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

Resposta do milho e do tomateiro à inoculação com bactérias diazotróficas
isoladas da superfície de folhas

André Alves de Souza

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas

Piracicaba
2017

André Alves de Souza
Engenheiro Agrônomo

**Resposta do milho e do tomateiro à inoculação com bactérias diazotróficas isoladas da
superfície de folhas**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **MARCIO RODRIGUES LAMBAIS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Souza, André Alves de

Resposta do milho e do tomateiro à inoculação com bactérias diazotróficas isoladas da superfície de folhas / André Alves de Souza - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

79 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Milho 2. Tomateiro 3. Diazotróficas 4. Bactéria promotora de crescimento
5. Fixação biológica de nitrogênio I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico

A minha mãe Luzia, a grande responsável por esta conquista

Ao meu pai Aparecido (*in memoriam*) por todo suporte

Aos meus familiares,

Minha querida avó Margarida e meu tio João

Minhas irmãs Katia e Eliana,

Meus sobrinhos Karine, Wanderson, Lidylaine, Renato, Felipe e Marco Antônio

Cunhados Jacson e Sinomar

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade de estar aqui e concluir mais uma importante etapa em minha vida.

Agradeço ao Prof. Marcio Lambais pela oportunidade de ter sido seu orientado durante estes dois anos, e sempre ter sido tão paciente e compreensivo comigo.

À FAPESP pela bolsa concedida por um ano de curso e o auxílio financeiro para o desenvolvimento do projeto, processo nº 2016/17042-6.

À CAPES pela bolsa concedida nos meses iniciais do meu mestrado.

À Alice Cassetari que me deu a oportunidade de dar continuidade ao seu trabalho.

Aos Professores Paulo Sergio Pavinato e Fernando Andreote pela valiosa orientação.

À Denise do Laboratório de Microbiologia do Solo, por todo auxílio e ensinamentos durante estes dois anos.

Ao parceiro Fernandinho por todo auxílio com os experimentos na casa-de-vegetação e pelas boas e longas risadas.

Ao Wladimir e a Nivanda por toda a colaboração e paciência comigo.

A todo pessoal do Laboratório de Microbiologia do Solo, que sempre me auxiliaram, esclarecendo inúmeras dúvidas.

À minha amiga Silvia, por toda a colaboração.

À minha amiga Bianca, sempre tão preocupada com as pessoas.

Ao meu amigo Andrews, o cara do humor diferenciado.

Ao meu amigo Julio, grande parceiro na pesquisa e também nas horas de descontração, tomando uma cerveja de qualidade.

Ao meu parceiro Mauro, por toda a amizade e companheirismo.

Ao meu amigo Fabio pelos divertidos e filosóficos momentos.

Ao meu amigo Felipe, parceiro de estudo nos sábados e domingos.

Ao meu amigo Eric, por toda parceria na execução dos experimentos, independente da hora ou dia.

Ao meu amigo Adriano Lucheta por todas as dicas e orientações.

Ao Professor Lázaro pela concessão das sementes de tomate.

Ao Roberto Carvalho da Dow AgroSciences pela concessão das sementes de milho.

À Helena do Laboratório de Sementes, por todo o auxílio com os testes de germinação do tomate e do milho.

A todo o pessoal de casa que sempre me deram um grande suporte, Jofre, Manuel, Antônio, Roger, Marco Antônio, Luciano e Frederico.

À minhas eternas amigas Michele e Helen.

Ao Professor Carlos Armênio Khatounian por todos ensinamentos durante a minha graduação.

A todos meus amigos da graduação que permaneceram ao meu lado mesmo que a distância.

A todo pessoal do prédio onde moro, pelas boas conversas, churrasco, forró e afins.

Aos meus amigos do pedal de fim de semana.

A todos os parceiros do Departamento de Ciência do Solo que sempre estiveram tão próximos e foram de grande ajuda nessa caminhada.

Enfim agradeço a todos que estiveram ao meu lado nessa jornada de dois anos de anos.

EPÍGRAFE

“A ciência permanecerá sempre a satisfação do desejo mais alto da nossa natureza, a curiosidade; fornecerá sempre ao homem o único meio que ele possui de melhorar a própria sorte”

Ernest Renan

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. HIPÓTESES	13
1.2. OBJETIVO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1. MECANISMOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO.....	15
2.1.1. Fixação biológica de nitrogênio	15
2.1.1.1. Bactérias diazotróficas.....	16
2.1.1.2. Complexo nitrogenase	19
2.1.1.3. Mensuração da fixação biológica doN ₂	22
2.1.2. Síntese e liberação de fitormônios.....	23
2.1.3. Solubilização de fosfatos	25
2.2. USO AGRÍCOLA E FORMULAÇÃO DE INOCULANTES COM BPCP	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. ABORDAGEM METODOLÓGICA	31
3.2. SELEÇÃO DOS ISOLADOS PARA OS ENSAIOS	31
3.3. ENSAIOS PRELIMINARES.....	31
3.3.1. Determinação da produção de ácido indol-3-acético pelos isolados bacterianos (in vitro)	32
3.3.2. Determinação da atividade da nitrogenase dos isolados bacterianos (in vitro).....	32
3.3.3. Ensaio para otimização das doses de N para o milho.....	33
3.3.4. Ensaio para otimização das doses de N para o tomateiro.....	34
3.4. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS ISOLADOS BACTERIANOS NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DE MILHO.....	34
3.5. PREPARO DO INOCULANTE	35
3.6. AVALIAÇÕES REALIZADAS NA COLHEITA	36
3.6.1. Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas na rizosfera do milho .	36
3.6.2. Atividade da Nitrogenase	36
3.7. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS ISOLADOS BACTERIANOS NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DO TOMATEIRO	37

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4. RESULTADOS.....	41
4.1. OTIMIZAÇÃO DE DOSES DE N PARA O MILHO	41
4.2. OTIMIZAÇÃO DE DOSES DE N PARA O TOMATEIRO	42
4.3. PRODUÇÃO DE AIA E ATIVIDADE DA NITROGENASE DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS	43
4.4. INOCULAÇÃO DO MILHO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EPIFÍTICAS ENCAPSULADOS EM MICROESFERAS DE ALGINATO.....	44
4.5. INOCULAÇÃO DO TOMATEIRO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EPIFÍTICAS ENCAPSULADOS EM MICROESFERAS DE ALGINATO	48
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	65
ANEXOS	77

