatas, 2010.nahas

BARROS NETO, C. R. de. Efeito do nitrogênio e da inoculação de sementes com *Azospirillum brasiliense* no rendimento de grãos de milho. 2008. 29f. Monografia. Trabalho de Graduação em Agronomia – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, 2008.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. **Applied Soil Ecology**, Netherlands, v. 29, n.1, p. 73-83, 2005.

BARROTI, G.; NAHAS, E. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 10, p. 2043-2050, 2000.

BELARMINO, M. C. J.; PINTO, J. C.; ROCHA, G. P.; FURTINI NETO, A. E.; MORAIS, A. R. Altura de perfilho e rendimento de matéria seca de capim-tanzânia em função de diferentes doses de superfosfato simples e sulfato de amônio. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n. 4, p. 879-885, 2003.

BODDEY, R. M.; DOBEREINER, J. Nitrogen-fixation associated with grasses and cereals: Recent results and perspectives for future research. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 108, n.1, p. 53-65. 1988.

BRACCINI, A. de L.; DAN L.G.de M.; PICCINI, G.G.; ALBRECHT L.P.; BARBOSA, M.C.; ORTIZ, A.H.T. Seed Inoculation with *Azospirillum brasilense*, Associated with the Use of Bioregulators in Maize. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 25, n.2, p. 58-64, 2012.

BRANCOURT-HULMEL, M.; DOUSSINAULT, G.; LECOMTE, C.; BÉRARD, P.; LE BUANEC, B.; TROTTET, M. Genetic improvement of agronomic traits of winter wheat cultivars released in France from 1946 to 1992. **Crop Science**, Madison, v. 43, n. 1, p. 37-45, 2003.

BREMNER, J. M.; MULVANEY, C. S. Nitrogen-total. In: PAGE, A. L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D. R. (Eds.). **Methods of Soil Analysis**: Chemical and microbiological properties. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p. 595-624.

BUNT, J. S.; ROVIRA, A. D. Microbiological studies of some subantartic soils. **Journal of Soil Science**, Oxford, v. 6, n.1, p. 119-128, 1955.

CÁCERES, E. A. R. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. American Society for Microbiology. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 44, n. 4, p. 990-991, 1982.

CAMPOS, B. H. C.; THEISEN, S.; GNATTA, V. Avaliação do inoculante “graminante” na cultura de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.3, n.4, p.713-715, 2000.

CANTARELLA, H. Calagem e adubação do milho. In: BULL, L. T.; CANTARELLA, H. **Cultura do milho: Fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Potafos, 1993. p. 1-10.

CASSÁN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; LUNA, V. Basic and technological aspects of phytohormone production by microorganisms: *Azospirillum* sp. as a model of plant promoting rhizobacteria. In: MAHESHWARI, D. K. (Ed.). **Bacteria in Agrobiolology: plant nutriente management**. Berlim, p. 141-182, 2011.

CASTRO, R. O.; CORNELO, H. A. C.; RODRIGUEZ, L. M.; BUCIO, J. L. The role of microbial signals in plant growth and development. **Plant Signaling & Behavior**, Philadelphia, v. 4, n. 8, p. 701-712, 2009.

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

CHU, H.; LIN, X.; FUJII, T.; MORIMOTO, S.; YAGI, K.; HU, J.; ZHANG, J. Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, n.11, p. 2971-2976, 2007.

CONAB - **Acompanhamento de safra brasileira:** grãos quinto levantamento. Fevereiro de 2016. Brasília, 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_02_04_11_21_34_boletim_gaos_fevereiro_2016_ok.pdf>. Acesso em: 26 de fev. 2016.

COSTA, R. R. G. F.; QUIRINO, G. da S. F.; NAVES, D. C. de F.; SANTOS, C. B.; ROCHA, A. F. de S. Efficiency of inoculation with *Azospirillum brasilense* on the growth and yield of second-harvest maize. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 45, n. 3, p. 304-311, 2015.

