

**Universidade de São Paulo**  
**Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Potencial da aplicação de bactérias na promoção de crescimento de milho (*Zea mays*) cultivado em solos com diferentes doses de nitrogênio e fósforo**

**Matheus Gianoni Jerônimo**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como  
parte dos requisitos para obtenção do título de  
Engenheiro Agrônomo

**Piracicaba**  
**2024**



**Matheus Gianoni Jerônimo**

**Potencial da aplicação de bactérias na promoção de crescimento de milho (*Zea mays*) cultivado em solos com diferentes doses de nitrogênio e fósforo**

Orientador:

Prof. Dr **Italo Delalibera Junior**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como  
parte dos requisitos para obtenção do título de  
Engenheiro Agrônomo

**Piracicaba**

**2024**





## SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT .....	5
1 INTRODUÇÃO .....	6
1.1 Objetivo Geral .....	13
1.2 Objetivos específicos.....	13
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
2.1 Obtenção dos isolados bacterianos.....	14
2.1.2 Crescimento dos isolados de <i>Bacillus</i> em meio diferencial .....	14
2.2 Ensaio de solubilização de fósforo e fixação de nitrogênio .....	15
2.2.1 Avaliação qualitativa das bactérias quanto a capacidade de fixação de nitrogênio ....	15
2.2.2 Avaliação qualitativa dos isolados bacterianos quanto a capacidade de solubilização de fósforo.....	16
2.2.3 Avaliação quantitativa da fixação de nitrogênio atmosférico .....	16
2.2.4 Avaliação quantitativa da solubilização de fósforo natural pelos isolados bacterianos.....	17
2.3 Teste de produção de biofilme.....	17
2.4 Teste de produção de exopolissacarídeos (EPS) .....	18
2.5 Teste de produção de ácido indolacético (AIA).....	19
2.6 Identificação molecular dos isolados .....	20
2.7 Experimento com plantas em vasos e diferentes dosagens de nitrogênio e fósforo .....	20
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
3.1 Obtenção dos isolados bacterianos.....	22
3.2 Crescimento dos isolados de <i>Bacillus</i> em meio diferencial .....	23
3.3 Avaliação qualitativa das bactérias quanto a capacidade de fixação de nitrogênio e solubilização de fósforo .....	24
3.3.1 Avaliação quantitativa da fixação biológica do nitrogênio atmosférico pelos isolados bacterianos .....	29
3.3.2 Avaliação quantitativa da solubilização de fósforo natural reativo pelos isolados bacterianos .....	31
3.4 Teste de produção de biofilme e EPS.....	32
3.5 Teste de produção de ácido indolacético (AIA).....	33
3.6 Identificação molecular dos isolados.....	34
3.7 Ensaio de promoção de crescimento em solos com limitação de nitrogênio e fósforo..	34
4 CONCLUSÃO.....	45
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47

## RESUMO

### **Potencial da aplicação de bactérias na promoção de crescimento de milho (*Zea mays*) cultivado em solos com diferentes doses de nitrogênio e fósforo**

A inoculação por microrganismos capazes de disponibilizar nutrientes essenciais para as plantas através de seus processos biológicos, como a fixação de nitrogênio e a solubilização de fósforo são de extremo interesse para o setor agrícola. A utilização desses microrganismos possibilita a redução no uso de fertilizantes e insumos químicos, podem ter efeito de antibiose e competição com fitopatógenos e a maior disponibilidade de nutrientes limitantes para as plantas, gerando uma cadeia produtiva mais sustentável e com altas produtividades. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do uso de isolados bacterianos inoculados em sulco de plantio do milho em solos com diferentes doses de nitrogênio e fósforo. Foram realizados ensaios qualitativos para fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fontes de fósforo (reagentes) e os isolados que possuíram ambas as características foram avaliadas de forma quantitativa. Os isolados foram avaliados quanto a presença de nitrogênio inorgânico e proteínas nos cultivos, em dois meios de cultura líquido com ausência de nitrogênio (NFB e JNFB) e o fósforo foi avaliado quanto a sua disponibilização em meio de cultivo com as fontes de fosfato natural reativo Bayovar e fosfato natural de Araxá. Os isolados de *Bacillus* (107 e 226) e *Pseudomonas* (891 e 1204) obtiveram os melhores resultados nos testes *in vitro* e foram selecionados para o ensaio em vasos. No ensaio em vasos foram testadas diferentes doses de nitrogênio e fósforo com correções de 30%, 60% e 90% do exigido pela cultura, onde foi usado o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio e duas fontes de fósforo, o superfosfato triplo (fósforo solúvel) e o fosfato natural reativo Bayovar (fósforo insolúvel). O controle da dose consistiu em solo sem correção desses nutrientes e o controle do experimento não teve a inoculação dos microrganismos. Aos 32 dias após o plantio e inoculação dos microrganismos, foram avaliados os parâmetros de altura das plantas, número de folhas por planta, índice de clorofila, área foliar e massa seca das raízes. Os resultados demonstraram que a aplicação dos isolados bacterianos em sulco de plantio de milho promoveram aumento no crescimento das plantas em solos com baixa concentração de nitrogênio e fósforo. No tratamento onde não foi realizado adubação nitrogenada e fosfatada, os isolados, especialmente o 891, mostraram um aumento notável na altura das plantas (118%), no número de folhas (92%), na área foliar (450%) e na massa seca das raízes (100%) em relação ao controle onde não foi aplicado microrganismo. No entanto, em solos com adubação próxima ao requerimento nutricional das plantas, o efeito dos microrganismos foi menos evidente. Assim, a utilização desses microrganismos é promissora para melhorar a produtividade em condições de baixa fertilidade, potencializando o crescimento e a eficiência nutricional das plantas de milho. Os resultados indicam que a inoculação pode ser uma estratégia eficaz para promover o crescimento e a produtividade do milho em solos com limitações de nutrientes.

Palavras-chave: promoção de crescimento; fixação biológica de nitrogênio; solubilização de fósforo; inoculação de microrganismos

## ABSTRACT

### **Potential of using bacteria to promote the growth of corn (*Zea mays*) grown in soils with different doses of nitrogen and phosphorus**

Inoculation with microorganisms capable of providing essential nutrients to plants through their biological processes, such as nitrogen fixation and phosphorus solubilization, is of great interest to the agricultural sector. The use of these microorganisms allows for a reduction in the use of fertilizers and chemical inputs, can have effects of antibiosis and competition with phytopathogens, and increases the availability of limiting nutrients for plants, resulting in a more sustainable and highly productive supply chain. This study aimed to evaluate the effect of bacterial isolates inoculated in maize planting furrows in soils with different doses of nitrogen and phosphorus. Qualitative assays for biological nitrogen fixation and phosphorus solubilization (reactive sources) were conducted, and isolates with both characteristics were tested quantitatively. The isolates were evaluated for the presence of inorganic nitrogen and proteins in cultures in two nitrogen-free liquid media (NFB and JNFB), and phosphorus availability was assessed using the reactive natural phosphate Bayovar and natural phosphate Araxá. *Bacillus* isolates (107 and 226) and *Pseudomonas* isolates (891 and 1204) showed the best results in vitro and were selected for pot experiments. In the pot experiments, different doses of nitrogen and phosphorus were tested with corrections of 30%, 60%, and 90% of the crop requirements, using ammonium sulfate as the nitrogen source and two phosphorus sources, triple superphosphate (soluble phosphorus) and reactive natural phosphate Bayovar (insoluble phosphorus). The control dose consisted of soil without nutrient correction, and the experimental control did not involve microorganism inoculation. Thirty-two days after planting and microorganism inoculation, parameters such as plant height, number of leaves per plant, chlorophyll index, leaf area, and root dry mass were evaluated. The results demonstrated that applying bacterial isolates in maize planting furrows promoted increased plant growth in soils with low nitrogen and phosphorus concentrations. In the treatment without nitrogen and phosphorus fertilization, the isolates, especially 891, showed a notable increase in plant height (118%), number of leaves (92%), leaf area (450%), and root dry mass (100%) compared to the control without microorganism application. However, in soils with fertilization close to the plants' nutritional requirements, the effect of the microorganisms was less evident. Thus, the use of these microorganisms is promising for improving productivity under low-fertility conditions, enhancing the growth and nutritional efficiency of maize plants. The results indicate that inoculation can effectively promote maize growth and productivity in nutrient-limited soils.

**Keywords:** growth promoting; nitrogen fixation; phosphorus solubilization; microorganism inoculation



## 1 INTRODUÇÃO

Bioinsumos são produtos ou substâncias de origem biológica utilizados na agricultura para promover o crescimento das plantas, melhorar a saúde do solo e controlar pragas e doenças de forma mais sustentável. Os bioinsumos estão ganhando cada vez mais destaque, pois seu uso proporciona um menor uso de insumos sintéticos, uma maior segurança alimentar, maior sustentabilidade das culturas e redução de custos para os produtores. A sua utilização visa maximizar os benefícios das relações biológicas, mitigar os danos ao meio ambiente podendo ser incorporados durante todo o processo produtivo (FIGUEIREDO et al., 2016; ZILLI et al., 2011). Nesse contexto, os bioinsumos à base de microrganismos têm papel fundamental no desenvolvimento sustentável, pois estes possuem relações estreitas com as plantas e trazem diversos benefícios, como antibiose e/ou competição com fitopatógenos, promoção de crescimento através da indução de produção de sideróforos, exopolissacarídeos (EPS) e fitohormônios e até controle de pragas (FIGUEIREDO et al., 2016).

Grande parte da produção agrícola nacional se concentra em solos de regiões tropicais. Em geral, esses solos são naturalmente pobres em nitrogênio e fósforo prontamente disponíveis para a absorção das raízes e dessa forma, os sistemas de produção são altamente dependentes de fertilizantes químicos, principalmente os nitrogenados e fosfatados (TILMAN et al., 2002). A utilização de fertilizantes nas culturas de grãos como o milho (*Zea mays*) pode constituir a maior parcela dos custos de produção de cultura. Além disso, a fabricação desses fertilizantes demanda uma grande quantidade de energia fóssil, implicando em custo energético e ambiental.

Para a obtenção de amônia, por exemplo, é necessário que ocorra a reação em alta temperatura (queima de gás natural, óleo ou carvão mineral) entre o nitrogênio atmosférico e o hidrogênio proveniente da nafta, sendo uma reação exigente em combustíveis fósseis (BENDASSOLLI; TRIVELIN; IGNOTO, 2002). Do consumo total de energia no planeta, 1,2% são destinados para a produção de fertilizantes e destes, 92,5% são destinados para a produção de fertilizantes nitrogenados (FRANCO; SARAIVA NETO, 2008).

No quesito de consumo de energia para a produção de fertilizantes nitrogenados, no processo de produção, com o coeficiente energético adotado

dependendo da matéria prima utilizada, consideraram que para a produção de 1 kg de N são necessários 18.750 kcal em países “subdesenvolvidos” e 25.000 kcal de países “em desenvolvimento”. A depender das poucas reservas de gás e petróleo, se faz necessário a utilização do carvão mineral para alcançar as altas temperaturas requeridas para a obtenção da amônia. (MAKHIJANI; POOLE, 1975)

A demanda por fertilizantes no Brasil supera a oferta, chegando a importar mais de 80% dos fertilizantes consumidos e, dentre os nitrogenados consumidos 70% é importado (ALMEIDA; VOLOTÃO, 2020; TEIXEIRA, 2021). Com a baixa produção e o alto consumo, o país é altamente dependente das importações, chegando a 88% do volume total consumido (GLOBALFERT, 2021). Em 2018, o Brasil importou 24,96 milhões de toneladas de fertilizantes, um aumento de 4% em relação ao ano anterior. Sendo 35% os nitrogenados, 23% os fosfatados e o cloreto de potássio sendo o maior volume com 42% (ALMEIDA; VOLOTÃO, 2020; TEIXEIRA, 2021).

De acordo com Bendassolli et al., 2002, entre os fertilizantes nitrogenados a ureia apresenta maior teor de nitrogênio na sua composição e é considerada a principal fonte de nitrogênio quando comparada com as demais fontes sólidas usualmente utilizadas. A ureia ( $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ ) contém 46% de nitrogênio na forma amídica ( $\text{NH}_2$ ), possui baixa corrosividade, alta solubilidade e baixo custo de obtenção e facilidade para misturar a outras fontes. Devido à facilidade de produção, é o fertilizante nitrogenado mais usado do mundo, por outro lado, é o fertilizante mais propenso à perda por volatilização (PAULA, 2020; REETZ, 2016). A amônia anidra ( $\text{NH}_3$ ) é a forma mais concentrada de fertilizante nitrogenado comercial (82% de N), porém devido à alta perda por volatilização, a amônia simples não é mais usada como fertilizante apenas é usada como matéria-prima para a fabricação de outros tipos de fertilizantes, como o sulfato de amônio. O sulfato de amônio  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  contém 21% de nitrogênio e assim um alto custo por unidade de N. Apesar da baixa concentração de nitrogênio, pode ser usado em solos com baixo teor de enxofre, já que este elemento corresponde a 24% da sua composição. Possui propriedades físicas favoráveis que melhoram a absorção de nutrientes pelas plantas, aumentando a solubilidade do fósforo no solo e reduzindo as perdas por volatilização. Por outro lado, além de ser o fertilizante nitrogenado com o preço mais alto por unidade de N tem um alto potencial de acidificação do solo (COLOMBO, 2017; REETZ, 2016). E por último, os adubos a base de nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) que contém até 34% de N. É

considerado uma das formas mais rápidas e eficazes de nitrogênio, pois os outros tipos devem ser convertidos em nitrato no solo antes de serem assimilados pelas plantas. É apresentado metade na forma nítrica e metade na forma amoniacal; as duas formas reduzem a perda causada pela volatilização e acidificação do solo. Porém, como fica prontamente disponível na solução do solo, apresenta perdas por lixiviação (COLOMBO, 2017; MENDONÇA, 2015).

Diante do exposto, boa parte do nitrogênio aplicado em sistemas agrícolas não é utilizada pelas plantas e podem ser perdidos por meio da lixiviação, volatilização e a perda de óxido nitroso durante a desnitrificação. Quando o nitrato é perdido por lixiviação, ocorre a eutrofização de água marinhas e a acidificação do solo. A acidificação do solo afeta diretamente a produção agrícola, pois se reduz a disponibilidade de nutrientes e ocorre a liberação de alguns elementos tóxicos como o alumínio. A volatilização também acidifica o solo, a amônia ao reagir com os óxidos de enxofre presentes na atmosfera, formam sulfato de amônio, que através da chuva acidificam o solo. O nitrogênio quando perdido através do processo de desnitrificação do solo pode resultar em óxido nitroso, que ao reagir com o oxigênio, causa danos na camada de ozônio, intensificando o efeito estufa. A emissão de óxido nitroso corresponde à 7,5% das atividades humanas que intensificam o efeito estufa, e os solos são a principal fonte de emissão desse gás, com 65%. Manejos de adubação que aumentam a eficiência de absorção de N pelas culturas diminuem as emissões de óxidos para a atmosfera (IFA, 2015). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), concentrações acima de 50 mg/L de nitrato em água para consumo humano, pode ser maléfico para a saúde. No corpo humano, pode ocorrer a redução de nitrato a nitrito, interferindo na capacidade do sangue em transportar oxigênio causando condições como a metemoglobina, especialmente em bebês, grávidas e idosos (BALSALOBRE; SANTOS, 2018).

Cerca de 78% do N existente está na atmosfera em forma de  $N_2$  e indisponível para ser assimilado diretamente pelas plantas, sendo necessária sua conversão. No entanto, as plantas não são capazes de reduzi-lo diretamente e bactérias fixadoras de nitrogênio, denominadas diazotróficas, utilizando um sistema enzimático complexo realizam essa conversão (MUS et al., 2016). As bactérias diazotróficas fornecem  $N_2$  às plantas por mecanismos simbióticos ou não simbióticos. A utilização de bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Bradyrhizobium*, por exemplo, gera uma economia

anual de bilhões de dólares devido à contribuição desses microrganismos para o aumento da produtividade na cultura da soja, dispensando a aplicação de fertilizantes nitrogenados (MELO, 2018). Estimativas apontam que aproximadamente 175 milhões de toneladas de  $N^2$  são fixadas por ano em ecossistemas terrestres através da ação de microrganismos fixadores de nitrogênio (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

Diferentemente do nitrogênio que é um elemento abundante, o fósforo, apesar de ser um nutriente essencial para todos os seres vivos estando presente nas moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP) e diversas outras, é um recurso limitado (BICUDO et.al, 2010; DOMINGOS et al., 2003). O fósforo é o segundo nutriente que mais limita o desenvolvimento das plantas, afetando drasticamente o rendimento dos grãos. Do fósforo utilizado no Brasil, metade é proveniente de importações, vinda de Marrocos, Estados Unidos, Rússia e Arábia Saudita (MENDES, 2021). Mesmo com a escassez eminente desse nutriente, os solos em condições como a do Brasil apresentam grandes quantidades do nutriente, porém não disponível para as plantas e, fatores como a acidez do solo e elevados teores de óxidos de ferro e alumínio, contribuem para sua fixação no solo (SOUSA; LOBATO, 2004; VINHA et al., 2021). Em condições tropicais, a precipitação e a fixação de P são os principais responsáveis pela baixa eficiência dos fertilizantes fosfatados solúveis, sendo que até 80% do fertilizante pode ser complexado com íons ferro, alumínio e cálcio presentes no solo, diminuindo sua absorção pelo sistema radicular (NOVAIS; SMYTH, 1999).