RESUMO

Resposta do milho e do tomateiro à inoculação com bactérias diazotróficas isoladas da superfície de folhas

O desenvolvimento de tecnologias alternativas que visem aumentar a disponibilidade e eficiência do uso dos recursos minerais para as plantas aparecem como importante medida para se alcançar um crescimento sustentável da agricultura. Neste contexto, o suprimento de nitrogênio por meios biológicos, utilizando micro-organismos diazotróficos, dos quais os mais estudados são os rizóbios associados simbioticamente às leguminosas, é uma importante alternativa. Porém o sucesso atingido com essa simbiose em leguminosas ainda não foi alcançado em outras famílias de plantas, principalmente por limitações associadas à otimização das combinações planta-bactéria. Em gramíneas, diazotróficos endofíticos têm sido usados como inoculante, com resultados controversos. No entanto, é possível que micro-organismos diazotróficos epifíticos possam apresentar maior vantagem adaptativa devido à menor especificidade em sua relação com a planta, e serem mais eficientes em plantas não-leguminosas. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de um inoculante produzido a partir de bactérias diazotróficas isoladas da filosfera no crescimento de milho e tomateiro. Ensaios foram realizados em condições de casa-de-vegetação, utilizando-se três diferentes isolados de bactérias diazotróficas encapsuladas em esferas de alginato sob diferentes níveis de adubação nitrogenada. A eficiência dos isolados em fixar nitrogênio foi avaliada através da atividade da nitrogenase. As populações de diazotróficos na rizosfera foram determinadas através da técnica do número mais provável (NMP) ao final do ensaio. Além disso, parâmetros como biomassa da parte aérea e das raízes foram analisados. Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias das variáveis comparadas pelo teste Duncan ($p < 0,05$), utilizando-se o programa estatístico R. Plantas de milho, aos 60 dias após a inoculação com o isolado J8L, apresentaram matéria seca da raiz e atividade da nitrogenase 26 e 50 % superior ao controle não-inoculado, respectivamente. Plantas de tomateiro, 30 dias após a inoculação com o isolado E5L, apresentaram matéria seca da parte aérea e matéria seca da raiz 39 e 31 % superior ao controle não-inoculado, respectivamente. Parte dos efeitos observados no milho e tomateiro podem ser explicados pela atividade de fixação biológica de nitrogênio e produção de fitormônios, como auxina. A atividade da nitrogenase na rizosfera do milho, 60 dias após a inoculação foi maior no solo sem adição de N. O NMP não apresentou diferenças significativas e nos ensaios com milho e tomateiro, entre plantas inoculadas e não inoculadas, mostrando uma provável influência da comunidade diazotrófica nativa sobre a população final de diazotróficas analisada. De uma maneira geral, os isolados J8L e E5L proporcionaram ganhos significativos para as culturas do milho e tomateiro, mostrando potencial para uso como biofertilizantes

Palavras-chave: Milho; Tomateiro; Diazotróficas; Bactéria promotora de crescimento; Fixação biológica de nitrogênio

ABSTRACT

Response of maize and tomato to the inoculation with diazotrophic bacteria isolated from leaf surface

The development of alternative technologies to increasing availability and use efficiency of mineral resources for plants is an important step for sustainable agricultural production. In this context, the supply of nitrogen by biological means, using diazotrophic microorganisms, of which the most studied are rhizobia symbiotically associated with legumes, is an important alternative. However, the efficiency of rhizobium-legume symbioses has not yet been achieved in other plant families, mainly due to limitations associated with the optimization of plant-bacterial combinations. In grasses, endophytic diazotrophs have been used as inoculant, with controversial results. However, it is possible that epiphytic diazotrophic microorganisms may have adaptive advantages over endophytes, due to the lower specificity in their associations with plants, and be more efficient in non-leguminous plants. The objective of the present work was to evaluate the effect of an inoculant produced with diazotrophic bacteria isolated from the phyllosphere on the growth of maize and tomato. Assays were carried out under greenhouse conditions using three isolates of diazotrophic bacteria encapsulated in alginate beads under different levels of nitrogen fertilization. The efficiency of the isolates in fixing nitrogen was evaluated determining nitrogenase activities. The populations of diazotrophic bacteria in the rhizosphere were determined by the most probable number (MPN) technique at the end of the experiment. In addition, parameters such as shoot and root biomass were analyzed. The data were submitted to the analysis of variance, and means were compared by the Duncan test ($p < 0.05$), using the statistical program R. Maize plants at 60 days after inoculation with the J8L isolate presented root dry weight and nitrogenase activity in the rhizosphere 26 and 50% higher than the uninoculated control, respectively. Tomato plants, 30 days after inoculation with the E5L isolate, presented shoot and root dry weight 39 and 31% higher than the uninoculated control, respectively. Part of the effects observed in maize and tomato can be explained by the nitrogen fixation activity and auxin production. Nitrogenase activity in the maize rhizosphere, 60 days after inoculation was higher in the soil without N supply. The population of diazotrophic bacteria in the rhizosphere of inoculated and non-inoculated maize and tomato plants were not significantly different, showing a probable influence of the native diazotrophic community on the total diazotrophic population. In general, isolates J8L and E5L promoted growth of maize and tomato, showing potential for use as biofertilizers.

Keywords: Maize; Tomato; Diazotroph; Plant growth promoting bacteria; Biological nitrogen fixation

1. INTRODUÇÃO

O considerável aumento da demanda por alimentos, ocasionado pela elevação do número de habitantes no mundo, somado às preocupações referentes as mudanças climáticas globais, tem desencadeado uma série de discussões sobre o desenvolvimento de sistemas de crescimento sustentáveis. A Organização das Nações Unidas (ONU, 2015) divulgou em 2015 a chamada Agenda 2030, um plano de ações composto por 17 objetivos e 169 metas, visando a implementação de um projeto de desenvolvimento sustentável em escala mundial.