DALLA SANTA, O. R.; HÉRNANDEZ, R. F.; ALAVREZ, G. L. M.; JUNIOR, P. R.; SOCCOL, C. R. *Azospirillum* sp. Inoculation in Wheat, Barley and Oats Seeds Greenhouse Experiments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 6, p. 843-850, 2004.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 10, p. 1023-1029, 2013.

DAWWAM, G. E.; ELBELTAGY, A.; EMARA, H. M.; ABBAS, I. H.; HASSAN, M. M. Beneficial effect of plant growth promoting bactéria isolated from the roots of potato plant. **Annals of Agricultural Sciences**, Cairo, v. 58, n. 2, p. 195-201, 2013.

DEY, K. B. Phosphate solubilizing organisms in improving fertility status. In: SEN, S. P.; PALIT, P. (Ed.). **Biofertilizers: potentialities and problems**. Calcutta: Plant Physiology Forum, 1988, p. 237–248.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHS, A.; THYS, A.; PTACEK, D. et al. Responses of agronomically importante crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 28, n. 9, p. 871-879, 2001.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Washington, v. 22, n.2, p. 107-149, 2003.

DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A. P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, Lisboa, v. 1, p. 261-272. 1958.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. *Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION*, 1., 1976, Washington. Proceedings... 1976, v.2, p. 518-538.

DOMINGOS NETO, F. J.; YOSHIMI, F. K.; GARCIA, R. D.; MIYAMOTO, Y. R.; DOMINGUES, M. C. S. Desenvolvimento e produtividade do milho verde safrinha em resposta à aplicação foliar com *Azospirillum brasilense*. **Enciclopédia. Biosfera**, Goiânia, v. 9, n.17, p. 1030-1040, 2013.

DOTTO, A. P.; LANA, M. C.; STEINER, F.; FRANDOLOSO, J. F. Maize yield in response to *Herbaspirillum seropedicae* inoculation under different nitrogen levels. **Brazilian Journal Agricultural Research**, Brasília, v. 5, p. 376-382, 2010.

DUARTE, J. de O.; CRUZ, J. C.; GARCIA, J. C.; MATTOSO, M. J. **Economia da produção e utilização de milho**. 6.ed. Sete Lagoas: Embrapa: CNPMS, 2010.

EGAMBERDIYEVA, D. The effect of plant growth promoting bactéria on growth and nutriente uptake of maize in two diferente soils. **Applied Soil Ecology**, Netherlands, v. 36, n. 2-3, p. 184-189, 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Embrapa). Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa-SPI, 2006.

FALLIK, E.; OKON, Y. The response of maize (*Zea mays*) to *Azospirillum* inoculation in various types of soils in the field. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, London, v. 12, n. 5, p. 511-515. 1996.

FÉRNANDEZ, L.; AGARAS, B.; ZALBA, P.; WALL, L. G.; VALVERDE, C. *Pseudomonas spp.* isolates with high phosphate-molibdênio potential and root colonization properties from agricultural bulk soils under no-till management. **Biology and Fertility of Soils**, Heidelberg, v. 48, p. 763-773, 2012.

FERREIRA, A. S.; CAMARGO, F. A. O.; VIDOR, C. Utilização de microondas na avaliação da biomassa microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 23, n. 6, p. 991-996, 1999.

FORNASIERI FILHO, D. **Manual da cultura do milho**. Jaboticabal: FUNEP, 2007. 576p.

FOULKES, M. J.; HAWKESFORD, M. J.; BARRACLOUGH, P. B.; HOLDSWORTH, M. J.; KERR, S.; KIGHTLEY, S.; SHEWRY, P. R. Identifying traits to improve the nitrogen economy of wheat: recent advances and future prospects. **Field Crops Research**, Netherlands, v. 114, n. 3, p.329–342, 2009.