A fonte primária de obtenção de fósforo é através das rochas fosfáticas, sendo que para produzir 1kg de P, são necessários 7 kg de rocha. O teor de fósforo extraído dessas rochas vem diminuindo, sendo necessários maiores volumes, encarecendo o processo (CORDELL; WHITE, 2014; BACELO et.al, 2020). As taxas de exploração de reservas fosfáticas só vêm aumentando, com estimativas de que até 2100, 40 a 60% seja extraído. Aproximadamente 90% do fósforo extraído é destinado para a produção de alimentos e, principalmente para os fertilizantes, assim a escassez de fósforo impactaria diretamente a produção de alimentos (MENDES, 2021).

Uma alternativa para a importação desse insumo, é o uso de pó de rocha, que são remineralizadores de solo provenientes de rochas nacionais/regionais, sendo utilizados como fontes de nutrientes para as culturas e/ou condicionadores de solo. A

utilização de fertilizantes solúveis juntamente com o pó de rocha, aumenta a eficiência destes insumos (OLIVEIRA JÚNIOR; PROCHNOW; KLEPKER, 2011; SOMA et al., 2017). A utilização combinada de fontes solúvel e insolúvel de fósforo é uma importante estratégia que pode ser utilizada, com as fontes solúveis sendo prontamente disponíveis para as plantas e as fontes insolúveis supriria o fósforo de forma mais escalonada e fracionada. Como o pó de rocha aplicado isoladamente não é capaz de substituir os fertilizantes solúveis, existe a necessidade de adotar práticas culturais com a utilização de organismos solubilizadores, visando melhorar a disponibilidade de fósforo para as plantas (PAVINATO et al., 2020). O principal mecanismo utilizado por estes microrganismos é baseado na secreção de ácidos orgânicos, promovendo tanto a solubilização quanto a mineralização de fosfatos no solo e, ao associar estes microrganismos com a adubação fosfatada se aumenta a disponibilidade de P no solo (AHEMAD; KIBRET, 2014).

Microrganismos solubilizadores de fosfato aumentam a eficiência da fertilização com fósforo, sendo capazes de mineralizar o fósforo de compostos orgânicos e, solubilizá-lo de fontes metálicas e rochas. Estes microrganismos podem ser utilizados como biofertilizantes e agentes de controle biológico, diminuindo o uso necessário de produtos químicos, proporcionando maiores produtividades e menores impactos ao meio ambiente (DE SOUSA et al., 2020; SATYAPRAKASH et al., 2017).

Os mecanismos associados à disponibilização de P no solo por microrganismos são variados e estão relacionados, principalmente, à liberação de ácidos orgânicos, como acetato, succinato, citrato e gluconato, liberação de cátions  $H^+$  e consequente redução de pH do solo, produção de exopolissacarídeos e sideróforos – compostos com alta afinidade por ferro, além da ação de enzimas fosfatases e fitases (GLICK, 2012; KHAN et al., 2017). Entre os grupos de bactérias e fungos que desempenham estas funções, destacam-se os gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Mesorhizobium*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Penicillium* e *Aspergillus* (MARRA, 2012). Bactérias isoladas da rizosfera de genótipos de milho eficientes no uso de P já foram identificadas e mostraram-se eficientes na solubilização de fontes insolúveis inorgânicas de P, podendo disponibilizar até 67% do P total *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2009). Diferentes espécies de bactérias, incluindo os gêneros *Burkholderia* e *Bacillus* isolados da rizosfera de milho, têm sido eficientes na solubilização de P *in vitro* (GOMES et al., 2014).

Na maioria das regiões brasileiras produtoras de milho, o principal problema é sua baixa produtividade, devido ao esgotamento progressivo da fertilidade do solo junto a problemas fitossanitários (PESSOA; LUCHESE; LUCHESE, 2000). O principal bioinsumo utilizado no milho é um inoculante, a base das bactérias do gênero *Azospirillum*. Um inoculante microbiano é caracterizado como um produto que contém microrganismos que atuam favoravelmente no desenvolvimento das plantas. Durante os últimos anos o uso de inoculantes no Brasil vem crescendo de forma significativa pelos agricultores brasileiros (ANPIL, 2018). Um inoculante estimula o crescimento da planta de diferentes maneiras, incluindo síntese de fitohormônios, melhoria na nutrição nitrogenada através da fixação do N atmosférico, na solubilização do P, redução de estresse e controle biológico de fitopatógenos (BASHAN; DE-BASHAN, 2010). A inoculação de *Azospirillum* na cultura do milho apresenta aumento no rendimento de grãos, em aproximadamente 25% (KENNEDY; CHOUDHURY; KECSKÉS, 2004). Além do aumento na produtividade, outro aspecto importante observado por Hungria et al., (2010) é o aumento da absorção de P e K pelas plantas.

Segundo Oliveira et al., (2017), a adubação do milho com fertilizante organomineral pulverizado com microrganismos solubilizadores de fósforo (MSP) no sulco de semeadura, obteve resultados semelhantes àqueles adubados com superfosfato triplo, com maior teor de P na parte aérea e maior disponibilidade do nutriente no solo. A utilização de MSP, juntamente com a adubação fosfatada, seja mineral ou organomineral, aumenta a disponibilidade de P no solo e maior absorção pelas plantas, resultando em aumento da produtividade do milho (AMANULLAH; KHAN, 2015).

Outro grupo de microrganismos promotores de crescimento que vem ganhando destaque são as bactérias do gênero *Bacillus*, tendo uma grande distribuição pelo ambiente. Apresenta capacidade de solubilizar o fosfato (WAHYUDI et al., 2011; BAHADIR; LIAQAT; ELTEM, 2018), produzir siderófos-quelantes (BJELÍĆ et al., 2018), produzir ácido indol-acético (AIA) (MOHITE, 2013) e o controle biológico de fitopatógenos (SHAFI et al., 2017). Uma vantagem presente em utilizar inoculantes de *Bacillus* é sua capacidade de produzir endósporos, estruturas de resistência a condições abióticas adversas, como temperaturas extremas (BAHADIR; LIAQAT; ELTEM, 2018). Segundo um experimento conduzido pela Embrapa Milho e Sorgo publicado em 2020, a inoculação de cepas de *B. megaterium* e *B. subtilis* juntamente

com adubação fosfatada, obtiveram maior exportação de fósforo pelos grãos e aumento da produtividade do milho em relação àquelas não inoculadas e que receberam adubação fosfatada.

Bactérias do gênero *Pseudomonas* também são promotoras de crescimento de plantas, devido a produção de reguladores de crescimento vegetal e outros metabólitos secundários, como sideróforos, quitinases e antibióticos, inibindo outros microrganismos maléficos e induzindo a resistência de plantas (EMBRAPA, 2000). Estes microrganismos também participam das transformações de fósforo no solo, influenciando diretamente com a sua solubilização e disponibilidade no solo e para as plantas (Vessey, 2003).

Além dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, outros microrganismos como as bactérias dos gêneros *Serratia* e *Pantoea*, são solubilizadores de fosfato, promovendo acúmulo de P quando comparado a plantas não inoculadas (CHEN et al., 2014; HAMEEDA et al., 2008). Esses microrganismos possuem um grande potencial de exploração quanto a sua utilização na agricultura.

A pesquisa sobre bioinsumos é de grande importância no contexto agrícola atual, devido a demanda crescente por práticas agrícolas mais econômicas e sustentáveis. Os bioinsumos podem melhorar a saúde do solo, estimular o crescimento das plantas, controlar pragas e doenças de maneira mais sustentável, resultando em uma agricultura mais econômica e ecologicamente correta. Com isso, a pesquisa sobre a aplicação de bioinsumos é muito relevante, podendo disponibilizar o fósforo já presente nos solos para as plantas, promovendo seu crescimento através de diferentes parâmetros e diminuindo o uso de adubos sintéticos.

## **1.1 Objetivo Geral**

O principal objetivo deste trabalho foi selecionar microrganismos capazes de promover o crescimento de plantas de milho cultivadas em solo com limitação dos nutrientes nitrogênio e fósforo.

## **1.2 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos foram: avaliar o potencial de isolados bacterianos identificados como *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp. para a fixação biológica do nitrogênio e a solubilização de fosfato natural reativo; avaliar o potencial desses microrganismos quando associados a diferentes fontes de nitrogênio e fósforo e em diferentes doses.



## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção dos isolados bacterianos

Foram acessados 191 isolados, sendo previamente identificados; com 153 isolados do gênero *Bacillus* e 38 isolados classificados como bactérias não esporulantes da coleção do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, da ESALQ. Os isolados estavam armazenados em criotubo e com o auxílio de uma alça de inoculação foi transferido cerca de 1ul para placas de meio Tryptic Soy Agar (TSA) para reativação. As placas foram incubadas a 28°C por 48 horas e passado após esse período, os isolados foram preservados em microtubos contendo solução de 15% de glicerol e armazenados em freezer a -20°C.

#### 2.1.2 Crescimento dos isolados de *Bacillus* em meio diferencial

Para excluir os possíveis isolados de *B. cereus* daqueles previamente selecionados foi utilizado o meio diferencial cromogênico chamado Agar HiCrome *Bacillus*. A espécie *B. cereus* é habitante comum dos solos e é responsável por intoxicações alimentares, podendo provocar as síndromes emética e diarreia. As cepas selecionadas foram plaqueadas, pela técnica do estriamento, no meio HiCrome, incubadas a 28° C por até 72 horas. A presença do manitol na composição desse meio atua como fonte de carbono e como carboidrato fermentável onde que é detectado pela presença do vermelho de fenol, diferenciando as espécies de *Bacillus* pela coloração e delimitação das bordas das colônias. A espécie *B. cereus* tem colônias azuis com as bordas brancas no meio cromogênico.

## 2.2 Ensaios de solubilização de fósforo e fixação de nitrogênio

Foram utilizados 70 isolados de *Bacillus* e 38 de bactérias não esporulantes, totalizando 108 isolados selecionados para verificar a possibilidade de solubilização de fósforo e fixação de nitrogênio.

### 2.2.1 Avaliação qualitativa das bactérias quanto a capacidade de fixação de nitrogênio

Foram utilizados dois meios de cultura para observar a fixação de nitrogênio atmosférico pelos isolados testados. Meio NFB (DÖBEREINER et al, 1995). com a seguinte composição: 5 g L<sup>-1</sup> de ácido málico, 0,5 g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1 g L<sup>-1</sup> de NaCl, 0,02 g L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 4,5 g L<sup>-1</sup> de KOH, 2ml solução de micronutrientes, 2ml de solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 KOH), 4ml de solução de FeEDTA (solução 1,64%), 1 ml de solução de vitaminas e pH a 6,5. O segundo meio utilizado foi o JNFB (DÖBEREINER et al, 1995), com a seguinte composição: 5 g L<sup>-1</sup> de ácido málico, 0,6 g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1 g L<sup>-1</sup> de NaCl, 0,02 g L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 4,5 g L<sup>-1</sup> de KOH, 2ml solução de micronutrientes, 2ml solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 KOH), 4ml solução de FeEDTA (solução 1,64%), 1ml solução vitaminas, e pH a 5,8.

Foram vertidos 4 ml de meio em tubos de ensaio. Os isolados foram inoculados com uma haste de plástico a partir de suas respectivas placas de TSA. Foram feitas três réplicas por isolado para cada meio. As avaliações foram feitas 5 dias após a inoculação e, com a mudança da cor do meio para tons de azul (pH básico) se observa o crescimento bacteriano e a sua capacidade de fixar nitrogênio. Os isolados considerados negativos para a fixação do nitrogênio atmosférico mantém o meio de cultura sem alteração de pH e consequentemente na cor verde. Como controle positivo foi utilizada *Pantoea agglomerans*, um microrganismo com capacidade de fixar nitrogênio.

### 2.2.2 Avaliação qualitativa dos isolados bacterianos quanto a capacidade de solubilização de fósforo

Foram utilizados três meios de cultura para verificar a solubilização de fósforo pelos isolados, os meios Hoyos (VARGAS-HOYOS, 2017) ( $10 \text{ g}^{-1} \text{ L}$  de Glicose,  $1 \text{ g}^{-1} \text{ L}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $5 \text{ g}^{-1} \text{ L}$  de  $(\text{NH}_4)\text{Cl}$ ,  $0,8 \text{ g}^{-1} \text{ L}$  de  $\text{CaHPO}_4$ ,  $1 \text{ g}^{-1} \text{ L}$  de  $\text{NaCl}$ ,  $15 \text{ g}^{-1} \text{ L}$  de Ágar e pH ajustado a 7,2), NBRIP (NAUTIYAL, 1999) ( $10 \text{ g}^{-1} \text{ L}$  de Glicose,  $8 \text{ g}^{-1} \text{ L}$  de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,25 \text{ g}^{-1} \text{ L}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,1 \text{ g}^{-1} \text{ L}$  de  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ ,  $5 \text{ g}^{-1} \text{ L}$  de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $0,2 \text{ g}^{-1} \text{ L}$  de  $\text{KCl}$ ,  $15 \text{ g}^{-1} \text{ L}$  de Ágar e pH ajustado a 7) e P (PIKOVSKAYA, 1948) ( $10 \text{ g}^{-1} \text{ L}$  de Glicose,  $0,1 \text{ g}^{-1} \text{ L}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,002 \text{ g}^{-1} \text{ L}$  de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $0,002$  de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,5 \text{ g}^{-1} \text{ L}$  de  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ ,  $5 \text{ g}^{-1} \text{ L}$  de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $0,2$  de  $\text{KCl}$  e pH ajustado a 7,5). As placas de Petri contendo os meios foram divididas para conter até 8 isolados e, os isolados foram estriados com 3 repetições em todos os meios. As placas foram mantidas na BOD a  $28^\circ\text{C}$  durante 3 dias. A presença de um halo transparente em volta da colônia indicou a capacidade de solubilizar a fonte de fósforo contida naquele meio. Foi utilizado um isolado de *P. agglomerans* como controle positivo da solubilização do fósforo nos meios de cultura.

### 2.2.3 Avaliação quantitativa da fixação de nitrogênio atmosférico

Os isolados selecionados previamente como potenciais fixadores de nitrogênio pela técnica qualitativa foram inoculados em frascos do tipo *baffled flasks* com 50 mL dos meios de cultura NFB e JNFB sem a adição do corante azul de bromotimol. Os frascos foram incubados em shaker a  $28^\circ\text{C}$  por sete dias. Após o período de incubação as amostras foram divididas em duas amostras, para a avaliação quantitativa do nitrogênio inorgânico e quantificação de proteínas presente nos meios de cultivo. Para a avaliação do nitrogênio inorgânico (nitrito, nitrato e amônia) foi utilizado um titulador automático. A titulação foi realizada com  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,2 \text{ mol/L}$ . A análise do nitrogênio

orgânico foi realizada de forma indireta pela quantificação de proteínas, pela técnica de Bradford. Parte da amostra foi centrifugada para separação das células bacterianas do sobrenadante e ao sobrenadante foi acrescentado o corante de Bradford. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, a absorbância foi lida em espectrofotômetro. Para a quantificação, uma curva com concentração de proteína conhecida foi construída, utilizando albumina bovina. O reagente de Bradford torna-se azul ao ligar-se a proteínas (resíduos de aminoácidos). Dessa forma, ao utilizar quantidades conhecidas de uma proteína, como a albumina bovina (BSA) ao reagente de Bradford, a solução torna-se azul e com tons mais intensos quanto maior a quantidade adicionada. Uma curva foi feita para a comparação e, assim, quantificar as proteínas presentes nas amostras. Para medir a intensidade da cor azul foi utilizado um espectrofotômetro com comprimento de onda a 595 nm.