Entre os objetivos descritos neste plano está a ODS2, referente à erradicação da fome. Em resumo, a ODS2 tem como meta até 2030 dobrar a produtividade agrícola, de maneira a garantir sistemas sustentáveis de produção de alimentos e implementar práticas agrícolas resilientes, que aumentem a produtividade e a produção, que ajudem a manter os ecossistemas e que fortaleçam a capacidade de adaptação às mudanças climáticas. Diante deste cenário, o Brasil, por sua importância no setor, desempenha um importante papel para que estas metas sejam atingidas.

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2017), o nono levantamento da safra brasileira de grãos 2016/17 estima uma produção de 234,3 milhões de toneladas, registrando desta forma um aumento de 25,6% sobre a safra 2015/16, a qual chegou a 186,6 milhões de toneladas, sendo que para o milho a estimativa é de 93,8 milhões de toneladas. No ramo das hortaliças é importante destacar o tomate com uma produção de 4,2 milhões de toneladas, segunda maior do setor (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE, 2017).

Os aumentos na produção agrícola previstos para as próximas décadas, impulsionado principalmente pelo incremento no rendimento, dificilmente será alcançado sem aumentos significativos do uso de fertilizantes. Segundo o International Plant Nutrition Institute (IPNI, 2017) o Brasil consumiu 32,78 milhões de toneladas de fertilizantes em 2016, sendo 13,65 milhões de toneladas de fertilizantes nitrogenados. Em comparação com o ano anterior, o consumo de fertilizantes nitrogenados aumentou em 25 %. Culturas como milho e tomate demandam grandes quantidades de nitrogênio, em média 170 e 260 kg de N ha⁻¹, respectivamente (RAIJ et al. 1996).

O desenvolvimento de técnicas que visem o uso mais eficiente dos recursos minerais, somado ao desenvolvimento de tecnologias alternativas para aumentar a disponibilidade de nutrientes para as plantas, aparecem como importantes medidas para se alcançar crescimento sustentável da agricultura. Neste contexto, o suprimento de N por meios biológicos, utilizando

micro-organismos diazotróficos, é uma importante alternativa. No Brasil, o exemplo de maior sucesso desta tecnologia é o uso de rizóbios na cultura de soja, resultando em uma economia média de 588 kg ureia ha⁻¹, considerando-se uma eficiência de apenas 60%, a um custo de R\$ 8,00 ha⁻¹. Com o emprego desta técnica são economizados em média R\$ 898,00 ha⁻¹. Assim, por ano o Brasil economiza o equivalente a 10,3 bilhões de dólares em fertilizantes nitrogenados, usando uma tecnologia biológica (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA, 2015).

Além da fixação biológica de nitrogênio (FBN) simbiótica, a associação de bactérias de vida-livre ou associativas com plantas não-leguminosas pode também resultar em economia de fertilizantes nitrogenados. Porém, apesar dos inúmeros estudos, a FBN assimbiótica e a associativa ainda não apresentaram o mesmo grau de eficiência encontrado na simbiótica. Uma das limitações do uso de bactérias diazotróficas de vida-livre ou associativas como inoculantes é a otimização das combinações planta-bactéria e das condições ambientais para máxima eficiência. Garcia de Salamone et al. (1996) em um estudo utilizando 12 diferentes genótipos de milho associados com estipes de *Azospirillum*, observaram que determinadas estirpes chegavam a quadruplicar a produção de grãos e o acúmulo de N em um genótipo de milho específico, enquanto esta mesma estirpe não apresentava efeito significativo em outros genótipos. Grande parte dos inoculantes empregados em gramíneas tem como característica o uso de bactérias endofíticas obrigatórias ou facultativas, tais como *Azospirillum* (BALDANI et al., 1997). Estes micro-organismos quando no interior das plantas podem ativar o sistema de defesa vegetal, impedindo seu crescimento (KOGEL; FRANKEN; HÜCKELHOVEN, 2006). Sendo assim, é possível que micro-organismos diazotróficos epifíticos possam apresentar maior vantagem adaptativa devido à menor especificidade em sua relação com a planta, de forma que o processo de FBN seja mais eficiente (CASSETARI, 2015). Além disso várias bactérias diazotróficas de vida-livre ou associativas são capazes de promover o crescimento de plantas através de outros mecanismos além do fornecimento de N, tais como a liberação de fitormônios, solubilização de fósforo, e são chamadas de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) (BASHAN; DE-BASHAN, 2010).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas de vida-livre, encapsuladas em esferas de alginato, sobre o crescimento de milho e tomateiro, sob diferentes níveis de adubação nitrogenada.

1.1. Hipóteses

- Bactérias diazotróficas isoladas da superfície das folhas da liteira podem fixar nitrogênio na rizosfera e promover o crescimento das plantas.
- A fixação biológica de nitrogênio nos isolados em estudo é maior em níveis mais reduzidos de adubação nitrogenada.

1.2. Objetivo

- Avaliar o efeito do inoculante produzido a partir de bactérias diazotróficas isoladas da superfície das folhas da liteira e encapsuladas em esferas de alginato no crescimento de milho e tomateiro, sob diferentes níveis de adubação nitrogenada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) podem promover o crescimento vegetal de forma direta ou indireta, por meio de mecanismos que promovem o aumento da aquisição de nutrientes essenciais para plantas, como nitrogênio (por meio da fixação biológica de nitrogênio) (KIM; REES, 1994) ou fósforo (por meio da solubilização de fosfatos) (KHALID et al., 2006), a modulação dos níveis de fitormônios nas plantas (como auxina, citocininas e giberelinas) (GLICK, 2012), ou diminuindo os efeitos negativos de agentes patogênicos no crescimento e desenvolvimento das plantas (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009). Dentre os principais mecanismos de promoção de crescimento, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um dos mais importantes, do ponto de vista ecológico e agrícola.

O número de estudos e a aplicação de BPCPs na agricultura vem aumentando ao longo dos anos. Este maior interesse se deve em parte, ao sucesso alcançado na relação simbiótica entre rizóbio e soja, levando ao desenvolvimento de inoculantes para outras culturas, como cana-de-açúcar e milho, que normalmente dependiam da adubação química para suprir a demanda por N. De qualquer forma, a formulação de inoculantes eficientes permanece um desafio para a microbiologia agrícola (BASHAN et al., 2014).