MÔRO, G. V.; FRITSCHÉ-NETO, R. Importância e usos do milho no Brasil. In: GALVÃO, J. C. C.; BORÉM, A.; PIMENTEL, M. A. **Milho do Plantio à Colheita**. Viçosa: UFV, 2015. p. 9-25.

GERKE, J. Phosphate Aluminum, and Iron in the Soil Solution of Three Different Soils in Relation to Varying Concentration of Citric Acid. Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde, Weinheim, v. 155, p. 339-343, 1992.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, n. 2, p. 109-117, 1995.

GLIESSMAN, S.R. **Agroecology**: ecological process in sustainable agriculture. Boca Raton: Lewis Publishers, 2001. 357p.

GOLDSTEIN, A. H.; BRAVERMAN, K.; OSORIO, N. Evidence for mutualismo between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 30, p. 295-300, 1999.

GONÇALVES, J. J. M.; SANTARELLI, E.; MORAES NETO, P. MANARA, M. P. Produção de mudas de espécies nativas: substrato, nutrição, sombreamento e fertilização. In: GONÇALVES, J. L. M.; BENEDETTI, V. **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: IPEF, 2000. p. 310-350.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracelular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processses. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.37, n.3, p. 395-412, 2005.

GRAYSTON, S.; CAMPBELL, C. D. Functional biodiversity of microbial communities in the rhizospheres of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and Sitka spruce (*Picea sitchensis*), **Tree Physiology**, Oxford, v. 16, n. 11-12, p. 1031-1038, 1995.

GRUPTA, N.; SABAT, J.; PARIDA, R.; KERKATTA, D. Solubilization of tricalcium phosphate and rock phosphate by microbes isolated from chromite, iron and manganese mines. **Acta Botanica Croatica**, Zagreb, v. 66, n. 2, p. 197-204, 2007

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

GULATI, A.; SHARMA, N.; VYAS, P.; SOOD, S.; RAHI, P.; PATANIA, V.; PRASAD, R. Organic acid production and plant growth promotion as a function of phosphate solubilization by *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 isolated from the cold deserts of the trans-Himalayas. **Archives of Microbiology**, New York, v. 192, n.11, p. 975-983, 2010.

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J. POODEL, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 245, p. 83-93, 2002.

HAMEEDA, B.; HARINI, G.; RUPELA, O. P.; WANI, S.P.; REDDY, G. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. **Microbiological Research**, Jena, v. 163, n.2, p. 234-242, 2008.

HAMMOND, L. L.; CHIEN, S. H.; MOKWUNYE, A. U. Agronomic value of unacidulated and partially acidulated phosphate rocks indigenous to the tropics. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 40, p. 89-140, 1986.

HAYANES, R. J. Lime and phosphate in the soil plant -system. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 37, p. 249-315, 1984.

HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiolog**, New York, v. 60, n. 4, p. 579-598, 2010.

HERMAN, M. A. B.; NAULT, B. A.; SMART, C. D. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on bell pepper roduction and green peach aphid infestations in New York. **Crop Protection**, Oxford, v.7, n.6, p. 996-1002, 2008.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. A. O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MANERO, F. J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 32, n. 11-12, p. 1515-1528. 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; CHUEIRE, L.; MEGÍAS, M. Symbiotic effectiveness of fast-growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, Heidelberg, v. 33, n.5, p. 387-394, 2001.

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

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36p. (Documentos, 325).

IGUAL, J. M.; VALVERDE, A.; CERVANTES, E.; VELÁSQUEZ, E. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of update molecular techniques in their study, **Agronomie**, Paris, v. 21, n.6-7, p. 561-568, 2001.

INAGAKI, A. M.; GUIMARÃES, V. F.; RODRIGUES, L. F. O. S.; Da SILVA, M. B.; DIAMANTE, M. S.; RAMPIM, L.; MIORANZA, T. M.; DUARTE Jr. J. B. Phosphorus fertilization associated to inoculation of maize with diazotrophic bacteria. **African Journal of Agricultural Research**, Nigeria, v. 9, n. 48, p. 3480-3487, 2014.