#### **2.2.4 Avaliação quantitativa da solubilização de fósforo natural pelos isolados bacterianos**

Para a avaliação quantitativa da solubilização de fósforo, foram escolhidos o fosfato natural de Araxá e fosfato natural reativo Bayovar, que tem apenas 4% e 23% de  $P_2O_5$  solúvel em ácido cítrico a 2%, respectivamente. A fonte de fósforo do meio NBRIP foi trocada por 5g dos fosfatos naturais por litro de meio de cultura. Os isolados selecionados foram inoculados em *baffled flasks* com 50ml meio de cultura e mantidos em *shaker* a 28°C por sete dias. Após esse período, as amostras foram submetidas ao método colorimétrico de azul de molibdato para determinação do teor de P (MURPHY; RILEY, 1962).

### **2.3 Teste de produção de biofilme**

Biofilmes bacterianos são formados por comunidades de bactérias fixadas a superfícies sólidas e circundadas por uma matriz autoproduzida, geralmente composta por proteínas, exopolissacarídeos, lipídios e DNA extracelular. Bactérias associadas a plantas unem-se e formam biofilmes em diferentes tecidos, incluindo folhas, caules, sementes e raízes. O biofilme fortalece a interação entre plantas e

microrganismos da rizosfera, pois eles facilitam o fluxo de nutrientes, de oxigênio e podem fornecer ao sistema radicular da planta uma barreira protetora contra o ataque de organismos patogênicos (VELLOSO, 2019).

A capacidade da formação de biofilme foi avaliada pelo método Stepanovic et al., (2007). Os isolados foram produzidos em meio TSB com adição de 1% de glicose em frascos tipo baffled flask, 150 rpm de agitação, por 4 dias. Após esse período, 200 µl do cultivo foi transferido para a microplaca de poliestireno e o controle consistiu no meio de cultura não cultivado. Após três horas de incubação, o líquido foi removido e lavado com água destilada estéril. Foram adicionados 200 µl de metanol em cada amostra para fixação do biofilme, seguido de incubação à temperatura ambiente por 20 min. Posteriormente, o metanol foi descartado e adicionados 200 µl de solução de cristal violeta 0,5% (m/v) e as amostras incubadas por 15 min. Após a remoção da solução por inversão, a placa foi lavada com água e foram adicionados 200 µl de etanol absoluto e as amostras foram incubadas por 30 min. Após esse período, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm. Foram consideradas produtoras de biofilme as bactérias capazes de reter a coloração violeta, sendo que o valor da densidade óptica de cada amostra foi obtido pela média da absorbância das repetições e esse valor foi comparado com a média da absorbância dos controles. Para determinar o grau de formação de biofilme, foi utilizada a seguinte classificação: não formadora de biofilme ( $DO_a \leq DO_c$ ), fracamente formadora de biofilme ( $DO_c \leq DO_a \leq 2.DO_c$ ), moderadamente formadora de biofilme ( $2.DO_c < DO_a \leq 4.DO_c$ ) e fortemente formadora de biofilme ( $4.DO_c < DO_a$ ).

## **2.4 Teste de produção de exopolissacarídeos (EPS)**

Os EPS são carboidratos de alto peso molecular ligados à superfície externa das bactérias, relacionados à formação de biofilmes e à fixação das células bacterianas em superfícies, incluindo raízes de plantas e partículas do solo. Como os EPS são compostos hidratados, incluindo 97% de água em uma matriz polimérica, são capazes de aumentar o crescimento e garantir a sobrevivência das plantas sob estresse hídrico e proteger a planta contra a dessecação devido à formação de biofilmes hidrofílicos na superfície da raiz. Além disso, podem contribuir na fixação de

nitrogênio evitando altas concentrações de oxigênio, já que a enzima nitrogenase é extremamente sensível a este elemento (BOMFETI, et. al, 2011).

A avaliação da capacidade de produção de EPS pelos isolados foi realizada de acordo com Paulo et al. (2012). Discos de 5 mm de diâmetro de papel filtro tipo Whatman esterilizados foram transferidos para meio de cultura TSA e inoculados com 5 µl da cultura de cada isolado bacteriano crescido em meio TSB. As placas foram incubadas a 30°C por quatro dias e a produção de EPS foi avaliada pela ausência ou presença de colônia mucosa ao redor dos discos. A confirmação da produção de EPS foi realizada por meio da lavagem dos discos de papel em 3 ml de etanol absoluto, sendo considerada a formação de precipitado como resultado positivo e a presença de turbidez como resultado negativo.

## **2.5 Teste de produção de ácido indolacético (AIA)**

O ácido indol-3-acético (AIA) é a auxina natural mais abundante e estudada atualmente. Ela atua como uma molécula de sinalização e é um regulador chave, exercendo inúmeros papéis no desenvolvimento da planta (SUGAWARA et al., 2015). As bactérias associadas às plantas utilizam o triptofano presente no exsudato da planta como um precursor para a biossíntese do AIA (HARDOIM; VAN OVERBEEK; ELSAS, 2008). O AIA liberado por essas bactérias pode agir conjuntamente com esta mesma molécula liberada pela planta. As raízes das plantas, por exemplo, são sensíveis às diferentes concentrações de AIA, e as respostas variam do alongamento das raízes primárias, formação de raízes laterais e adventícias à inibição do crescimento (DIMKPA et al., 2008). Diversas cepas de *Bacillus* já foram relatadas na literatura como produtoras de AIA, com valores de produção variando de 0,80 a 73,60 µg mL<sup>-1</sup>, e foram capazes de promover o crescimento de diferentes culturas (BATISTA et al., 2016).

Neste trabalho a produção de AIA foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Patten e Glick, (1996). Os isolados foram multiplicados em 30 ml de meio TSB com a adição de 1% de triptofano em *baffled flasks* incubados a 28°C e 150 rpm de agitação. Após cinco dias, uma amostra de 1 ml de cada cultivo foi centrifugada em microtubos a 4.000 rpm por 5 minutos.

Do sobrenadante foram coletados 100 µl do sobrenadante e foram misturados com 100 µl do reagente Salkowski (49 mL de ácido perclórico a 35% (v/v) e 1 mL de  $\text{FeCl}_3$  0,5 M), seguido de incubação por 30 minutos no escuro. A concentração de AIA foi estimada por meio da leitura da OD a 540 nm em espectrofotômetro. Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado positivo foi evidenciado pela formação da coloração rósea comparada a uma curva de AIA comercial.

## **2.6 Identificação molecular dos isolados**

Os isolados 107, 226, 891 e 1204 foram enviados para identificação molecular (serviço terceirizado). Foi realizada a extração de DNA dos isolados a partir de placas cultivadas com o método de fenol/clorofórmio. A reação de PCR foi executada com primers da região 16S (6S rRNA Amplicon Sequencing) e após purificação foi analisada pelo método de sequenciamento Sanger.

## **2.7 Experimento com plantas em vasos e diferentes dosagens de nitrogênio e fósforo**

Solo de baixa fertilidade (Tabela 1) foi peneirado e corrigido com  $\text{CaCO}_3$  como fonte de cálcio,  $\text{MgO}$  como fonte de magnésio e  $\text{KCl}$  como fonte de potássio. Após essa combinação, foi elevada a umidade para a capacidade de campo e mantida por uma semana para completa dissolução dos adubos de correção. Para avaliar o efeito da aplicação dos microrganismos em solos com diferentes concentrações de nitrogênio foi escolhida a fonte sulfato de amônio com 22% de nitrogênio e para o fósforo foram utilizadas duas fontes, o fosfato natural reativo Bayovar, com 29% de concentração de  $\text{P}_2\text{O}_5$  com 20% de solubilidade em ácido cítrico e o superfosfato triplo (STP) com 41% de  $\text{P}_2\text{O}_5$  e acima de 92% de solubilidade em água. O fosfato natural reativo Bayovar foi escolhido por ser um fosfato de origem sedimentar e caracteriza-se por apresentar alto grau de substituição isomórfica do íon fosfato por carbonato, o que lhe confere maior velocidade de reação no solo, quando comparado a outros

fosfatos naturais, já que o experimento de crescimento seria avaliado de forma destrutiva em 30 dias (NOVAIS et al., 2007).

As concentrações utilizadas foram: 0 (sem nenhuma adubação), 30%, 60% e 90% das porcentagens das doses dos elementos N e  $P_2O_5$  recomendadas para a cultura do milho seguindo o Boletim 100 do Instituto Agronômico de Campinas. Vasos de 2,6 L tiveram seus drenos fechados com saco plástico e foram completos com 2kg de solo tratado de acordo com as dosagens descritas (Cálculos realizados por Ádila Almeida).

Uma suspensão bacteriana de concentração  $1 \times 10^6$  UFC/ml foi aplicada, considerando 10 ml por vaso, para total molhamento do sulco de plantio com quatro sementes. Após 7 dias foi realizada a contagem da germinação dos tratamentos e realizado o procedimento de desbaste deixando apenas uma planta por vaso.

O experimento foi conduzido por 32 dias e foram avaliados os parâmetros: altura das plantas (medição do caule desprezado as folhas), número de folhas totais, área do limbo foliar da planta com o software ImageJ, clorofila da folha +2 com o aparelho clorofilog Falker e massa seca das raízes.

pH	M.O	P	K	Ca	Mg	H+A I	Al	Soma	CTC	Sat.	Sat.	S
CaCl <sub>2</sub>		resina						base s		base s	Al	SO <sub>4</sub>
	g dm <sup>-3</sup>	mg dm <sup>-3</sup>	mmolc dm <sup>-3</sup>							V%	m%	mg dm <sup>-3</sup>
4,6	10	4	1,2	19	6	25	2	26	51	51	7	32

Tabela 1. Análise do solo utilizado no experimento de aplicação dos isolados bacterianos com correções de diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo.



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Obtenção dos isolados bacterianos

Os isolados selecionados para o estudo foram coletados de materiais vegetais de diversas partes do Brasil e de diferentes culturas e biomas. Na Figura 1, podemos observar a distribuição dos isolados de *Bacillus* e das bactérias não esporulantes de acordo com a cultura de origem do isolamento. Foram utilizados isolados das culturas soja (35), algodão (31), milho (27), citros (16), florestas nativas (16), café (11), capim (10), seringueira (10) e outros (10), dentre esses materiais de serrapilheira, água da floresta Amazônica, solo do cerrado e solo da Mata Atlântica.

Além da diversidade de culturas, também foram selecionadas regiões distintas do Brasil, com representação de diferentes Biomas brasileiros. Os isolados têm origem de 8 estados brasileiros. A maior parte dos isolados das bactérias não esporulantes, 40, é do estado de São Paulo, das cidades Piracicaba, Mogi Mirim, São Pedro, Itirapina e Parque Estadual Carlos Botelho (Figura 2).

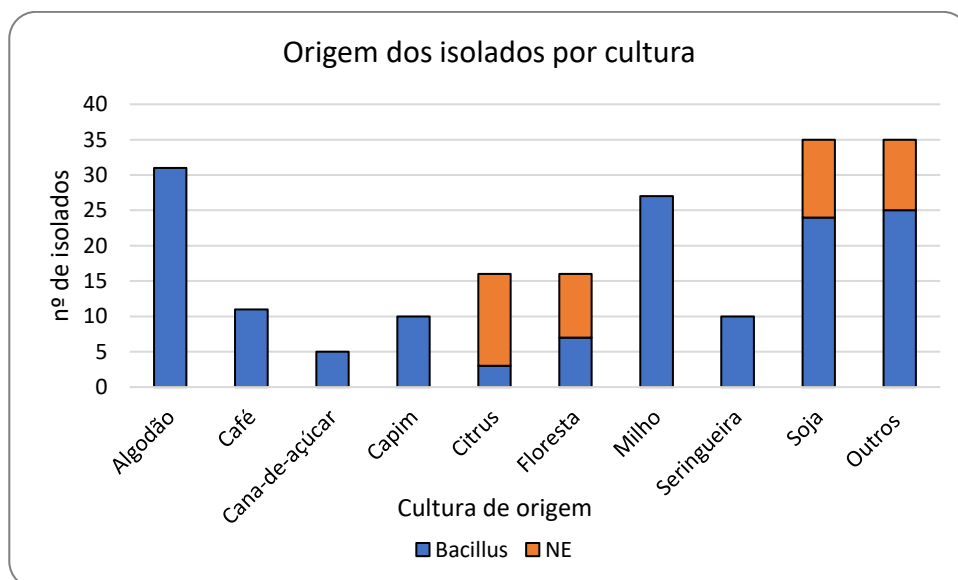


Figura 1. Distribuição dos isolados de *Bacillus* e bactérias não esporulantes (NE) por cultura de origem.

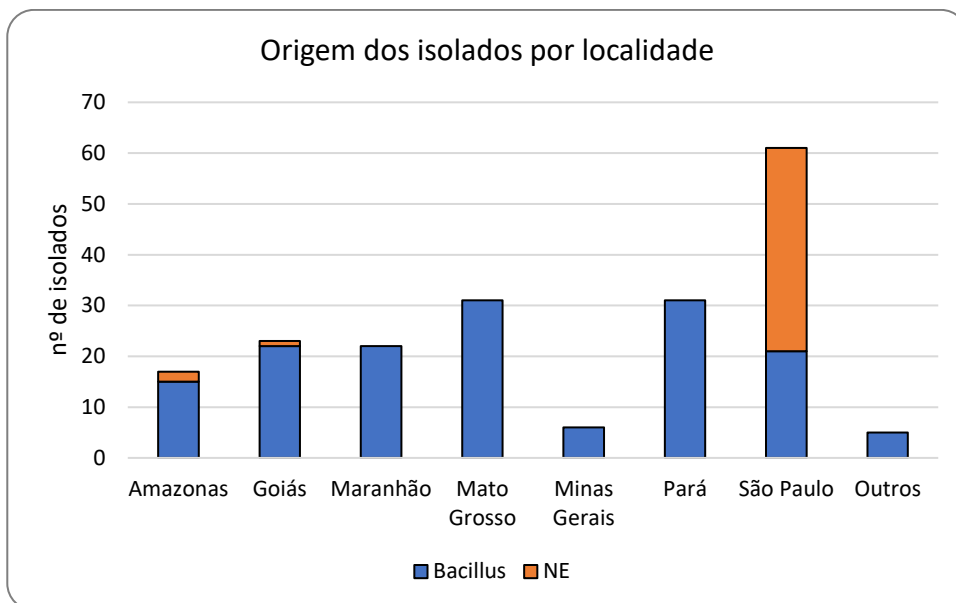


Figura 2. Origem dos isolados de *Bacillus* e bactérias não esporulantes (NE) por localidade de coleta.

### 3.2 Crescimento dos isolados de *Bacillus* em meio diferencial

Algumas espécies de *Bacillus*, como *B. anthracis* e *B. cereus*, são habitantes comuns do meio ambiente, mas a manipulação, ingestão ou inalação dos mesmos pode ser prejudicial à saúde humana e dessa forma não podem ser utilizadas como bioinsumos. A partir disso, foi realizada uma triagem em meio diferencial cromogênico. Os meios cromogênicos contêm moléculas incolores solúveis chamadas cromogênicos. Os cromogênicos são compostos de duas partes: um substrato que é o alvo da atividade enzimática específica do microrganismo e um cromóforo. Quando a ligação entre o substrato e o cromóforo é quebrada por uma enzima específica produzida pelo microrganismo alvo, o cromóforo é liberado. Em sua forma não conjugada, o cromóforo apresenta cores distintas. Devido à solubilidade reduzida, o cromóforo forma um precipitado que confere uma cor única à colônia (Kasvi, 2024). Assim, colônias da espécie *B. cereus* são de coloração azul e tem bordas brancas no meio cromogênico para *Bacillus*, o Agar HiCrome.

Nesta avaliação, 77 isolados apresentaram colônias azuis com bordas brancas, indicando possivelmente serem do grupo *B. cereus* e dessa forma, foram eliminados

dos próximos ensaios. Outros padrões de cor de colônia e cor de borda apareceram e alguns deles podem ser vistos na Figura 3. No grupo A quatro isolados foram classificados como *B. cereus* (28, 37, 197, 420), pois foram considerados como colônias azuis de bordas brancas e foram eliminados do estudo. No grupo B, temos isolados que mudaram a cor do meio de vermelho para amarelo, indicando alteração de pH do mesmo, mas com colônias de morfologia distintas. Já no grupo C temos isolados que alteraram a cor do meio para róseo, com colônias opacas e bordas irregulares. A diversidade de padrões no meio cromogênico indica de forma indireta a presença de várias espécies de *Bacillus*.