2.1. Mecanismos de promoção de crescimento

2.1.1. Fixação biológica de nitrogênio

Nitrogênio é um elemento essencial presente em muitas biomoléculas necessárias para sustentar a vida. Este elemento está presente na atmosfera na forma de dinitrogênio (N_2), compondo cerca de 78% da atmosfera. Apesar desta abundância os organismos não são capazes de metabolizar N_2 diretamente. Sendo assim, as formas fixadas, como amônia (NH_3) e nitrato (NO_3^-), são as mais utilizadas pelos seres vivos (HOFFMAN et al., 2014). Existem três conhecidas maneiras de reduzir N_2 para NH_3 : descargas elétricas na atmosfera, através do processo industrial Haber-Bosch e pelo processo de redução enzimática, chamado de fixação biológica de N_2 (FBN) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O processo industrial de fixação de nitrogênio Haber-Bosch produz amônia a partir de dinitrogênio (N_2), via reação exotérmica reversível:

As condições termodinâmicas requeridas para alcançar a quebra da ligação tripla do N_2 e sua hidrogenização são altas temperaturas (500°C) e alta pressão (cerca de 200 bar) (KANDEMIR et al., 2013). O hidrogênio utilizado na reação é usualmente obtido da oxidação parcial do carvão e gás natural, que vem acompanhado de uma grande quantidade de dióxido de carbono (CO_2), o qual precisa ser retirado para não prejudicar a reação final de fixação do nitrogênio. Todo este processo leva a um alto consumo de combustíveis fósseis e da liberação de uma grande quantidade de gases de efeito estufa. Para a produção de 1000 kg de amônia líquida é estimado o consumo de 41000 MJ de energia primária e a liberação de 1920 kg de CO_2 (RAZON, 2014).

Estudos apontam que o aumento da produção dos fertilizantes nitrogenados e de compostos de nitrogênio reativos oxidados, originários da combustão de combustíveis fósseis, vem provocando perturbação do ciclo do N, culminando na acumulação sem precedentes de óxidos de nitrogênio, principalmente N_2O na atmosfera, além de acelerar processos como eutrofização da água e acidificação do solo (ERISMAN et al., 2008). Por outro lado, a FBN por bactérias diazotróficas reduz a propensão à lixiviação e volatilização, uma vez que o nitrogênio fixado é utilizado no local de sua produção, na forma orgânica, contribuindo para a sustentabilidade do ecossistema (DIXON; KAHN, 2004).

2.1.1.1. Bactérias diazotróficas

Bactérias fixadoras de nitrogênio são geralmente classificadas como simbióticas e não-simbióticas. O grupo das simbióticas inclui os actinomicetos que formam actinorrizas, as cianobactérias que formam simbioses com diatomáceas fungos e plantas, além de membros da família Rhizobiaceae, os quais podem formar simbioses com plantas leguminosas. O grupo das não-simbióticas é representado por bactérias de vida-livre ou associativas, as quais podem colonizar a rizosfera, filosfera ou ocorrer endofiticamente em diversas espécies vegetais (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Plantas actinorrízicas têm a habilidade de desenvolver uma endossimbiose com bactérias fixadoras do gênero *Frankia*, resultando na formação de nódulos radiculares colonizados pela bactéria, a qual em troca de fontes reduzidas de carbono fornece nitrogênio fixado (FRANCHE; LINDSTRÖM; ELMERICH, 2009). Apesar de não haver simbioses actinorrízicas de importância para a alimentação humana, esta associação exerce um importante

papel ecológico na revegetação de áreas degradadas. Apesar desta importância, estudos com *Frankia* sofrem limitações devido à dificuldade do isolamento da bactéria em função da morfologia dos nódulos (SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013).

As cianobactérias são fototróficas e podem ocorrer em ambientes aquáticos e terrestres. Em condições de limitação de nitrogênio, algumas cianobactérias filamentosas têm a capacidade de diferenciar células especializadas chamadas de heterocistos, que são células não-fotossintéticas, de paredes espessas, com interior microaeróbio, propício para a fixação biológica de nitrogênio. O uso da associação entre cianobactérias do gênero *Anabaena* com plantas pteridófitas do gênero *Azolla* é comum na agricultura oriental, onde a *Azolla* é usada para adubação verde em campos de arroz inundado, contribuindo com cerca de 30 kg N ha⁻¹ de N (MAHANTY et al., 2016). Devido à sua alta eficiência em fixar N₂, cianobactérias também vem sendo utilizadas em estudos para a produção direta de amônia líquida, através do cultivo de *Anabaena* ssp. e posterior produção de sulfato de amônio e conversão à amônia líquida, em uma tentativa de substituição do método de fixação industrial Haber- Bosch (RAZON, 2012).

A interação simbiótica entre rizóbio e leguminosas é a mais conhecida e mais estudada das simbioses fixadoras de N₂, devido à sua importância agrônômica. A simbiose rizóbio-leguminosa depende da especificidade, infectividade e eficácia dos rizóbios. O processo de desenvolvimento dos nódulos tem início com a liberação de flavonóides pelas raízes das leguminosas. Esses flavonóides agem no controle da expressão dos genes *nod*, pela síntese do fator Nod (lipoquitooligossacarídeos) pelas bactérias (GOUGH; CULLIMORE, 2011). Ao ocorrer a percepção do fator Nod na região dos pêlos radiculares, inicia-se a formação do nódulo e sua colonização. Após liberação dos rizóbios nas células do nódulo, as células bacterianas se diferenciam e fixam N₂ (JONES et al., 2007).

Bactérias diazotróficas de vida livre ou associativas são um vasto grupo com a capacidade de colonizar um grande número de famílias de plantas, isolados de raízes e partes aéreas de planta de importância agrônômica ou de espécies arbóreas de diferentes biomas. Um dos primeiros estudos com este grupo de diazotróficas foi conduzido por Döbereiner & Ruschel (1958) que isolaram e descreveram a bactéria *Beijerinckia fluminensis* da rizosfera da cana-de-açúcar. Deste então uma série de gêneros foram identificados como *Acetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Herbasprillum*, *Glucenobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* (MOREIRA et al., 2010).