INAGAKI, A. M.; GUIMARÃES, V. F.; LANA, M. do C.; KLEIN, J.; COSTA, A. C. P. R.; RODRIGUES, L. F. O. S.; RAMPIM, L. Maize initial growth with the inoculation of plant growth-promoting bacteria (PGPB) under different soil acidity levels. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore, v. 9, n. 4, p. 271- 280, 2015.

ISLAM, K. R.; WEIL, R. R. Microwave irradiation of soil for routine measurement of microbial biomass carbon. **Biology and Fertility of Soils**, Heidelberg v. 27, n. 4, p. 408-416, 1998.

JONES, D.; SMITH, B. F. L.; WILSON, M. J.; GOODMAN, B. A. Phosphate solubilizing fungi in a scottish upland soil. **Mycological Research**, Oxford, v. 95, n. 9, p. 1090-1093, 1991.

KANG, S. C.; HÁ, C.; LEE, T. G.; MAHESHWARI, D. K. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a soil -inhabiting fungus *Fomitopsis* sp. PS. 102. **Current Science**, Bangalore, v. 82, n. 4, p. 439-442, 2002.

KAPPES, C.; ARF, O.; ARF, M. V.; FERREIRA, J. P.; BEM, E. A. D.; PORTUGUAL, J. R.; VILELA, R. G. Inoculação de sementes com bactéria diazotrófica e aplicação de nitrogênio em cobertura e foliar em milho. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 527-538, 2013.

KATZNELSON, H.; PETERSON, E. A.; ROUATT, J. W. Phosphate dissolving microorganisms on seed and in the root zone of plants. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 40, n. 9, p. 1181-1186. 1962.

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

KHALAFALLAH, M. A.; SABER, M. S. M.; ABD-EL-MAKSOUND, H. K. Influence of phosphate dissolving bacteria on the efficiency of superphosphate in a calcareous soil cultivated with *Vicia faba*. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 145, n. 5, p. 455-459. 1982.

KHAN, A. G. Role of soil microbes in the rizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. **Journal of Trace Elements in Medicine in Biology**, Jena, v. 18. n. 4, p.355-364. 2005.

KLOEPPER, J. W. LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 39-43, 1989.

KUCEY, R. M. N. Phosphate –solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 63, n. 4, p. 671-678, 1983.

KUMAR, V.; BEHL, R. K.; NARULA, N. Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under greenhouse conditions. **Microbiological Research**, London, v. 156, n. 1, p. 87-93, 2001.

KUMAR, B.; TRIVEDI, P.; PANDEY, A. *Pseudomonas corrugata*: A suitable bacterial inoculant for maize grown under rainfed conditions of Himalayan region. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, n.12, p. 3093-3100. 2007.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; VANDE BROECK, A.; VANDERLEYDEN, J. Indole- 3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bactéria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, Oxford, v. 8, n.7, p. 298-300, 2000.

LANA, M. do C.; DARTORA, J.; MARINI, D.; HANN, J. E. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Revista Ceres**, Viçosa MG, v. 59, n. 3, p. 399-405, 2012.

LEWIS, W. M.; SAUNDERS, J. F.; CRUMPAKER, D. W.; BRENDHECKE, C. M. **Eutrophication and land use, Lake Dillon**. New York: Ecological Studies, 1984. v. 46, 202p.

LI, F.; LIU, M.; LI, Z.; JIANG, C.; HAN, F.; CHE, Y. Changes in soil microbial biomass and functional diversity with a nitrogen. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 1-6, 2013.

LINU, M. S.; STEPHEN, J.; JISHA, M. S. Phosphate solubilizing *Gluconacetobacter* sp., *Burkholderia* sp. and their potential interaction with Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.)Walp.). **International Journal of Agricultural Research**, New York, v. 4, n. 2, p. 79-87, 2009.