Figura 3. Exemplos de variação dos isolados no meio Agar HiCrome.

### 3.3 Avaliação qualitativa das bactérias quanto a capacidade de fixação de nitrogênio e solubilização de fósforo

Com 108 isolados bacterianos foram realizados testes qualitativos da fixação biológica do nitrogênio atmosférico e a solubilização de fósforo *in vitro*.

No caso do nitrogênio, foram testados os meios de cultura de isolamento de bactérias diazotróficas, o NFB utilizado para isolamento do gênero *Azospirillum* e o JNFB utilizado para isolamento de *Herbaspirillum* (EMBRAPA, 1999). Foram utilizados meios líquidos, com a adição do indicador de alteração de pH azul de

bromotimol. Para o meio de cultura NFB, 48% das bactérias alteraram o pH do meio, indicando desenvolvimento e consequentemente utilização do nitrogênio atmosférico, já que o meio é isento de qualquer fonte de nitrogênio. Dentre esses, 46% são pertencentes ao grupo não esporulante e 54% do grupo *Bacillus*. Já no meio JNFB, o número de positivos foi menor, 33%, mas desse grupo, 61% é não esporulante e 39% do grupo *Bacillus*. Apenas 29% dos isolados foram positivos em ambos os meios de cultura (Tabela 2).

Para o teste de solubilização de fósforo foram utilizados três meios de cultura diferentes, pois a ligação do fósforo e o pH do meio eram diferentes ( $\text{CaHPO}_4$  e  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  a 7,2 e 7,5). Dentre os isolados avaliados, 22% deles mostraram halo de solubilização no meio de cultura Hoyos (fonte  $\text{CaHPO}_4$ ), 19% no meio NBRIP e 6% no meio Pikosvskaya. Apenas um isolado, o 226, foi capaz de produzir halo de solubilização nos três meios de cultura testados, representando menos de 1% da amostragem (Tabela 2).

Código	Classificação	Fixação de nitrogênio		Solubilização de fósforo		
		meios de cultura		meios de cultura		
		NFB	JNFB	Hoyos	NBRIP	Pikosvskaya
3	<i>Bacillus</i>	+	-	-	-	-
6	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
8	<i>Bacillus</i>	+	-	-	-	-
10	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
11	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
16	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
22	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
25	<i>Bacillus</i>	+	-	-	-	-
26	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
29	<i>Bacillus</i>	+	-	-	-	-
31	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
33	<i>Bacillus</i>	+	-	-	-	-
34	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
36	<i>Bacillus</i>	-	+	-	-	-
39	<i>Bacillus</i>	+	+	+	-	-
40	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
44	<i>Bacillus</i>	+	+	+	-	-
50	<i>Bacillus</i>	+	+	+	-	-
55	<i>Bacillus</i>	-	-		-	-
56	<i>Bacillus</i>	-	+	+	-	-

60	<i>Bacillus</i>	+	+	+	-	-
68	<i>Bacillus</i>	+	+	+	-	-
70	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	+
74	<i>Bacillus</i>	+	-	-	-	-
78	<i>Bacillus</i>	+	+	+	+	-
84	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
85	<i>Bacillus</i>	+	+	+	+	-
100	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
<b>107</b>	<b><i>Bacillus</i></b>	+	+	+	+	-
108	<i>Bacillus</i>	-	-	+	-	-
112	<i>Bacillus</i>	+	+	+	-	-
121	<i>Bacillus</i>	+	-	+	-	-
130	<i>Bacillus</i>	-	+	+	-	-
131	<i>Bacillus</i>	+	-	+	-	-
135	<i>Bacillus</i>	-	-	+	-	-
144	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
148	<i>Bacillus</i>	-	-	+	-	-
156	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
165	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
168	<i>Bacillus</i>	+	-	-	-	-
169	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
179	<i>Bacillus</i>	-	-	+	-	-
198	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
<b>226</b>	<b><i>Bacillus</i></b>	+	-	+	+	+
243	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
253	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
254	<i>Bacillus</i>	+	+	+	-	-
255	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
258	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
261	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
267	<i>Bacillus</i>	+	-	-	-	-
268	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
269	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
270	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
272	<i>Bacillus</i>	+	-	-	-	-
273	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
333	<i>Bacillus</i>	+	-	-	-	-
336	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
<b>337</b>	<b><i>Bacillus</i></b>	+	+	+	+	-
340	<i>Bacillus</i>	+	-	-	-	-
341	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-

444	NE	+	-	-	-	-
486	NE	-	-	-	-	-
517	NE	-	-	-	-	-
525	<i>Bacillus</i>	+	-	-	-	-
534	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
538	<i>Bacillus</i>	+	-	-	-	-
540	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
541	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
544	<i>Bacillus</i>	-	-	-	-	-
556	<i>Bacillus</i>	+	-	-	-	-
557	<i>Bacillus</i>	+	-	-	-	-
669	NE	-	+	+	-	-
670	NE	+	-	-	-	-
687	NE	+	+	-	-	-
806	NE	+	+	-	+	-
<b>810</b>	<b>NE</b>	+	+	-	+	+
811	NE	+	+	-	+	+
812	NE	+	+	-	-	-
816	NE	+	+	-	-	-
821	NE	+	+	-	-	-
824	NE	+	+	-	+	-
826	NE	+	+	-	-	-
828	NE	+	-	-	-	-
<b>891</b>	<b>NE</b>	+	+	-	+	+
895	<i>Bacillus</i>	-	-	+	+	-
982	NE	+	+	-	+	-
1152	NE	-	-	-	-	-
<b>1204</b>	<b>NE</b>	+	+	-	+	+
1205	NE	-	-	-	-	-
1206	NE	-	-	-	-	-
1207	NE	+	+	-	+	-
1208	NE	+	+	-	+	-
1209	NE	+	+	-	+	-
1210	NE	-	-	-	-	-
1211	NE	-	-	-	-	-
1212	NE	-	-	-	-	-
1213	NE	+	+	-	+	-
1214	NE	+	+	-	+	-
1215	NE	+	+	-	+	-
1216	NE	-	-	-	-	-
1217	NE	-	-	-	-	-

1218	NE	+	+	-	-	-
1219	NE	+	+	-	-	-
1220	NE	-	-	-	-	-
1222	NE	+	+	-	-	-
1269	NE	-	-	-	-	-
1270	NE	-	-	-	-	-

Tabela 2. Avaliação qualitativa da fixação biológica do nitrogênio atmosférico usando os meios NFB e JNFB e solubilização do fósforo dos meios de cultura Hoyos, NBRIP e Pikosvskaya, + (positivos) e - (negativos).

A partir desses resultados qualitativos, foram escolhidos seis isolados que apresentaram positivos em quatro avaliações, visto que nenhum apresentou cinco positivos, ou seja, positivo em todos os testes. A partir das análises morfológicas, estes isolados foram classificados como *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp., não sendo possível determinar as espécies. Os seis isolados eram compostos de três *Bacillus* e três isolados não esporulantes, de vegetação e regiões diferentes (Tabela 3). Com esses isolados selecionados foram realizadas as avaliações quantitativas de fixação de nitrogênio e solubilização de fósforo de fosfatos naturais.

Código	Cultura de origem	Local de coleta	Classificação	Fixação de nitrogênio		Solubilização de fósforo		
				meios de cultura		meios de cultura		
				NFB	JNFB	H	N	P
107	Algodão	Serra da Petrovina-MT	<i>Bacillus</i>	+	+	+	+	-
226	Milho	Santarém-PA	<i>Bacillus</i>	+	-	+	+	+
337	Café	Muzambinho-MG	<i>Bacillus</i>	+	+	+	+	-
810	Mata Atlântica	Parque E. Carlos Botelho- SP	NE	+	+	-	+	+
891	Solo Cerrado	Rio Verde - Go	NE	+	+	-	+	+
1204	Solo Amazônico	Manaus - AM	NE	+	+	-	+	+

Tabela 3. Características dos isolados selecionados para os ensaios qualitativos de fixação biológica de nitrogênio atmosférico e solubilização de fósforo dos fosfatos naturais. NE (bactérias não esporulantes), + (positivos) e - (negativos).

### 3.3.1 Avaliação quantitativa da fixação biológica do nitrogênio atmosférico pelos isolados bacterianos

A avaliação quantitativa do nitrogênio inorgânico nas amostras dos meios de cultivo foi realizada por titulação da amostra com ácido sulfúrico e os resultados encontram-se nas Figuras 4 e 5.

No meio NFB, o isolado de *Bacillus* com menor quantidade média de nitrogênio inorgânico foi o 337, com 433,54ug, seguido do isolado 107, com 524,19ug e o isolado com maior valor foi o 226, com 949,86ug, mais que o dobro do isolado 337. Já para os isolados não esporulantes, os valores foram superiores, de modo geral. O isolado 810 foi aquele que apresentou menor quantidade de nitrogênio inorgânico nas amostras, com 835,56ug em média, seguido dos isolados 1204 e 891, com 1170,57ug e 1178,45ug, respectivamente (Figura 4).

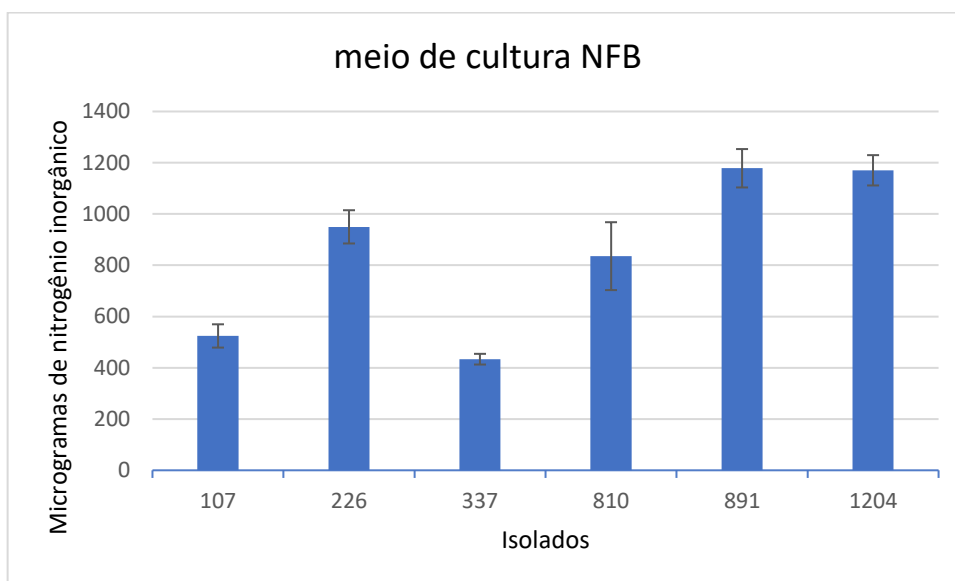


Figura 4. Média de nitrogênio inorgânico dissolvido nas amostras do meio de cultura NFB após 7 dias de cultivo com os isolados. *Bacillus* spp. (107, 226 e 337) e bactérias não esporulantes (810, 891 e 1204).

A quantidade de nitrogênio inorgânico encontrado no meio JNFB foi superior para todos os isolados quando comparado ao meio de cultura NFB e seguiu o mesmo padrão em ambos os meios. Os isolados não esporulantes 891 e 1204 tiveram a maior quantidade de nitrogênio inorgânico com a média de 3.468,36ug e 3.401,35ug, respectivamente. No caso dos *Bacillus*, a maior quantidade foi encontrada nos meios



cultivados com os isolados 226, com 3.291,00ug seguido do isolado 337, com 1.265,16ug (Figura 5).

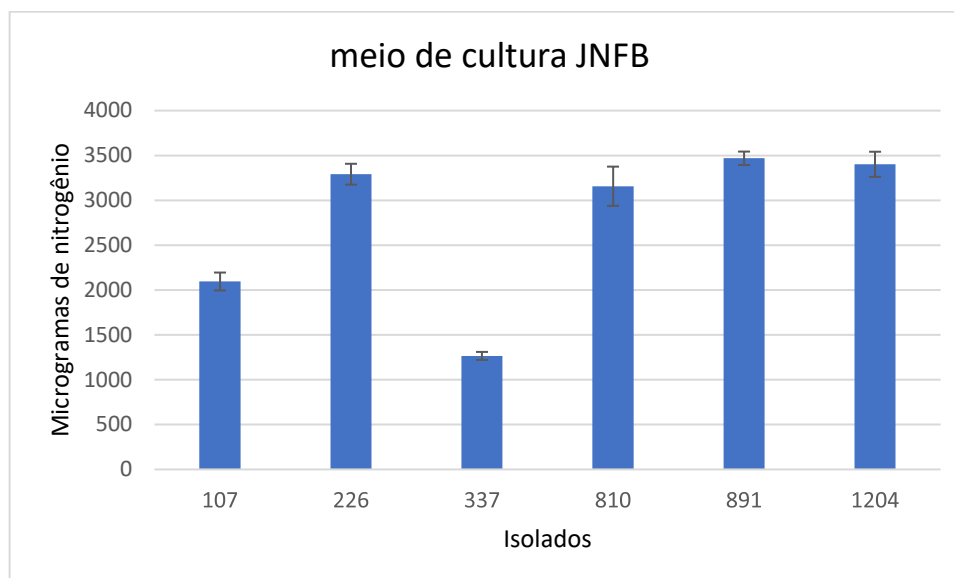


Figura 5. Média de nitrogênio inorgânico dissolvido nas amostras do meio de cultura JNFB após 7 dias de cultivo com os isolados. *Bacillus* spp. (107, 226 e 337) e bactérias não esporulantes (810, 891 e 1204).

Para a quantificação indireta do nitrogênio orgânico foi realizada a reação de Bradford para quantificação de proteínas totais. De acordo com a figura 6, os isolados classificados como *Bacillus* tiveram uma média muito superior aos isolados não esporulantes. Uma das hipóteses dessa diferença pode ser a maior quantidade de biofilme formada por esses isolados, pois sempre aparentam estar numa matriz viscosa. Como visto anteriormente para o nitrogênio inorgânico, os isolados 107 e 226 apresentaram um valor superior ao isolado 337. O isolado 107 produziu 1,26 mg/mL no meio NFB e 1,36 mg/mL no meio JNFB, enquanto o isolado 226 produziu 1,3mg/mL e 0,55mg/mL nesses meios. O padrão da produção das proteínas presentes nos meios de cultivo dos isolados não esporulantes foi semelhante. Neste caso, os isolados 891 e 1204 tiveram valores médios maiores, com 0,28mg/mL e 0,7mg/mL e 0,44mg/mL e 0,48mg/mL, respectivamente (Figura 6).

A partir dos resultados da presença de nitrogênio inorgânico e orgânico nos meios, foram escolhidos os dois isolados de cada grupo das bactérias com maiores valores de produção para a continuação dos estudos. Assim foram escolhidos os isolados 107 e 226 como representantes dos *Bacillus* e 891 e 1204 como representantes do grupo de bactérias não esporulantes.

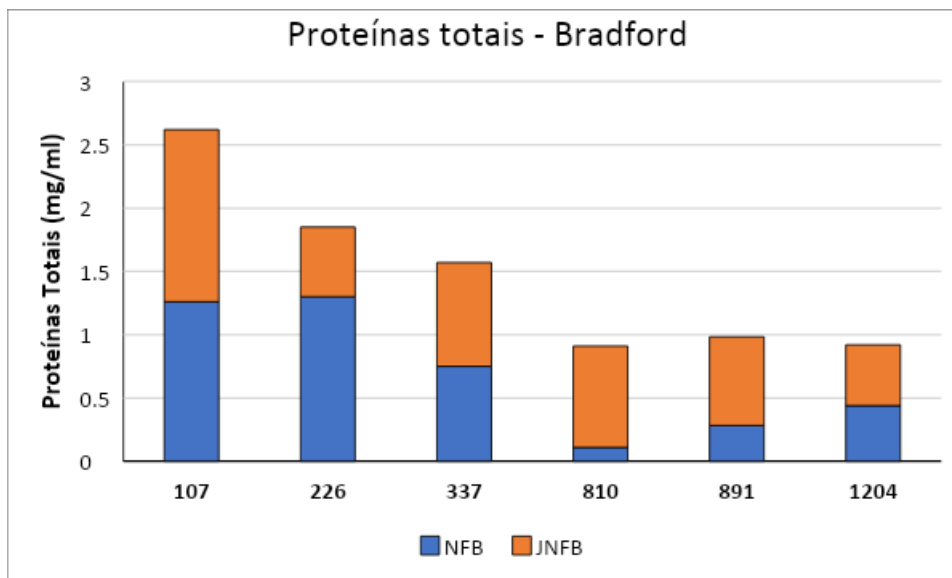


Figura 6. Média de proteínas totais nas amostras dos meios de cultura NFB e JNFB após 7 dias de cultivo com os isolados. *Bacillus* spp. (107, 226 e 337) e bactérias não esporulantes (810, 891 e 1204).