Gêneros de bactérias diazotróficas não-simbióticas, geralmente colonizam mais de uma espécie ou família de plantas. Como exemplo, estudos com *Azospirillum* mostram a capacidade desta bactéria em estimular significativamente o crescimento de gramíneas de

interesse agrônomo, como milho (ARAÚJO et al., 2015) e trigo (SANTOS et al., 2016). Tem sido relatado que o gênero *Pseudomonas* pode contribuir de forma significativa para o aumento da disponibilidade de nutrientes em culturas como tomateiro e pimenteira (ISLAM et al., 2013) e trigo (SHAHAROONA et al., 2008). E o gênero *Gluconacetobacter* conhecido pela associação com cana-de-açúcar (SILVA et al., 2012; SUMAN et al., 2005), pode também ser encontrada colonizando plantas de arroz (LOGANATHAN; NAIR, 2003).

Um dos fatores que influenciam essas associações não-simbióticas é a presença de exsudados liberados pelas plantas na rizosfera. Estes compostos ricos em carbono exercem um importante papel no fornecimento de energia para as bactérias diazotróficas, como também são cruciais para determinação da composição da comunidade de bactérias na rizosfera (SOMERS; VANDERLEYDEN; SRINIVASAN, 2004). Weert et al. (2002), inoculando plantas de tomateiro com estirpes de *Pseudomonas fluorescens* do tipo selvagem e mutantes deficientes do gene *cheA*, ligado a regulação da quimiotaxia (movimento por estímulo químico), observaram que plantas de tomateiro inoculadas com a estirpe mutante apresentavam uma colonização significativamente menor do que plantas inoculadas com a estirpe selvagem, demonstrando a importância da quimiotaxia na colonização da rizosfera.

A composição dos exsudados radiculares depende do tipo de solo, da disponibilidade de nutrientes, do genótipo da planta e do estágio de crescimento, e dos estresses bióticos e abióticos. Além disso, existem diferenças nos padrões de exsudação de raiz ao longo do sistema raiz que resultam em diferenças na composição das comunidades bacterianas na rizosfera (SANTI; BOGUSZ; FRANCKE, 2013). Tem sido relatado que a biossíntese e liberação de auxina por diazotróficas não-simbióticas podem elevar a liberação de exsudados pelas plantas (TALBOYS et al., 2014). Estima-se que por volta de 20% dos fotossintetizados são exsudados pelas raízes, representando um significativo gasto energético das plantas (GEDDES et al., 2015).

Os processos de maior gasto energético em bactérias diazotróficas não-simbióticas são aqueles ligados à proteção da nitrogenase contra o excesso de O₂. Bactérias do gênero *Beijerinckia* tem suas células bacterianas revestidas por uma grossa camada de uma mucilagem que dificulta a difusão do oxigênio (BARBOSA; ALTERTHUM, 1992). E em outros casos como *Azotobacter* ssp. ou *Gluconacetobacter* ssp., altas taxas de respiração são necessárias para absorver o oxigênio livre, além de uma proteção conformacional da nitrogenase em condições de altos níveis de oxigênio (POOLE; HILL, 1997; URETA; NORDLUND, 2002). FBN em bactérias com estes mecanismos de proteção da nitrogenase não são eficientes energeticamente. Por exemplo *Azotobacter* ssp. requer mais que 100 g de C por grama de N

reduzido, em contraste com aproximadamente 12 g de C consumido pelos rizóbios dentro dos nódulos por grama de N fornecido para a planta (OLIVARES; BEDMAR; SANJUÁN, 2013).

2.1.1.2. Complexo nitrogenase

Micro-organismos fixadores de nitrogênio possuem o complexo enzimático nitrogenase, o qual catalisa a conversão do N_2 a amônia (equação 2), promovendo a quebra da ligação tripla do N_2 e sua hidrogenização, sob condições normais de temperatura e pressão (KIM; REES, 1994). A energia utilizada na reação é proveniente de fonte renovável obtida através dos processos de foto ou quimiossíntese, os quais liberam energia na forma de ATP (trifosfato de adenosina) (TAIZ; ZEIGER, 2009).

As proteínas do complexo nitrogenase são codificadas pelos genes *nif* (*nitrogen fixation*). Dixon e Postgate (1972) mostraram que *Escherichia coli* adquiria a capacidade de fixar N_2 ao ser transformada com genes *nif* de *Klebsiella pneumoniae*, naturalmente fixador de N_2 . Desde então genes *nif* foram identificados em todas as espécies de diazotróficos, de vida-livre ou simbióticos.

O complexo nitrogenase é composto por duas proteínas: uma Fe–proteína (produto do gene *nifH*), também conhecida por componente II ou dinitrogenase redutase, e uma MoFe–proteína (produto dos genes *nifDK*), também chamada de componente I ou dinitrogenase. A dinitrogenase redutase é um dímero de subunidades idênticas γ_2 , com massa molecular de aproximadamente 60 kDa. Cada dímero é ligado por um único grupo [4Fe-4S] o qual é o centro ativo da enzima, envolvido na transferência de elétrons para a dinitrogenase (HINRICHSSEN et al., 2012). Além disso, a dinitrogenase redutase é possivelmente requerida para a biossíntese do cofator FeMo (FeMoCo) da dinitrogenase. A dinitrogenase é um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ com massa molecular de aproximadamente 240 kDa. Associado a dinitrogenase estão dois pares de grupos metálicos, chamados de P- grupo e FeMoCo. O P- grupo é um [8 Fe–7 S] que pode ser descrito, no seu estado reduzido, como uma ligação covalente de dois grupos de [4 Fe-4S] compartilhando um átomo de S. Sua função é atuar como um intermediário na via de transporte de elétrons entre a Fe-proteína e FeMoCo. O FeMoCo é composto pelos grupos [Mo-3Fe-3S] e [4Fe-3S], ligados pelos três átomos de enxofre com os átomos de ferro, de cada fragmento do

grupo. O FeMoCo tem como principal papel ser o sítio de redução do substrato (ZHAO et al., 2006).