LUGTENBERG, B.; CHIN-A-WOENG, T.; BLOEMBERG, G. Microbe-plant interactions: principles and mechanism. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, Dordrecht, v. 81, n. 1-4, p. 373-383, 2002.

LUZ, W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. In: LUZ, W.C.; FERNANDES, J. M. C.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. (Ed). **Revisão anual de patologia de plantas (RAPP)**. Passo Fundo: Padre Berthier dos Missionários da Sagrada Família, 1996. v. 4, p. 1-49.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; CARNEIRO, N. T.; PAIVA, E. **Fisiologia do Milho**. Sete Lagoas: Embrapa CNPMS, 2002. 23p. (Circular Técnica, 22). Disponível em: <<https://docsagencia.cnptia.embrapa.br/milho/circul22.pdf>> Acesso em: 10 fev. 2016.

MARSCHNER, P.; KANDELER, E.; MARCHNER, B. Structure and function on the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 453-461. 2003.

MILHO. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/milho>>. Acesso em: 28 de fev. 2016.

MINORSKY, P. V. On the inside. **Plant Physiology**, Rockville v. 146, p. 323-324. 2008.

MODA, L. R.; PRADO, R. M.; GONZÁLES, L. C.; HERNÁNDEZ, A. R.; CAIONE, G. Solubilization of phosphorus sources associated with organic compound enriched with biofertilizer. **Agrociencia**, Montecillo, v. 48, n. 5, p. 489-500, 2014.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. Ed. Lavras: UFLA, 2006. 368p.

MOREIRA, F. M. S.; DA SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; DE CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v.1, n.2, p.74-99, 2010.

MUÑOZ-GARCIA, A.; CABALLERO-MELLADO, J.; VALDÉS, M. Promoción del crecimiento del maíz por cepas productoras de siderófos de *Azospirillum* y *Pseudomonas* fluorescentes. In: CONGRESO NACIONAL DE LA FIJACION BIOLOGICA DEL NITROGENO Y I ENCUENTRO IBEROAMERICANO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION DE NITROGENO, 3., 1991. Cuernavaca. **Anais...** Cuernavaca, México, 1991, 61p.

MURTY, M. G.; LADHA, J. K. Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydropnic conditions. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 108, n. 2, p. 281-285, 1988.

NAHAS, E. **Ciclo do fósforo**: transformações microbianas. Jaboticabal: FUNEP, 1991, 67p.

NAHAS, E.; CENTURION, J. F.; ASSIS, L. C. Micorganismos solubilizadores de fosfatos e produtores de fosfatases de vários solos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa MG, v. 18, p. 43-48, 1994.

NAHAS, E.; Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. **World Journal of Microbiology and Botechnology**, Dordrecht, v. 12, p. 567-572, 1996.

NAUTIYAL, C. K. An efficient microbiological growth médium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 170, 265-270, 1999.

NOVOA, R.; LOOMIS, R. S. Nitrogen And Plant Production. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 58, p.177-204, 1981.

NUR, I.; OKON, Y.; HENIS, Y. An increase in nitrogen content of *Setaria itálica* and *Zea mays* inoculated with *Azospirillum*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 26, n.4, p. 482-485, 1980.

OKON, Y.; LABANDERA- GONZÁLEZ, C. Agronomic aplications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 26, n.12, p. 1591-1601, 1994.

OKON Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **American Society for Microbiology**, Washington, v. 63, n. 7, p. 366-370, 1997.

OTEINO, N.; LALLY, R. D.; KIWANUKA, S.; LLOYD, A.; RYAN, D.; GERMANINE, K. J.; DOWLING, D. N. Plan rowth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne v.6, p.1-9, 2015.

PAVÃO, A. R.; FERREIRA FILHO, J. B. de S. Impactos Econômicos da introdução do milho Bt11 no Brasil: uma abordagem de equilíbrio geral inter-regional. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, Brasília, v. 49, n.1, p. 81-108, 2011.

PEDRAZA, R. O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 125, n. 1, p. 25-35, 2008.