### 3.3.2 Avaliação quantitativa da solubilização de fósforo natural reativo pelos isolados bacterianos

No cultivo dos isolados bacterianos foram utilizados como fonte de fósforo dois fosfatos naturais para validar os resultados qualitativos dos meios com reagentes de fósforos insolúveis, o fosfato natural reativo de Araxá e o fosfato natural reativo Bayovar. O fosfato de Araxá é o grupo de rocha fosfatada com o maior percentual de  $P_2O_5$  do Brasil e a maior matéria-prima na produção de fertilizantes fosfatados no país, enquanto o fosfato reativo de Bayovar apresenta solubilidade intermediária entre as fontes de fósforo naturais e é a maior mina de extração de fosfato no Peru.

Para os isolados testados, foi liberado mais fósforo no meio quando utilizada fonte Bayovar, devido a maior concentração e solubilidade natural, com exceção do controle *P. agglomerans* (Figura 7). O fósforo disponibilizado quando a fonte de fósforo era o fosfato natural reativo de Araxá variou de 10,21 mg/kg a 16,72 mg/kg, onde os microrganismos 226 e 891 tiveram um melhor desempenho que os demais. Já quando a fonte de fósforo foi o fosfato natural reativo Bayovar, a liberação foi de 23,17 mg/kg a 28,15 mg/kg. Nessa condição, o isolado 107 foi o que apresentou maior solubilização de P quando comparado aos demais, seguido do isolado 1204 e 891.

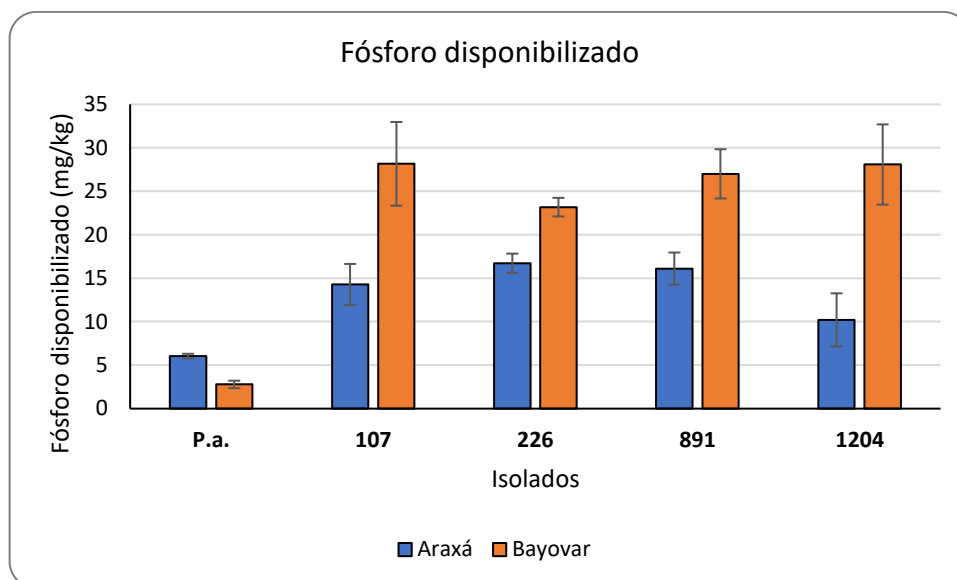


Figura 7. Média do fósforo disponibilizado nas amostras dos meios de cultura contendo uma única fonte de fósforo, fosfato natural de Araxá ou Bayovar, após 7 dias de cultivo com os isolados. *Pantoea agglomerans* (P.a.) *Bacillus* spp. (107 e 226) e bactérias não esporulantes (891 e 1204).

Os valores de fósforo solubilizado pelos microrganismos garantem a disponibilidade do fósforo, já que Abreu (2014) testou microrganismos endofíticos com essa habilidade para diferentes tipos de rocha e conseguiu valores de 6,63 a 32,93 mg L<sup>-1</sup> P disponibilizado quando usada a fonte fosfatada de Araxá.

### 3.4 Teste de produção de biofilme e EPS

Os resultados na tabela 4 mostram que todos os isolados foram produtores de biofilme, com índice de 1,1 para ambos isolados classificados como não esporulantes e de 2,7 e 2,1 para os isolados 107 e 226, respectivamente, classificados como *Bacillus*. Esse índice é considerado como moderadamente produtor de biofilme, característica comum do grupo. Já para a produção de exopolissacarídeos todos os isolados precipitaram na reação de etanol, mostrando a produção desses compostos. Essa característica pode ser importante para bactérias que serão base de bioprodutos aplicados no solo, já que o biofilme pode ser constituído de mais de 50% de EPS, mantendo as células hidratadas e a comunicação entre células. A próxima etapa desse experimento é avaliar a quantidade de EPS produzida, já que no teste qualitativo todos isolados foram positivos.

P.a	107	226	891	1204
1,3	2,7	2,1	1,1	1,1

Tabela 4. Índice de produção de biofilme dos isolados bacterianos. *Pantoea agglomerans* (P.a.) *Bacillus* spp. (107 e 226) e bactérias não esporulantes (891 e 1204).

### 3.5 Teste de produção de ácido indolacético (AIA)

Os quatro isolados bacterianos produziram auxinas, de acordo com a figura 8. A auxina comercial é um ácido indolacético e após a reação com o reagente de Salkowsky o meio apresenta-se em cor rosa e varia a intensidade de acordo com a concentração. Os isolados 226 e 1204 tiveram coloração rósea, com concentrações de 57,36 e 151,90 ug/mL de AIA. Os isolados que mais tiveram reação foram o 107 e o 891, com 228,87 e 215,84 ug/mL, porém esses isolados tiveram uma coloração mais alaranjada que os demais, indicando a presença de outra ou outras auxinas além do ácido indolacético, podendo ser ácido cloroindolacético, fenilacético, indolbutírico ou indolpropiónico. Como controle foi utilizado o isolado de *P. agglomerans* (P.a.).

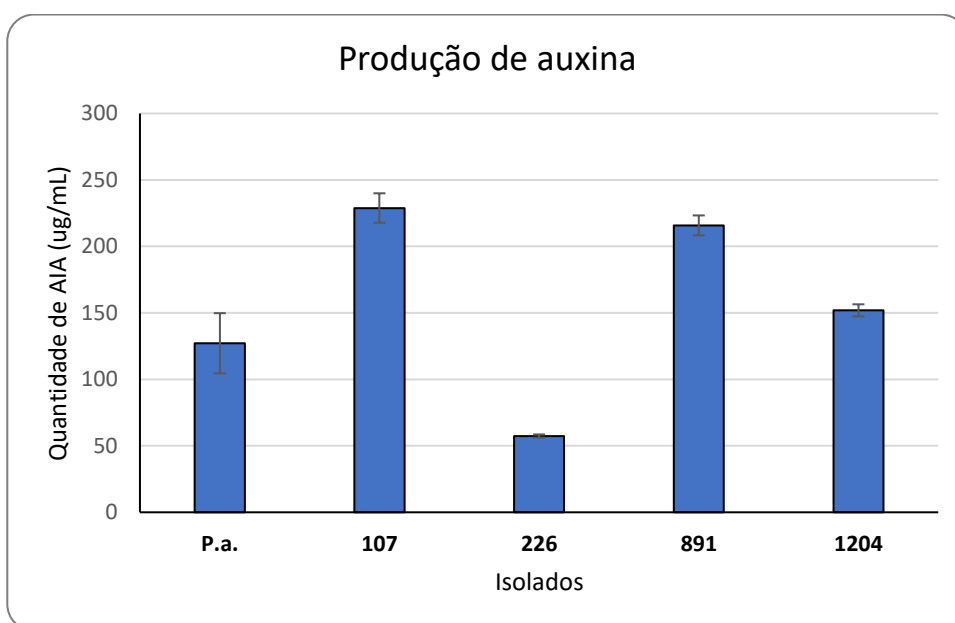


Figura 8. Média de auxina produzida pelos isolados bacterianos. *Pantoea agglomerans* (P.a.) *Bacillus* spp. (107 e 226) e bactérias não esporulantes (891 e 1204).

### 3.6 Identificação molecular dos isolados

Os isolados selecionados tiveram a região 16S sequenciadas e os eletroferogramas foram avaliados. Não foi possível determinar as espécies, uma vez que o marcador utilizado o foi suficiente para classificar o gênero, mas não a espécie, sendo necessário utilizar marcadores de outras regiões gênicas e realizar análises filogenéticas para verossimilhança. Genes específicos de identificação dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* devem ser incluídos para uma maior confiabilidade.

Isolado	Classificação	% de identidade 16S
107	<i>Priestia aryabhattai</i> / <i>Priestia megaterium</i>	98%
226	<i>Enterobacter asburiae</i>	96%
891	<i>Pseudomonas paralactis</i> / <i>Pseudomonas fluorescens</i>	98%
1204	<i>Pseudomonas taiwanensis</i> / <i>Pseudomonas putida</i>	98%

### 3.7 Ensaio de promoção de crescimento em solos com limitação de nitrogênio e fósforo

Os resultados do ensaio de promoção de crescimento de plantas de milho em vasos utilizando a pulverização dos microrganismos no sulco de plantio estão apresentados nas figuras de 9 a 13.

Para o parâmetro altura das plantas o maior incremento na aplicação dos microrganismos ocorreu no tratamento controle, onde não foi realizada adubação nitrogenada e fosfatada. Neste caso, enquanto a média sem microrganismo era de 4,5 cm, onde foram aplicados os microrganismos a altura média foi de 6,5 a 9,8 cm, com destaque para o isolado 891. Não houve incremento de altura no tratamento STP90, onde tanto o fósforo quanto o nitrogênio foram corrigidos próximo ao requerimento nutricional das plantas. O isolado 107 não promoveu incremento na altura das plantas, porém todos os demais isolados promoveram incrementos nos tratamentos com correção de 30% e 60% das fontes de N e P (independente da fonte). Dentre os tratamentos, aquele que teve maior aumento foram as plantas na condição de 30% de N e P solúvel (Figura 9).

O número médio de folhas por planta segue a mesma tendência da altura. No controle sem adubação, o número de folhas por planta onde os isolados foram aplicados sempre foram maiores, com diferença até de 92% a mais (isolado 891). Novamente o 90% de adubação de N e P solúvel não houve aumento com a aplicação dos isolados e o tratamento que mais foi beneficiado foi o 30% de N e P solúvel. O número de folhas foi maior, atingindo até 50% mais folhas. Os demais tratamentos tiveram efeitos positivos, de 3% a 19% mais folhas com a aplicação dos isolados (Figura 10).

Os microrganismos tiveram um impacto significativo no teor de clorofila das plantas, especialmente nos tratamentos com 30% de N e P solúvel. O isolado 1204 destacou-se com um aumento de 60% no teor de clorofila, seguido pelos isolados 107 (50%), 891 (46%) e 226 (11%) (Figura 11). Esses aumentos sugerem uma melhoria na eficiência fotossintética, potencialmente resultando em maior acúmulo de biomassa e produtividade ao longo do ciclo da cultura.

A medição da área foliar mostrou o maior impacto na aplicação dos microrganismos (Figura 12). No controle, sem adubação, a área foliar média da planta foi de 14 cm<sup>2</sup> e com a aplicação do isolado 891 essa média subiu para 77 cm<sup>2</sup> (um aumento de 450%). O isolado com menor área foliar foi o 107, com 39 cm<sup>2</sup>, o que representa 181% de aumento. Nos demais tratamentos, o isolado 107 não se mostrou eficiente na promoção do crescimento foliar das plantas, enquanto os outros três isolados testados foram altamente eficientes, com destaque para os isolados 891 e 226 que, apresentaram maiores incrementos na área foliar (30% e 40%, respectivamente) no tratamento com maior dosagem de adubação. Com o aumento da área foliar, pode-se projetar ganhos em produtividade em um ciclo completo da cultura, com maiores taxas de fotossíntese, acúmulo de biomassa e enchimento de grãos.

A massa seca das raízes também foi um parâmetro com um alto incremento (Figura 13). A média da massa das raízes do controle sem microrganismo foi de 0,274g enquanto a média do tratamento com aplicação do isolado 891 foi de 0,555g.

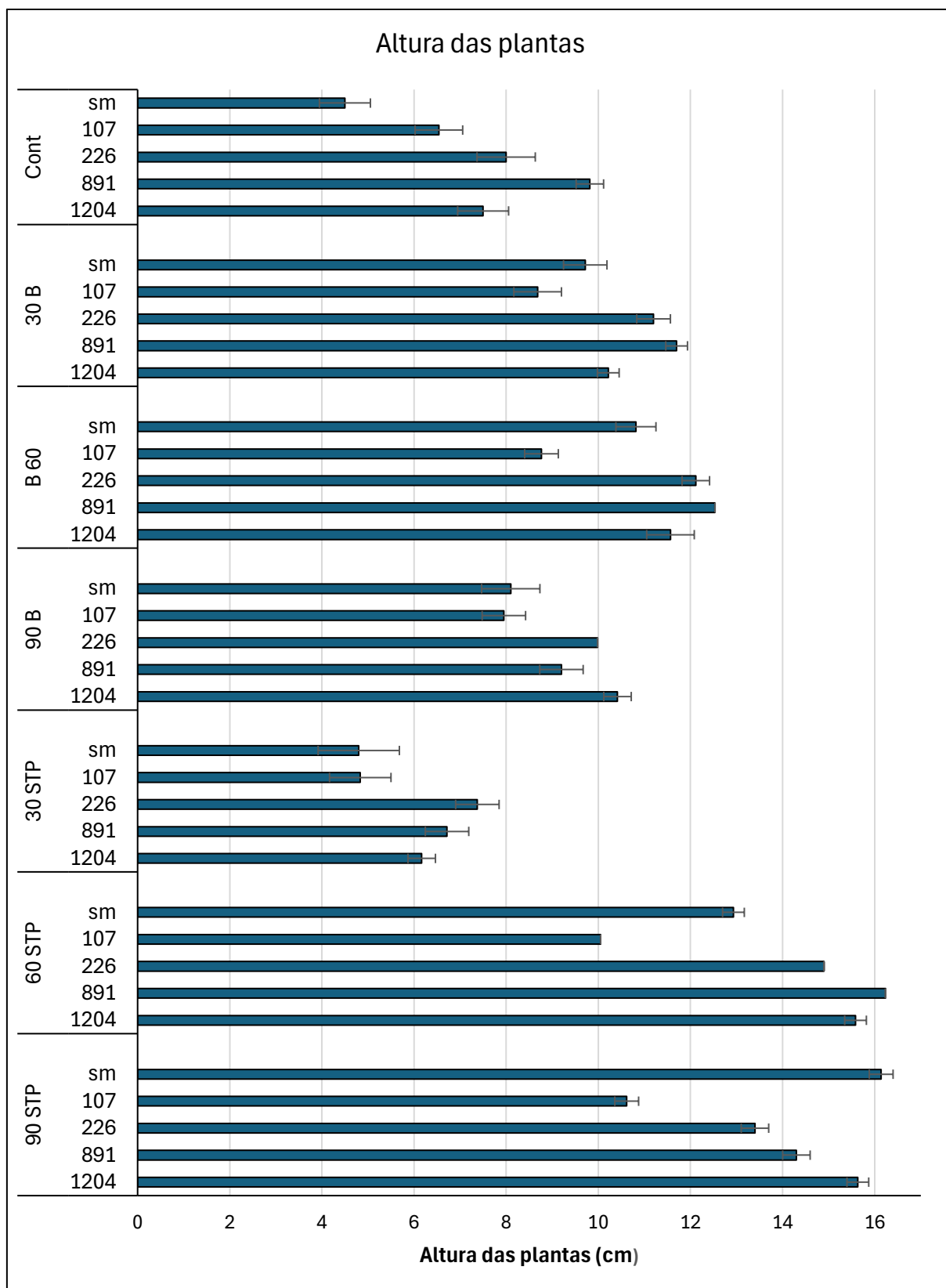


Figura 9. Altura das plantas de milho cultivadas em diferentes regimes de adubação aos 30 dias após o plantio e inoculação dos microrganismos. Tratamentos: Cont (controle sem adubação), 30B, 60B e 90B (Adubação com o fosfato natural reativo Bayovar e sulfato de amônio nas concentrações de 30, 60 e 90% da recomendação de P e N) e 30STP, 60STP e 90STP (Adubação com o superfosfato triplo e sulfato de amônio nas concentrações de 30, 60 e 90% da recomendação de P e N). *Bacillus* spp. (107 e 226), bactérias não esporulantes (891 e 1204) e sem microrganismo (SM).