Durante o processo de redução do N_2 , ainda há o envolvimento de uma terceira molécula transportadora de elétrons, a ferredoxina ou flavodoxina, a qual transfere elétrons para a Fe-proteína (JIA; QUADRELLI, 2014). Em resumo, o mecanismo de funcionamento da nitrogenase envolve 4 passos: no primeiro ocorre a formação do complexo entre a Fe-proteína reduzida com duas moléculas de ATP e a MoFe proteína; no segundo ocorre a transferência de elétrons entre as duas proteínas, acoplada à hidrólise de ATP; no terceiro a dissociação da Fe-proteína acompanhada da re-redução e hidrólise de ATP e finalmente a repetição desse ciclo até atingir o número de elétrons e prótons necessários para completar a redução do N_2 a amônia ($8 e^-$ e $8 H^+$) (REES; HOWARD, 2000). A amônia sintetizada é convertida a glutamina, através da ação da glutamina sintetase, e assimilada pelas bactérias diazotróficas, parte desta amônia também pode ser excretada no ambiente na forma de amônio (VAN DOMMELEN et al., 2009).

A regulação da FBN ocorre principalmente por fatores ligados a presença de oxigênio e amônio no ambiente, podendo ocorrer ao nível de transcrição, com o impedimento da expressão dos genes *nif*, ou ao nível de pós-tradução, provocando uma inibição da atividade do complexo nitrogenase. Ao nível de transcrição, a expressão dos genes estruturais do complexo nitrogenase (*nifHDK*), é controlada pela proteína NifA (produto do gene *nifA*), juntamente com o fator $\sigma 54$. Apesar da regulação dos genes *nif* pela proteína NifA ser um mecanismo comum entre os micro-organismos diazotróficos, a expressão do gene *nifA* é controlada por diferentes mecanismos, dependendo do grupo e ou até mesmo da espécie diazotrófica (HALBLEIB; LUDDEN, 2000).

Para exemplo de comparação, em *Klebsiella pneumoniae* a proteína GlnB controla a atividade do sistema regulatório NtrB-NtrC, através da uridilação de GlnB em baixas concentrações intracelulares de glutamina e fosforilação de NtrC. O aumento da concentração de NtrC fosforilada ativa a expressão do gene *nifA*. Em *Sinorhizobium meliloti*, na ausência de O_2 , a proteína FixL se autofosforila, transferindo o grupo fosforilo para a proteína FixJ e ativando a expressão do gene *nifA* (DIXON; KAHN, 2004). A expressão da nitrogenase em diazotróficas simbióticas é menos sensível ao amônio, devido à constante exportação do amônio para a planta. Ao contrário, em bactérias de vida-livre, como *Klebsiella pneumoniae*, a expressão do genes *nif* é mais afetada pelos níveis de amônio (HALBLEIB; LUDDEN, 2002).

No segundo nível da regulação, em um sistema comum entre proteobactérias diazotróficas, a proteína anti-ativadora NifL regula a atividade de NifA em resposta à concentração de oxigênio e nitrogênio fixado. O mecanismo de interação se dá pela formação

de um complexo entre NifA e NifL, inativando NifA (MARTINEZ-ARGUDO et al., 2004). Entre as diazotróficas deste grupo existem algumas diferenças no mecanismo regulatório do sistema NifA–NifL. Em *Klebsiella pneumoniae*, a proteína GlnK é requerida para prevenir a inibição de NifA pela proteína NifL, em condições de limitação de nitrogênio. Já em *Azotobacter vinelandii*, a forma não uridilada de GlnK é requerida para inibir NifA sob condições de excesso de nitrogênio. Sob condições de limitação de nitrogênio, a ligação de 2-Oxoglutarato com NifA é necessária para prevenir a inibição pela NifL. A proteína NifL é análoga à proteína FixL e possui um domínio N-terminal de quinase PAS, o qual é comumente encontrado em procariotos e eucariotos, e funcionam como sensores de oxigênio, redox, voltagem ou luz (SCHMITZ; KLOPPROGGE; GRABBE, 2002; DIXON; KAHN, 2004).

Ao nível de regulação pós-tradução da nitrogenase, o mecanismo mais estudado é a ADP-ribosilação reversível de NifH. Este sistema responde não somente à presença de amônio, mas também ao decréscimo da disponibilidade de energia celular. A ADP-ribosilação de NifH é catalisada pela dinitrogenase redutase ADP ribosiltransferase (DraT) através da transferência de um grupo ADP-ribose do NAD⁺ da Arginina-101 de uma subunidade do dímero de NifH. A enzima dinitrogenase redutase glicohidrolase (DraG) pode remover o grupo ADP-ribose e restituir a atividade da NifH. O resíduo de Arginina-101 está localizado na face de contato entre NifH e NifDK durante os ciclos de transferência de elétrons necessários para a redução do nitrogênio. A ADP-ribosilação deste aminoácido aparentemente impede o contato entre estas proteínas, bloqueando a atividade da nitrogenase (MOURE et al., 2013; GERHARDT, 2012).

As atividades de DraT e DraG estão sujeitas à regulação oposta, de acordo com os níveis de energia e nitrogênio. Sob condições de fixação biológica de N, DraT é inativada e DraG é ativada. Quando amônio é adicionado ao meio ou ocorre um decréscimo de energia, DraT passa para o estado ativo e DraG é inativado, nesta situação DraT permanece ativo por um curto período de tempo enquanto DraG permanece inativo até que o amônio seja consumido pelo metabolismo da bactéria. Depois do esgotamento do amônio ou da restauração dos níveis de energia, DraG é reativado para restaurar a atividade da nitrogenase. A regulação de DraT e DraG é mediada pelas proteínas P(II) (GlnB e GlnZ) e proteínas AmtB, formando complexos com DraT ou DraG dependendo dos níveis de energia e nitrogênio (HUERGO et al., 2012).

Assim, complexo nitrogenase, e consequentemente a eficiência em fixar N₂, pode ser finamente regulado pela concentração de N, oxigênio no meio ou pelos níveis de energia, em diferentes bactérias diazotróficas.