PEREIRA, L. de M.; PEREIRA, E. de M.; REVOLTI, L. T. M.; ZINGARETTI, S. M.; MÔRO, G. V. Seed quality, chlorophyll content index and leaf nitrogen levels in maize inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 46, n. 3, p. 630-637, 2015.

PIÃO, C. G.; TANG, W. H.; CHEN, Y. X. Study on the biological activity of yield-increasing bacteria. **Chinese Journal Microbiology**, Oxford, v. 4, p. 55-62, 1992.

POTTKER, D. Recentes avanços no manejo químico do solo para a cultura do milho. In: SANDINO, I. E.; FRANCELLI, A. L. (Ed.). **Milho**. Estratégias de manejo para a região Sul. Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, 2000. p. 63-87.

REIS JÚNIOR, F. B.; MACHADO, C. T. de T.; MACHADO, A. T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 1, p. 1139-1146, 2008.

REIS, V. M.; O, A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. Fixação Biológica de Nitrogênio Simbiótica e Associativa. In: FERNANDES, M.S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 153-174.

RICHARDSON, A. E. Soil microorganisms and phosphorus availability. In: PANKHURST, C. E.; DOUBEAND, B. M.; GRUPTA, V. V. S. R. (Ed.). **Soil biota: management in sustainable farming systems**. Victoria, Australia: CSIRO, 1994, p. 50-62.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, New York, v. 17, n. 4-5, p. 319-339, 1999.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; SELMAN, G. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. **Journal of Biotechnology**, Netherlands, v. 84, p. 155-161, 2000.

RODRIGUEZ, L. F. O. S.; GUIMARÃES, V. F.; SILVA, M. B.; PINTO Jr, A. S.; KEIN, J. COSTA, A. C. P. R. Características agronômicas do trigo em função de *Azospirillum brasilense*, ácidos húmicos e nitrogênio em casa de vegetação. **Revista Brasileira Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, n. 1, p. 31-37, 2014.

SALA, V. M. R.; SILVEIRA, A. P. D. da; CARDOSO, E. J. B. N. Bactérias diazotróficas associadas a plantas não-leguminosas. In: SILVEIRA, A.P. da; FREITAS, S. dos S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: IAC, 2007. cap. 6, p. 97-116.

SALOMONE, G.; DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biology Fertility Soils**, New York, v.21, n. 3, p.193-196, 1996.

SALOMONE, I. E. G.; FUNES, J. M.; DI SALVO, L. P.; ESCOBAR-ORTEGA, J. S.; D' AURIA, F.; FERRANDO, L.; FERNANDEZ-SCAVINO, A. Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact of plant genotypes on rhizosphere microbial communities and field crop production. **Applied Soil Ecology**, Netherlands, v.61, p. 196- 204. 2012.

SELVAKUMAR, G.; JOSHI, P. SUYA, L. P.; MISHARA, P. K.; JOSHI, G. K.; BISHT, J. K.; BHATT, J. C.; GRUPTA, H. S. *Pseudomonas lurida* M2RH3 (MTCC9245), a psychrotolerant bacterium from the Uttarakhand Himalayas, solubilizes phosphate and promotes wheat seedling growth. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 27, n. 5, p. 1129-1135, 2011.

SHARMA, A.; SHANKHDHAR, D.; SHARMA, A.; SHANKHDHAR, S. C. Growth promotion of the rice genotypes by pgprs isolated from rice rhizosphere. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 14, n. 2, p. 505-517, 2014.

SILVA FILHO; G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa MG, v. 24, p. 311-319, 2000.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivo de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 6, p. 847-854, 2002.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; da Silva, E. M. R. Solubilização de fosfatos em meios sólidos e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1149-1152, 2005.

STAMENOV, D.; JARAK, M.; DURIC, S.; MILOSEV, D.; HAJNAL-JAFARI, T.; Plant growth promoting rhizobacteria in the production of English ryegrass. **Plant, Soil and Environment**, Prague, v. 58, n. 10, p. 477- 480, 2012.