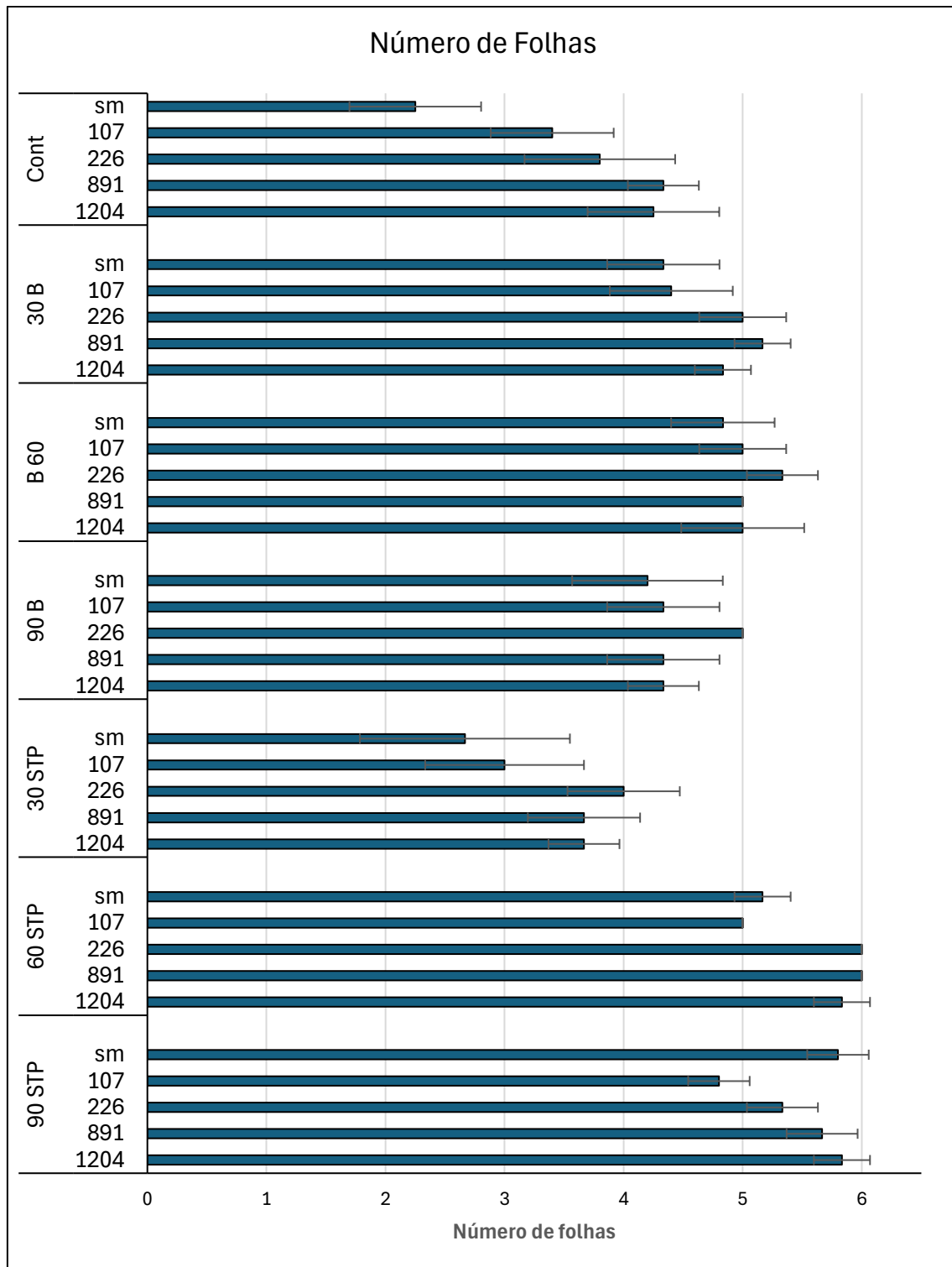


Figura 10. Número de folhas das plantas de milho cultivadas em diferentes regimes de adubação aos 30 dias após o plantio e inoculação dos microrganismos. Tratamentos: Cont (controle sem adubação), 30B, 60B e 90B (Adubação com o fosfato natural reativo Bayovar e sulfato de amônio nas concentrações de 30, 60 e 90% da recomendação de P e N) e 30STP, 60STP e 90STP (Adubação com o superfosfato triplo e sulfato de amônio nas concentrações de 30, 60 e 90% da recomendação de P e N). *Bacillus* spp. (107 e 226), bactérias não esporulantes (891 e 1204) e sem microrganismo (SM).



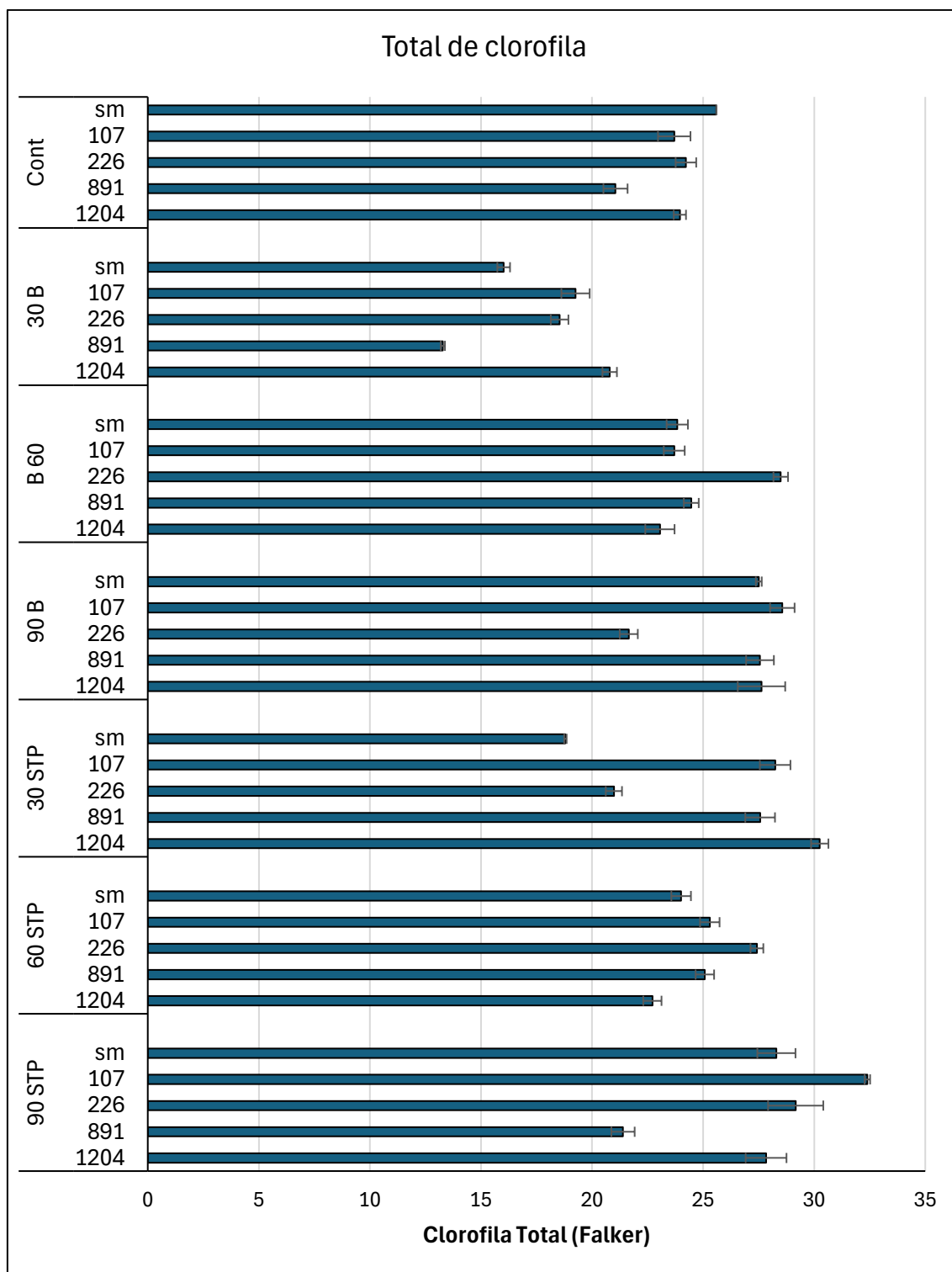


Figura 11. Teor de clorofila das folhas +2 das plantas de milho cultivadas em diferentes regimes de adubação aos 30 dias após o plantio e inoculação dos microrganismos. Tratamentos: Cont (controle sem adubação), 30B, 60B e 90B (Adubação com o fosfato natural reativo Bayovar e sulfato de amônio nas concentrações de 30, 60 e 90% da recomendação de P e N) e 30STP, 60STP e 90STP (Adubação com o superfosfato triplo e sulfato de amônio nas concentrações de 30, 60 e 90% da recomendação de P e N). *Bacillus* spp. (107 e 226), bactérias não esporulantes (891 e 1204) e sem microrganismo (SM).

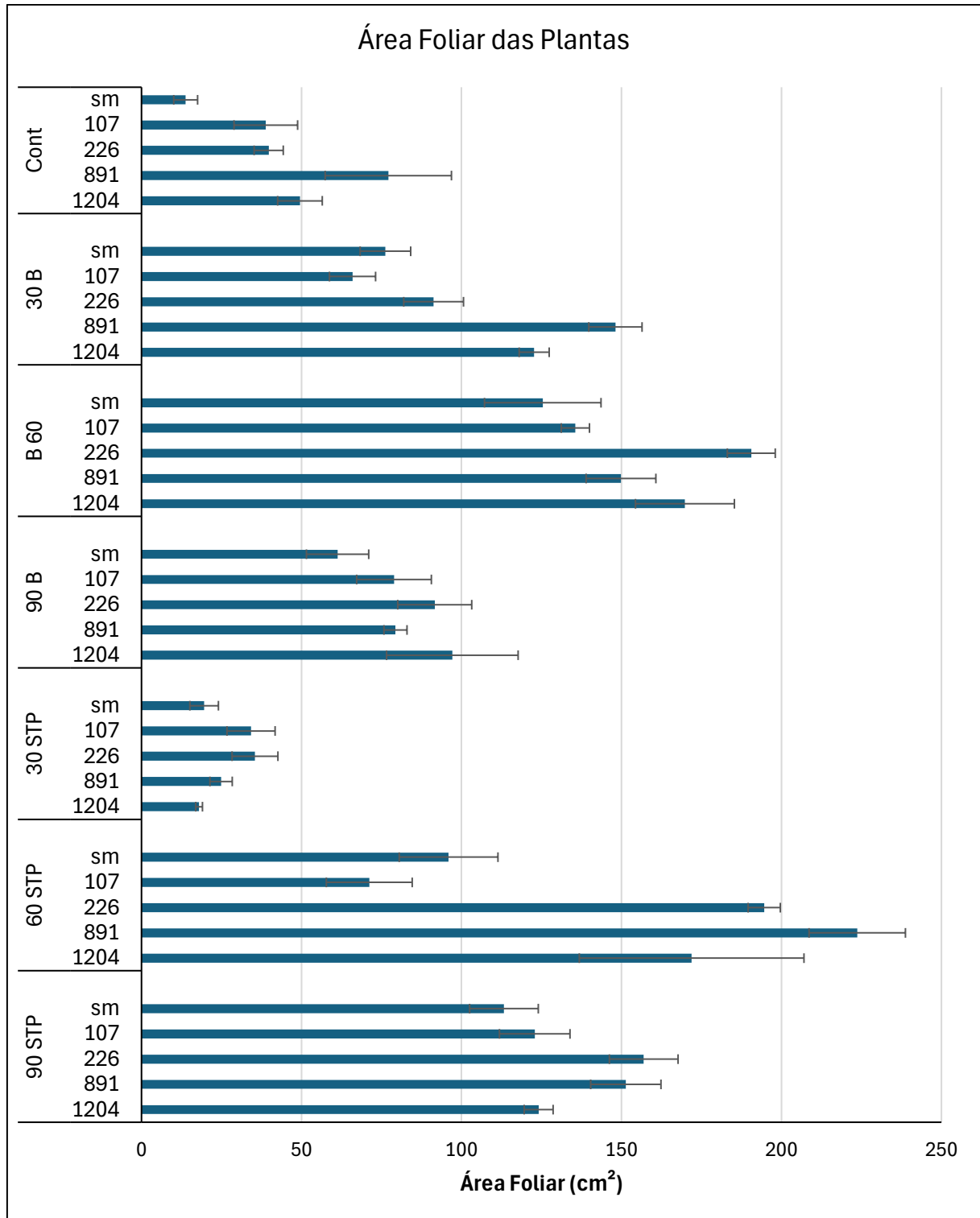


Figura 12. Área foliar das plantas de milho cultivadas em diferentes regimes de adubação aos 30 dias após o plantio e inoculação dos microrganismos. Tratamentos: Cont (controle sem adubação), 30B, 60B e 90B (Adubação com o fosfato natural reativo Bayovar e sulfato de amônio nas concentrações de 30, 60 e 90% da recomendação de P e N) e 30STP, 60STP e 90STP (Adubação com o superfosfato triplo e sulfato de amônio nas concentrações de 30, 60 e 90% da recomendação de P e N). *Bacillus* spp. (107 e 226), bactérias não esporulantes (891 e 1204) e sem microrganismo (SM).

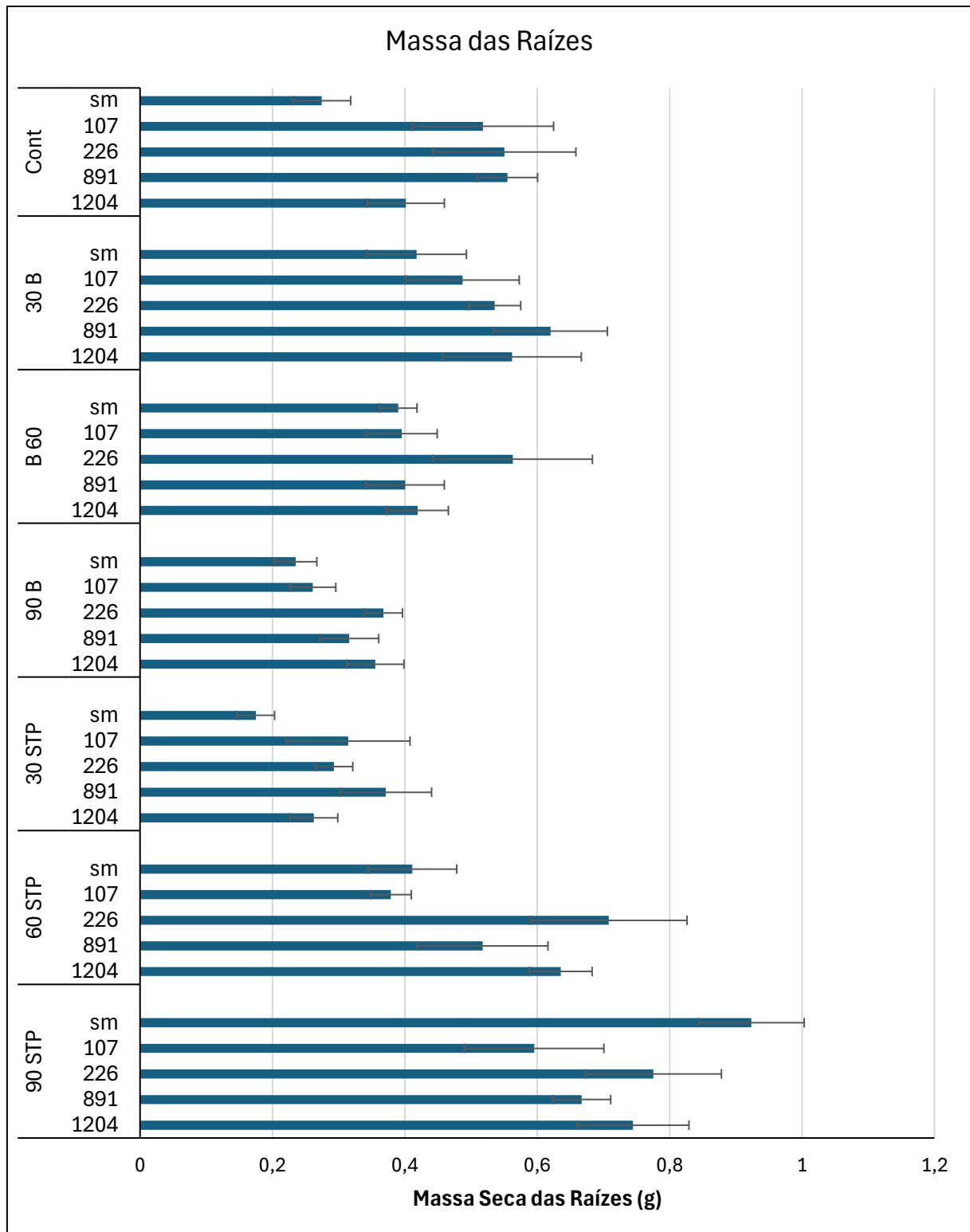


Figura 13. Massa seca das raízes das plantas de milho cultivadas em diferentes regimes de adubação aos 30 dias após o plantio e inoculação dos microrganismos. Tratamentos: Cont (controle sem adubação), 30B, 60B e 90B (Adubação com o fosfato natural reativo Bayovar e sulfato de amônio nas concentrações de 30, 60 e 90% da recomendação de P e N) e 30STP, 60STP e 90STP. *Bacillus* spp. (107 e 226), bactérias não esporulantes (891 e 1204) e sem microrganismo (SM).