2.1.1.3. Mensuração da fixação biológica do N_2

Um dos métodos mais utilizados para mensurar a atividade do complexo nitrogenase é a técnica de redução do acetileno (ARA). O método, descrito por Hardy et al. (1968), baseia-se na capacidade do complexo nitrogenase em reduzir outras moléculas, como o acetileno (C_2H_2), além do N_2 . A atividade de redução do acetileno é amplamente utilizada pelo fato da metodologia ser bastante sensível, rápida, de fácil execução e baixo custo (KEUTER; VELDKAMP; CORRE, 2014). A técnica de redução de acetileno pode ser utilizada em estudos qualitativos, para detectar a presença e o grau de atividade do complexo nitrogenase de um organismo diazotrófico (PARK et al., 2005) ou quantitativas (REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2008).

O método possui algumas limitações, a atividade na nitrogenase pode ser prejudicada por distúrbios físicos sofridos pelos micro-organismos durante o processo de incubação ou até mesmo pela substituição do N_2 por C_2H_2 . (HERRIDGE; PEOPLES; BODDEY, 2008). O fato da mensuração da atividade da nitrogenase pelo método, se dar em um estado atual da enzima aparece como outra limitação principalmente para estudos quantitativos, que também possuem a limitação da precisão da conversão das taxas de redução de acetileno para taxas de redução de N_2 (moles C_2H_2 reduzido: moles N_2 fixado). Sendo assim, normalmente, os resultados do teste de ARA expressos em moles de etileno produzido por unidade de tempo (UNKOVICH; BALDOCK, 2008).

Outro método comumente usado para mensurar a FBN é a técnica de diluição isotópica do ^{15}N , a qual pode ser baseada na abundância natural de ^{15}N ou no enriquecimento de ^{15}N no solo. O método de abundância natural de ^{15}N baseia-se no fato de que a maioria dos solos possuem um ligeiro enriquecimento na abundância de ^{15}N , em relação ao N_2 da atmosfera. O N_2 na atmosfera possui uma proporção de átomos de ^{15}N de 0,3663%, e esta proporção se mantém uniforme em todo planeta. Para determinar a proporção de N derivado da fixação biológica (%Ndfa), é necessário mensurar a abundância de ^{15}N na planta inoculada com micro-organismos diazotróficos em relação a abundância de ^{15}N na planta não inoculada (BODDEY et al. 2008). Variações naturais, como variação espacial e temporal da abundância de ^{15}N no solo, possível absorção seletiva de várias fontes orgânicas e inorgânicas de N com diferentes assinaturas de ^{15}N , potencial fracionamento isotópico como efeito das micorrizas, além do grau de fracionamento isotópico ocorrido durante fixação do N_2 podem limitar a aplicação dessa abordagem metodológica (BODDEY et al., 2000).

O princípio da técnica de enriquecimento com ^{15}N no solo é a mesma da abundância natural de ^{15}N , com a diferença de que o solo é enriquecido com átomos de ^{15}N , geralmente através da adição de fertilizantes nitrogenados enriquecidos em ^{15}N (sulfato de amônio, ureia, nitrato de cálcio). De qualquer forma, quando $^{15}\text{NO}_3^-$ ou $^{15}\text{NH}_4^+$ são adicionados ao solo, o ^{15}N entra no reservatório de N do solo. Este reservatório vai sendo esgotado através da absorção pelas plantas. Posteriormente, retorna ao reservatório do solo durante a mineralização da matéria orgânica. Consequentemente, com o passar do tempo, o enriquecimento de ^{15}N na planta tende a diminuir. Com toda esta alteração do enriquecimento de ^{15}N no solo, diferentes proporções de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ tendem a ser absorvidas pela planta, interferindo nos cálculos do N proveniente da fixação biológica. Para reduzir as alterações do enriquecimento de ^{15}N no solo com o tempo é possível utilizar fertilizantes marcados de liberação lenta, ou uma mistura de solo com matéria orgânica enriquecida em ^{15}N (BODDEY et al., 2008).

De qualquer forma, em estudos envolvendo associações de diazotróficas com plantas, o estabelecimento de controles não fixadores provou ser muito difícil. Ainda, considerando que as taxas de FBN neste tipo associação sejam baixas em relação às taxas encontradas em associações simbióticas com leguminosas, a detecção das pequenas quantidades de ^{14}N adicionada pela FBN em meio a um reservatório no solo, permanece um desafio, apesar de nos dias atuais existirem espectrômetros de massa com baixos limites de detecção e quantificação (UNKOVICH; BALDOCK, 2008).

2.1.2. Síntese e liberação de fitormônios

Dentre os mecanismos de promoção de crescimento vegetal induzido por micro-organismos, a síntese de auxina tem sido amplamente estudada. Bashan, Singh e Levanony (1988), testando uma estirpe mutante de *Azospirillum brasiliense*, deficiente na capacidade de fixar N_2 e uma estirpe parental com capacidade de fixar nitrogênio, em mudas de tomate, encontraram ganhos similares na promoção de crescimento das plantas inoculadas com ambas estirpes, associando este ganho a outro mecanismo que não fosse a FBN. Anteriormente já havia sendo demonstrado que esse efeito poderia se dar pela produção de auxinas (KOLB; MARTIN, 1985; BARBIERI et al., 1986).

As auxinas estão envolvidas em inúmeros processos fisiológicos nas plantas, tais como alongamento, divisão e diferenciação de células, além da biossíntese de vários metabólitos e resistência a estresses bióticos (BASHAN; BASHAN, 2010). Tem sido relatado que 80% dos micro-organismos isolados da rizosfera de diversas culturas possuem a capacidade de sintetizar

e liberar auxinas (ácido índole acético, AIA) como metabolitos secundários. Estas auxinas são biossintetizadas através de vias relacionadas com o metabolismo de triptofano, o qual pode ser encontrado nos exsudados liberados pelas raízes das plantas (PATTEN; GLICK, 1996).