SWEDRZYŃSKA, D.; SAWICKA, A. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on development and yielding of maize (*Zea mays* ssp. *Saccharata* L.) under different cultivation conditions. **Polish Journal of Environmental Studies**, Olsztyn, v. 9, n. 6, p-505-509, 2000.

TAIZ, L. ZEIGER, E. Assimilação de nutrientes minerais. In: TAIZ, L.; ZEIGER. E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 24, n.8, p. 976-980, 1978.

TRESEDER, K. K. Nitrogen additions and microbial biomass: a meta-analysis of ecosystem studies. **Ecology Letters**, United Kingdom, v. 11, p. 1111-1120, 2008.

USDA. **World agricultural production**. Washington, DC:USDA - Agency Reports, 2015. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain-corn-coarsegrains.pdf>>. Acesso em: 02 ago. 2015.

VAN RAIJ, B.; QUAGGIO, J. A. **Métodos de análises de solos para fins de fertilidade**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 1983. 31 p. (Boletim técnico, 81).

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; NIKOLAEVA, I. Simultaneous P- solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Heidelberg, v.71. p. 137-144, 2006.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, Netherlands, v. 91, n. 2-3, p. 127-141, 2001.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 255, n.2, p. 571-586, 2003.

VIEIRA, F. C. S.; NAHAS, E. Comparison of microbial numbers in soils by using various culture media and temperatures. **Microbiological Research**, Jena, v. 160, n. 2, p. 197-202, 2005.

VIRUEL, E.; ERAZZÚ, L. E.; MARTINEZ CALSINA, L.; FERRERO, M. A.; LUCCA, M. E.; SINERIZ, F. Inoculation of maize with phosphate solubilizing bacteria: effect on plant growth and yield. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 14, n. 4, p. 819-8931, 2014.

XU, G.; FAN, X.; MILLER, A. J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v.63, p.153-182, 2012.

XUAN, Y.; LIU, X.; ZHU, T-H.; MAO, C. Co inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 50, n.1, p. 112-117, 2012.

WAKELIN, S. A.; WARREN, R. A.; HARVEY, P. R.; RYDER, M. H. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 40, p. 36-43, 2004.

WALPOLA, B. C.; YOON, M-H. Prospectus of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus availability in agricultural soils: A review. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 6, n. 37, p. 6600-6605, 2012.

WALPOLA, B. C.; YOON, M-H. Phosphate solubilizing bacteria: Assesment of ther effect on growth promotion and phosphorus uptake of mung bean (*Vigna radiata* [L.] R. Wilzzek. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Santiago, v. 73, n. 3, 275-281, 2013.

WATANABE, F. S.; OLSEN, S. R. Test of an ascorbic acid method of determining phosphorus in water and NaHCO₃ extracts from soil. **Soil Science Society of American Proceedings**, Madison, v. 29, n. 6, p. 677-678, 1965.

WOLLUM, A. G. Cultural methods for soil microorganisms. In: PAGE, A. L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D. R. (Eds). **Methods of soil analysis**. Madison: Soil Science of America, 1982. p. 781-802.

WU, S. C.; CAO, Z. H.; LIB, Z. G.; CHEUNGA, K. C.; WONGA, M. H. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P, and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. **Geoderma**, Netherlands, v. 125, n. 1-2, p. 155-166, 2005.

YUAN, H.; GE, T.; ZHOU, P.; LIU, S.; ROBERTS, P.; ZHU, H.; ZOU, Z.; TONG, C.; WU, J. Soil microbial biomass and bacterial and fungal community structures responses to long-term fertilization in paddy soils. **Journal of Soils and Sediments**, Heidelberg, v. 13, n.5, p. 877-886, 2013.

ZHAIR, Z. A.; MUHAMMAD, A.; FRANKENBERGER, W. T. Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 81, p. 97-168, 2003.