Nessa condição, todos os isolados promoveram aumento das raízes, o que pode ser visto na figura 14. No tratamento com a maior dosagem da adubação não houve incremento das raízes quando aplicado os isolados, já nos demais tratamentos houve ganhos na massa das raízes, com destaque aos tratamentos com a fonte de fósforo solúvel, onde é possível observar os maiores ganhos, com aumentos de 50% e 70% (isolados 1204 e 226, respectivamente). Esses resultados indicam que a inoculação com microrganismos pode melhorar a saúde radicular, aumentando a capacidade das plantas de absorver nutrientes e água, essencial para o crescimento e desenvolvimento geral das plantas.

Os resultados mostram que os microrganismos, especialmente os isolados 891 e 1204, têm um grande potencial para promover o crescimento de plantas de milho em condições de baixa disponibilidade de nutrientes. Os aumentos na altura das plantas, número de folhas, área foliar, teor de clorofila e massa seca das raízes indicam uma melhoria geral na saúde das plantas. Em solos com adubação adequada, os efeitos foram menos pronunciados, sugerindo que a principal vantagem da aplicação de microrganismos ocorre em condições de limitação nutricional. A ação dos microrganismos nas plantas sem adubação é evidenciada na figura 14, com maiores alturas de plantas, áreas foliares e raízes mais desenvolvidas quando comparada com o controle sem microrganismo. Nas figuras 15 e 16 é possível observar o crescimento das plantas proporcionadas pelos isolados testados, com plantas mais vigorosas. Já na figura 17, onde a adubação supri as necessidades da planta, os efeitos da aplicação dos microrganismos não são tão visíveis. As plantas inoculadas com os microrganismos com a fonte de fósforo sendo o Bayovar, nota-se resultados semelhantes, porém menos perceptíveis quando comparadas com a fonte solúvel de fósforo.



Figura 14: Tratamento controle, sem nenhuma dose de adubação nitrogenada e fosfatada.



Figura 15: Tratamento 30 STP, com dosagem de 30% de nitrogênio e superfosfato triplo.

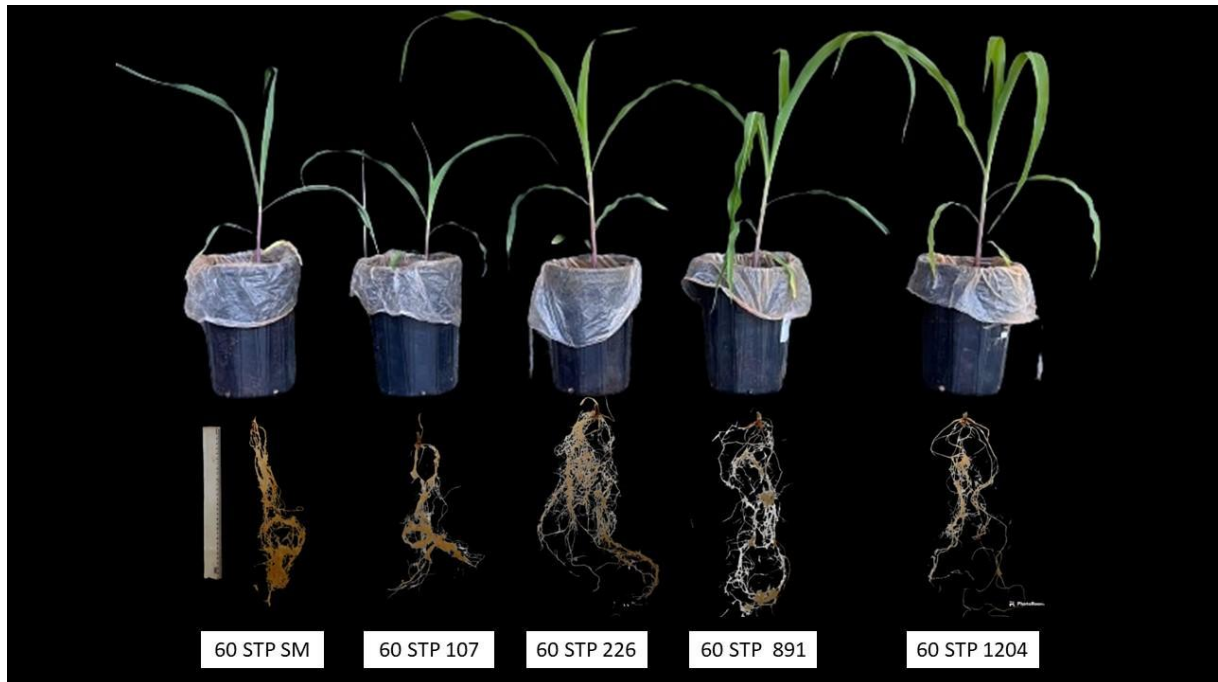


Figura 16: Tratamento 60 STP, com dosagem de 60% de nitrogênio e superfosfato triplo.

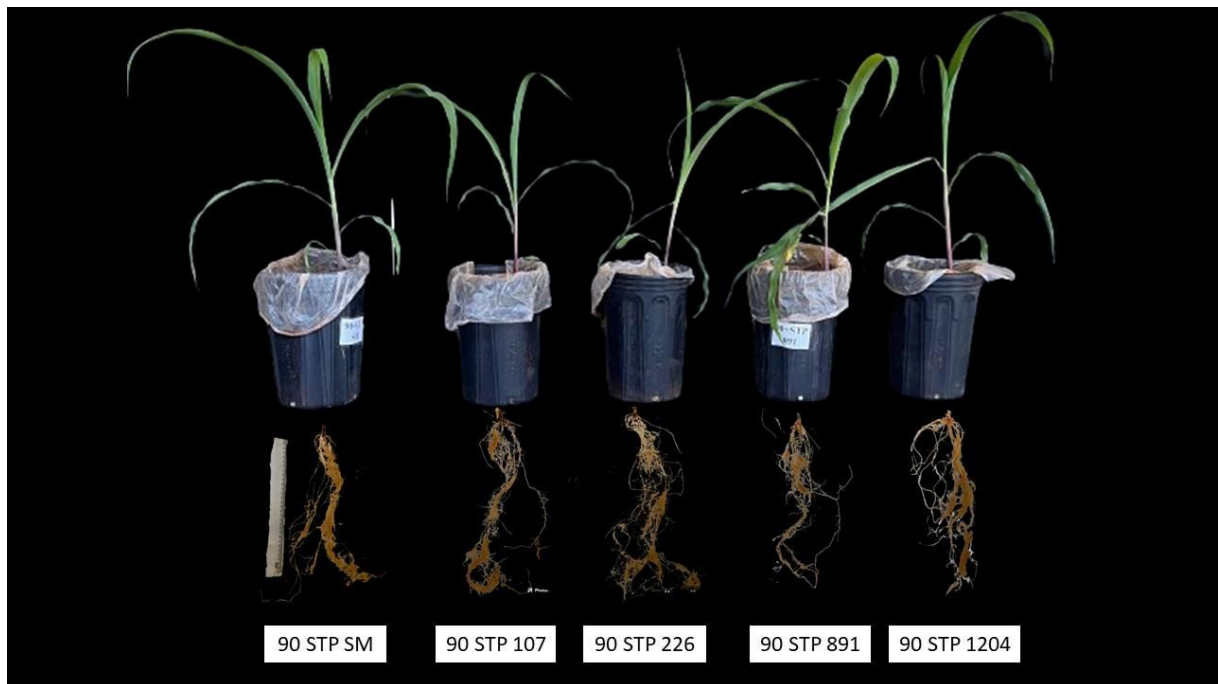


Figura 17: Tratamento 90 STP, com dosagem de 90% de nitrogênio e superfosfato triplo.

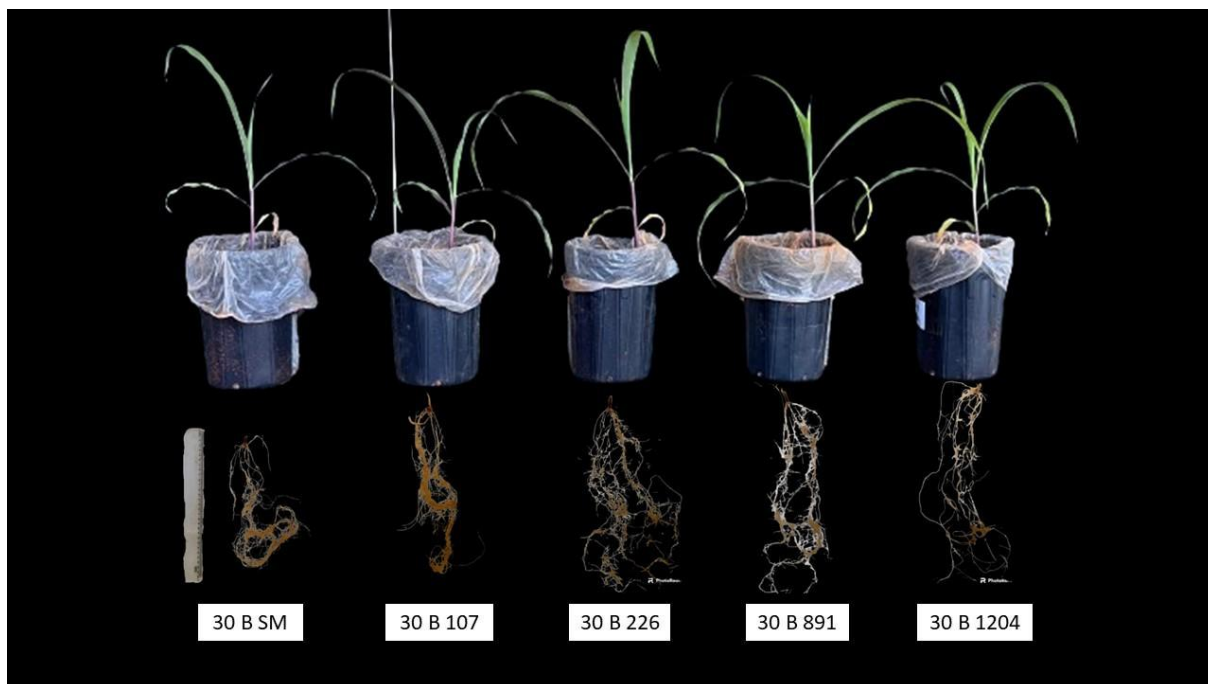


Figura 18: Tratamento 30 B, com dosagem de 30% de nitrogênio e fósforo natural reativo Bayovar.

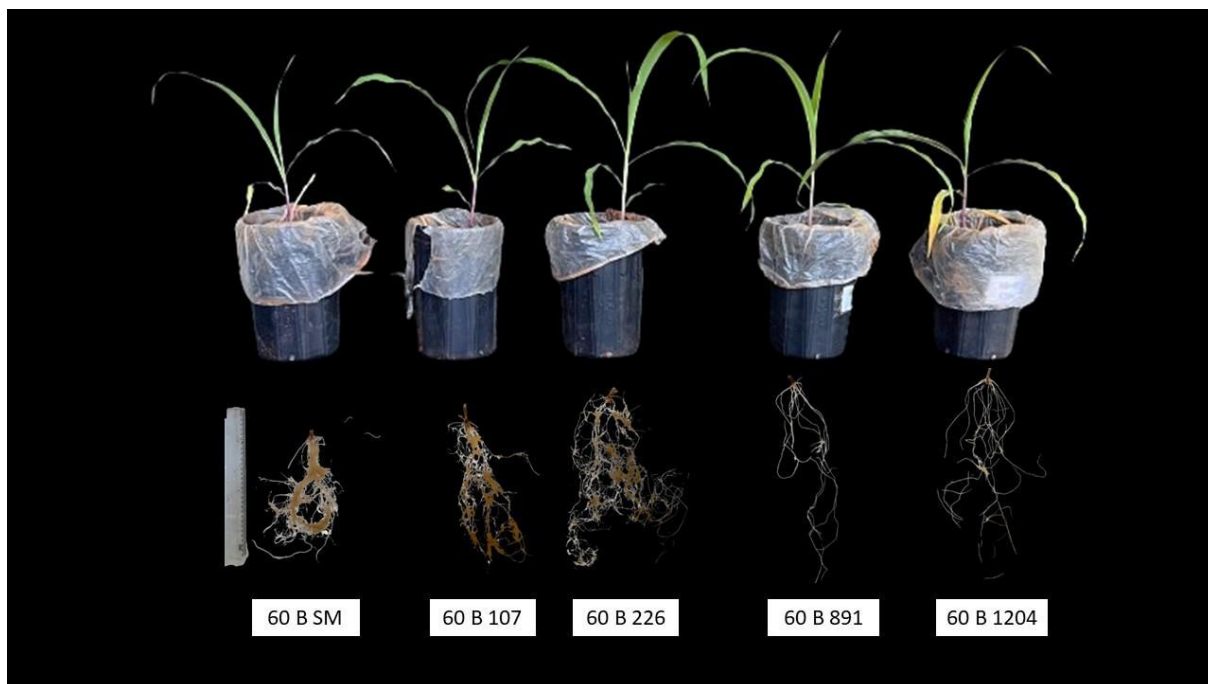


Figura 19: Tratamento 60 B, com dosagem de 60% de nitrogênio e fósforo natural reativo Bayovar.



Figura 20: Tratamento 90 B, com dosagem de 90% de nitrogênio e fosfato natural reativo Bayovar.

#### 4 CONCLUSÃO

O experimento em vasos demonstrou que a aplicação dos isolados bacterianos testados em sulco de plantio de milho pode promover aumento significativos no crescimento das plantas em solos com baixa concentração de nitrogênio e fósforo. Os isolados, especialmente o 891, mostraram um aumento notável na altura das plantas, no número de folhas, na área foliar e na massa seca das raízes. No entanto, em solos com adubação próxima ao requerimento nutricional das plantas, o efeito dos microrganismos foi menos evidente. Assim, a utilização desses microrganismos é promissora para melhorar a produtividade em condições de baixa fertilidade, potencializando o crescimento e a eficiência nutricional das plantas de milho. Os resultados indicam que a inoculação pode ser uma estratégia eficaz para promover o crescimento e a produtividade do milho em solos com limitações de nutrientes, e sua aplicação pode ser uma estratégia com potencial para reduzir o uso de fontes fosfatadas solúveis e para aproveitar o fósforo residual presentes nos solos.

Os microrganismos testados são capazes de melhorar a absorção de nutrientes e promover o crescimento das plantas, podendo levar a maiores produtividades em



sistemas de cultivo com menor impacto ambiental. Além disso, os ganhos nos parâmetros avaliados sugerem que as plantas são mais robustas e eficientes em suas funções fisiológicas, o que pode resultar em maiores produtividades. A aplicação desses microrganismos não só promoveu aumentos significativos nos parâmetros de crescimento, como também tem potencial para aproveitar o fósforo presente nos solos e disponibiliza-los para as plantas. Recomenda-se a continuidade de estudos para avaliar o impacto da aplicação dos microrganismos na produção dos grãos e o impacto a longo prazo e em diferentes condições edafoclimáticas, visando a otimização do uso de microrganismos na agricultura.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, C. S. **Seleção e caracterização de bactérias endofíticas isoladas de plantas de milho com potencial para a biossolubilização de rochas fosfáticas**. 2014. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei, 2014. Disponível em: <[https://ufsj.edu.br/portal2-repositorio/File/ppgca/DISSERTACAO%20CRISIA\(2\).pdf](https://ufsj.edu.br/portal2-repositorio/File/ppgca/DISSERTACAO%20CRISIA(2).pdf)>. Acesso em: 18 jun. 2024.

AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, v. 26, n. 1, p. 1–20, 1 jan. 2014.

ALMEIDA, J. P.; VOLOTÃO, R. A. **Produção nacional de fertilizantes**. Disponível em: <[https://www.gov.br/planalto/acl\\_users/credentials\\_cookie\\_auth/require\\_login?came\\_from=https%3A/www.gov.br/planalto/pt-br/assuntos/assuntos-estrategicos/estudos-estrategicos-2/estudo-producao-nacional-fertilizantes](https://www.gov.br/planalto/acl_users/credentials_cookie_auth/require_login?came_from=https%3A/www.gov.br/planalto/pt-br/assuntos/assuntos-estrategicos/estudos-estrategicos-2/estudo-producao-nacional-fertilizantes)>. Acesso em: 27 maio 2024.

AMANULLAH; KHAN, A. Phosphorus and Compost Management Influence Maize (*Zea mays*) Productivity Under Semiarid Condition with and without Phosphate Solubilizing Bacteria. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 7 dez. 2015.

ANPII - Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes. **Consumo de inoculantes deve aumentar**. Disponível em: <http://www.anpii.org.br/consumo-de-inoculantes-deve-aumentar/>. Acesso em: 14 mai. 2024.

BACELO, H.; PINTOR, A. M. A.; SANTOS, S. C. R.; BOAVENTURA, R. A. R.; BOTELHO, C. M. S. *Chem. Eng. J.*, v. 381, p. 122566, 2020.

BAHADIR, P.; LIAQAT, F.; ELTEM, R. Plant growth promoting properties of phosphate solubilizing *Bacillus* species isolated from the Aegean Region of Turkey. **Turkish Journal of Botany**, v. 42, n. 2, p. 183–196, 1 jan. 2018.

BALSALOBRE, M. A. A.; SANTOS, P. M. **Fertilizante nitrogenado. 2. Possíveis efeitos sobre a saúde humana e o meio ambiente | MilkPoint**. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/artigos/producao-de-leite/fertilizante-nitrogenado-2-possiveis-efeitos-sobre-a-saude-humana-e-o-meio-ambiente-16097n.aspx>>. Acesso em: 27 mai. 2024.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth—A Critical Assessment. Em: SPARKS, D. L. (Ed.). **Advances in Agronomy**. [s.l.] Academic Press, 2010. v. 108p. 77–136.

BATISTA, B. D. et al. Draft Genome Sequence of Multitrait Plant Growth-Promoting *Bacillus* sp. Strain RZ2MS9. **Genome Announcements**, v. 4, n. 6, p. e01402-16, 22 dez. 2016.

BENDASSOLLI, J. A.; TRIVELIN, P. C. O.; IGNOTO, R. DE F. Produção de amônia anidra e aquamônia enriquecida em  $15\text{N}$  a partir de  $(15\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 595–603, 2002.

BJELIĆ, D.; MARINKOVIĆ, J.; TINTOR, B.; MRKOVAČKI, N. **Antifungal and plant growth promoting activities of indigenous rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) rhizosphere**. Communications in Soil Science and Plant Analysis, v. 49, n. 1, p. 88-98, 2018.

BICUDO, C. E.; TUNDISI, J. G.; SCHEUENSTUHL, M. C. **Águas do Brasil: Análises Estratégicas**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2010.

BOMFETI, C. A. et al. Exopolysaccharides produced by the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of leguminosae. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 35, n. 3, p. 657-671, May/June 2011.

CHEN, Y. et al. The application of phosphate solubilizing endophyte *Pantoea dispersa* triggers the microbial community in red acidic soil. **Applied Soil Ecology**, v. 84, p. 235–244, 1 dez. 2014.

COLOMBO, M. Produtividade do milho safrinha em função de fontes de nitrogênio e estádios de aplicação. 2017.

CORDELL, D.; WHITE, S. Life's Bottleneck: Sustaining the World's Phosphorus for a Food Secure Future. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 39, n. Volume 39, 2014, p. 161–188, 17 out. 2014.

DE SOUSA, S. M.; OLIVEIRA, C. A.; ANDRADE, D. L.; CARVALHO, C. G.; RIBEIRO, V. P.; PASTINA, M. M.; MARRIEL, I. E.; LANA, U. G. de P.; GOMES, E. A. **Tropical Bacillus Strains Inoculation Enhances Maize Root Surface Area, Dry Weight, Nutrient Uptake and Grain Yield**. Journal of Plant Growth Regulation, v. 40, n. 2, p. 867-877, 2020.

DIMKPA, C. O. et al. Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. **Chemosphere**, v. 74, n. 1, p. 19–25, dez. 2008.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas** Brasília: Embrapa-SPI, 1995. 60p.

DOMINGOS, J. B. et al. A química dos ésteres de fosfato. **Química Nova**, v. 26, p. 745–753, out. 2003.

FIGUEIREDO, M. D. V. B. et al. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Key Mechanisms of Action. Em: CHOUDHARY, D. K.; VARMA, A. (Eds.). **Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2016. p. 23–37.

FONSECA, M. C. C.; ZAGO, V. C. P.; FERREIRA, E. P.; CÂMARA, A. F. S.; RUMJANEK, N. G. **Isolamento e caracterização morfológica de *Pseudomonas* spp. fluorescentes nativas em sistemas de produção agrícola**. Embrapa, 2012. Folheto. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/623981>. Acesso em: 31 jul. 2024.

FRANCO, J. A. M.; SARAIVA NETO, A. **Produção de fertilizantes nitrogenados e suprimentos de matéria-prima**. In: **NITROGÊNIO e enxofre na agricultura brasileira**. Piracicaba: IPNI, 2007. p. 73-107.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 963401, 2012.

GLOBALFERT. **2º Report Anual do mercado de fertilizantes**. Disponível em: <https://globalfert.com.br/> Acesso em: 28 mai. 2024.

GOMES, E. A. et al. ROCK PHOSPHATE SOLUBILIZING MICROORGANISMS ISOLATED FROM MAIZE RHIZOSPHERE SOIL. **REVISTA BRASILEIRA DE MILHO E SORGO**, v. 13, n. 1, p. 69–81, 20 jul. 2014.

HAMEEDA, B. et al. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. **Microbiological Research**, v. 163, n. 2, p. 234–242, 2008.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; ELSAS, J. D. VAN. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 463–471, out. 2008.

HOYOS, V. H. A.; CHIARAMONTE, J. B.; BARBOSA-CASTELIANI, A. G.; FERNANDEZ MORAIS, J.; PEREZ-JARAMILLO, J. E.; NOBRE SANTOS, S.; NASCIMENTO QUEIROZ, S. C.; SOARES MELO, I. **An Actinobacterium Strain From Soil of Cerrado Promotes Phosphorus Solubilization and Plant Growth in Soybean Plants**. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, [S.l.], v. 9, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.579906/full>. Acesso em: 14 mai. 2024.

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

IFA. **O uso de fertilizantes minerais e o meio ambiente**. 2015. Disponível em: <https://www.fertilizer.org/>. Acesso em: 28 maio 2024

KASVI. **Meios cromogênicos: a próxima geração de meios de cultura**. Disponível em: <https://kasvi.com.br/meios-cromogenicos-a-proxima-geracao-de-meios-de-cultura/>. Acesso em: 5 jun. 2024.

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**, Nitrogen Fixation in

Australian Agricultural Systems: 13th Australian Nitrogen Fixation Conference. v. 36, n. 8, p. 1229–1244, 1 ago. 2004.

KHAN, A. R. et al. Complete genome analysis of *Serratia marcescens* RSC-14: A plant growth-promoting bacterium that alleviates cadmium stress in host plants. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0171534, 10 fev. 2017.

MAKHIJANI, A.; POOLE, A. **Energy and Agriculture in the Third World**. [s.l.] Ballinger Publishing Company, 1975.

MARRA, L. M. **Fungos e bactérias solubilizadores de fosfato inorgânico na promoção do crescimento de plantas**. 2012. 156 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MELO, L. **Bactéria do bem na soja - uso intensivo de biofertilizante pode gerar economia de US\$ 20 bilhões por ano em adubação química e ainda reduzir emissões de gás carbônico por safra**. 2018. Disponível em: <https://projetocolabora.com.br/conteudo-marca/bacteria-na-soja/>>. Acesso em: 20 maio 2024.

MELLO, J. W. V. **Influência dos fertilizantes fosfatados no comportamento de elementos-traço no solo**. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Solos, 2000.

MENDES, R. O dilema do fósforo na agricultura e o papel da microbiota do solo. 2021.

MENDONÇA, R. S. et al. **Selection of nitrogen-fixing bacteria for maize inoculation**. [s.l.: s.n.], 2010.

MOHITE, B. **Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth**. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, v. 13, n. 3, p. 638-649, 2013.

MOREIRA, Fátima Maria de Souza; SIQUEIRA, José Oswaldo; BRUSSAARD. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: ed. UFLA, 2008

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 27, p. 31–36, 1 jan. 1962.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265–270, 1 jan. 1999.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J. **FÓSFORO EM SOLO E PLANTA EM CONDIÇÕES TROPICAIS**. [s.d.].

OLIVEIRA, C. A. et al. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 1782–1787, 1 set. 2009.

OLIVEIRA, P. A. et al. **Potencial de bactérias endofíticas na promoção de crescimento vegetal e no biocontrole de fitopatógenos**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 52, n. 11, p. 997-1005, 2017.

- OLANREWAJU, O. S. et al. **Endophytic and rhizospheric phosphate solubilizing bacteria and their potential use in organic farming**. Geomicrobiology Journal, v. 35, n. 6, p. 511-519, 2018.
- OLIVEIRA JÚNIOR, A. DE; PROCHNOW, L. I.; KLEPKER, D. Soybean yield in response to application of phosphate rock associated with triple superphosphate. **Scientia Agricola**, v. 68, p. 376–385, jun. 2011.
- OSVALD, W. et al. **Yield and nutrient content in maize plants fertilized with mineral nitrogen and treated with inoculation**. Journal of Environmental Biology, v. 37, p. 1045-1049, 2016.
- PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 207–220, mar. 1996.
- PAULA, A. C. S. DE. Diagnóstico estratégico da indústria de fertilizantes nitrogenados no Brasil. fev. 2020.
- PAULO, E. M. et al. An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, p. 710-714, 2012.
- PAVINATO, P. S. et al. Revealing soil legacy phosphorus to promote sustainable agriculture in Brazil. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 15615, 28 set. 2020.
- PESSOA, A. C. S.; LUCHESE, E. B.; LUCHESE, A. V. Germinação e desenvolvimento inicial de plantas de milho, em resposta ao tratamento de sementes com boro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 4, p. 939–945, dez. 2000.
- PEREIRA, C. E. G.; MELO, G. W. B. **Adubação foliar: situação atual e perspectivas futuras**. Embrapa Uva e Vinho - Capítulo em livro técnico (INFOTECA-E), 2007.
- PIKOVSKAYA, R. **Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species**. 1948. Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Mobilization-of-phosphorus-in-soil-in-connection-of-Pikovskaya-Pikovskaya/8e97d2ce9a1f74e027597915f357c0277976f887>>. Acesso em: 13 jun. 2024
- QUESADA, D. M. et al. **Promotores do crescimento vegetal: uma revisão atualizada**. Revista de Ciências Agrárias - Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences, v. 54, n. 2, p. 231-238, 1 jun. 2011.
- RAJ, S. A.; MARY, A.; POKHREL, L. R. **Biochars as alternative fertilizers: From agricultural and environmental benefits to multifaceted risks**. Sustainability, v. 11, n. 8, p. 2495, 2019.
- REETZ, H. F. **Fertilizers and their efficient use**. Paris: International Fertilizer industry Association, IFA, 2016.
- RENÉ, F. et al. **Improving microbial activity with different concentrations of phosphate**. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 19, n. 2, p. 507-510, 2009.

RIBEIRO, J. E. et al. **Polímeros**. Artigo de divulgação científica. Disponível em: <[http://revista.iq.unesp.br/wp-content/uploads/vol30\\_n1\\_2018/v30\\_n1\\_06.pdf](http://revista.iq.unesp.br/wp-content/uploads/vol30_n1_2018/v30_n1_06.pdf)> Acesso em: 25 maio 2024.

ROCHA, F. P.; MARTINS, A. D. **Impacto ambiental dos fertilizantes**. Fertilizar, v. 16, n. 3, p. 20-26, 2020

SANTOS, A. J. B. et al. **Dosagem de fertilizantes nitrogenados na cultura do milho**. Agropecuária Técnica, v. 39, n. 1, p. 29-34, 2018.

SANTOS, P. C.; MICHELENA, G.; PERES, M. **Impacto dos fertilizantes no ambiente**. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/150646/1/Impacto-Fertilizantes-ambiente.pdf>> Acesso em: 20 maio 2024.

SATYAPRAKASH, M.; SADHANA, B.; NIKITHA, T.; VANI, E. U. B. R.; S. S. **Phosphorous and Phosphate Solubilising Bacteria and their Role in Plant Nutrition**. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, v. 6, n. 4, p. 2133-2144, 2017.

SHAFI, J.; TIAN, H.; JI, M. **Bacillus species as versatile weapons for plant pathogens: a review**. Biotechnology & Biotechnological Equipment, v. 31, n. 3, p. 446-459, 2017.

SHENG, H. et al. **Long-term effects of biochar addition on soil fertility, crop production, and greenhouse gas emissions: Field study in China**. Agriculture, Ecosystems & Environment, v. 303, p. 107134, 2020.

SOMA, D. et al. Effectiveness of combined application of Kodjari phosphate rock, water soluble phosphorus fertilizer and manure in a Ferric Lixisol in the centre west of Burkina Faso. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 64, 10 jul. 2017.

SOUSA, D. M. G. DE; LOBATO, E. **Cerrado: correção do solo e adubação**. [s.l.] Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2004., 2004.

SOUZA, R. C. et al. **Microbial formulations for dryland agriculture: challenges and opportunities**. Frontiers in Plant Science, v. 11, p. 1370, 2020.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G. D.; DJUKIĆ, S.; ĆIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. **Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci**. Apmis, v. 115, p. 891-899, 2007.

SUGAWARA, S. et al. Distinct Characteristics of Indole-3-Acetic Acid and Phenylacetic Acid, Two Common Auxins in Plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 56, n. 8, p. 1641–1654, ago. 2015.

TAVARES, A. **Produção e exportação de fertilizantes nitrogenados**. 2019. Disponível em: <<https://www.porta2s.com.br/noticia/287/producao-e-exportacao-de-fertilizantes-nitrogenados>> Acesso em: 27 maio 2024.

TILMAN, D. et al. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, v. 418, n. 6898, p. 671–677, ago. 2002.

VALDERRAMA, P. et al. **Enhancing the efficiency of nitrogen fertilizers using slow-release biochar compounds in maize crops**. *Agronomy*, v. 10, n. 10, p. 1515, 2020.

VELLOSO, C. C. V. CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *Bacillus* E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM GENÓTIPOS DE MILHO. 2019.

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

VINHA, A. P. C. et al. ADSORÇÃO DE FÓSFORO EM SOLOS DE REGIÕES TROPICAIS. *Nativa*, v. 9, n. 1, p. 30–35, 2021.

WAHYUDI, A. T.; ASTUTI, R. P.; WIDYAWATI, A.; MERYANDINI, A.; NAWANGSIH, A. A. **Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth promoting rhizobacteria**. *Journal of Microbiology Indonesia*, v. 3, n. 2, p. 34-40, 2011.

WAKIMOTO, P.; OHYAMA, T.; JIA, Z. **Rhizobia species: Their diversity and applications**. *Soil Science and Plant Nutrition*, v. 56, n. 3, p. 562-570, 2010.

ZILLI, J. É. et al. Resposta do feijão-caupi à inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para a soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 3, p. 739–742, jun. 2011.