Em um dos pioneiros estudos com liberação de AIA pelas BPCPs foi observada com a tentativa de imitar o efeito da bactéria sobre o crescimento da raiz, por aplicação direta de AIA em raízes de trigo, onde foi observado que a inoculação com *Azospirillum brasilense* Cd e a aplicação de AIA às raízes promoviam, em ambos casos, o aumento do comprimento de raiz, número de raízes laterais e número de pêlos radiculares (HARARI; KIGEL; OKON, 1988). AIA liberado pelas BPCPs estimula o aumento da superfície radicular e, consequentemente, maior absorção de nutrientes da solução do solo. Assim, a produção de AIA pelas BPCPs, resulta em um afrouxamento das paredes celulares e aumento da exsudação, a qual proporciona nutrientes adicionais para suportar o crescimento de bactérias na rizosfera (GLICK, 2012). Porém esta liberação de AIA na rizosfera pode, em contrapartida, estimular a atividade da enzima ACC sintase, resultando em um incremento de etileno, o qual pode provocar, entre outros efeitos, a inibição do alongamento das raízes (RIBAUDO et al., 2006).

O etileno é um dos hormônios responsáveis pela regulação do desenvolvimento vegetal, cuja síntese em condições de estresse, como alta salinidade, seca, alagamento, presença de metais pesados e infecção por patógenos, é significativamente aumentada (AHEMAD; KIBRET, 2014). A indução da síntese de etileno em resposta à infecção por patógenos resulta na ativação do sistema de defesa vegetal e síntese de vários compostos antimicrobianos. Algumas BPCPs, porém, sintetizam ACC-desaminase, uma enzima que degrada ACC, o precursor imediato do etileno em plantas (ONOFRE-LEMUS et al., 2009), reduzindo a síntese de etileno, e consequentemente restabelecendo o desenvolvimento da planta, essencial para o sucesso da associação (BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

Shaharoon et al. (2008), estudando os efeitos de isolados de *Pseudomonas fluorescens*, altamente eficientes na síntese de ACC-desaminase, observaram que os isolados foram eficazes no aumento da massa das raízes de trigo, mesmo em condições de baixos níveis de NPK, pela redução da síntese de etileno. Desta forma, a capacidade de sintetizar ACC-desaminase seria um importante mecanismo de promoção de crescimento (GLICK, 2014).

Um outro grupo de fitormônios de grande importância em estudos com BPCPs são as giberelinas e as citocininas, hormônios de crescimento ligados a divisão celular, crescimento da parte aérea e da raiz e germinação de sementes (TAIZ; ZEIGER, 2009). Nieto e Frankenberger (1989) encontraram quantidades consideráveis de citocininas em filtrados de *Azotobacter chroococcum*. Nijhoff et al. (1982) observaram maiores concentrações de giberelina em

nódulos de soja contendo *Bradyrhizobium japonicum* (*Rhizobium japonicum*), em comparação com a raiz, sugerindo que este fitormônio esteja ligado ao mecanismo de nodulação. A maior concentração de giberelina em nódulos de leguminas do que nas raízes também é destacado por Bottini, Cassan e Piccoli (2004).

Cassán et al. (2009) estudando os efeitos de *Azospirillum brasiliense* e *Bradyrhizobium japonicum* na germinação de sementes de soja e milho, observaram uma nítida capacidade de promover a germinação de sementes e desenvolvimento precoce das mudas promovida por ambas estirpes, atribuindo este efeito a presença de giberelina, que é o fitormônio conhecido por estimular a germinação de sementes. Apesar de vários trabalhos indicarem a síntese desses fitormônios por BPCPs, muitas das conclusões são baseadas na adição exógena dos hormônios (BASHAN; BASHAN, 2010). Estudos adicionais são necessários para melhor compreender o papel dos hormônios sintetizados pelas BPCPs, como sua produção é regulada e como eles atuam nas plantas (GLICK, 2012).

2.1.3. Solubilização de fosfatos

BPCPs com habilidade de solubilizar fosfatos e fixar nitrogênio atmosférico são de grande interesse agrícola, pois melhoram o fornecimento de dois nutrientes essenciais para o crescimento das plantas. Apesar de existir uma grande reserva de fósforo no solo, apenas uma pequena porção do total está disponível para as plantas. BPCPs podem intermediar a conversão de formas insolúveis de fósforo mineral para as solúveis através da liberação de ácidos orgânicos (cítrico e oxálico, por exemplo) ou inorgânicos (H_2SO_4 , por exemplo). Podem também desfosforilar formas orgânicas de fosfato através de fosfatases, aumentando a disponibilidade do nutriente na solução do solo (BASHAN; BASHAN, 2010).

Hossain e Sattar (2014) testando as bactérias solubilizadoras de fosfato (BSP) *Pseudomonas* sp. e *Klebsiella* sp., associadas com doses de superfosfato triplo (SPT), observaram que os tratamentos com o inoculante e 15 kg P ha^{-1} , apresentavam percentuais de fósforo total na parte aérea do trigo maiores do que nos tratamento com dose de 30 kg P ha^{-1} , sem adição do inoculante. Gupta et al. (2011), avaliando a solubilização de P por *Burkholderia gladioli*, *Enterobacter aerogenes* e *Serratia marcescens*, na presença de rocha fosfática Mussoorie, obtiveram aumentos na disponibilidade de fósforo no solo entre 86 e 576%, comparando solos inoculados com não-inoculados. Já os aumentos de fósforo absorvido pelas plantas em solo inoculado com BSP variaram de 64 a 273%.

Os resultados obtidos por Gupta et al. (2011) corroboram com os de Abou-EL-Seoud e Abdel-Megeed (2012), os quais, trabalhando com rocha fosfática e bactéria solubilizadora de fosfato *Bacillus megaterium* na cultura do milho, obtiveram aumentos na absorção de fósforo na ordem de 89%, em relação aos tratamentos usando apenas a rocha fosfática sem adição do inoculante, melhorando a disponibilidade e absorção de fósforo nas plantas.

2.2. Uso agrícola e formulação de inoculantes com BPCP

Em diferentes culturas de interesse agrícola, como milho, cana-de-açúcar, trigo, arroz, feijão e soja, vem sendo estudadas e aplicadas diferentes formulações de inoculantes (BASHAN et al., 2014). Apesar de todo esforço, o exemplo de maior sucesso ainda é a simbiose entre soja e rizóbio. Estima-se que do total de 21,45 toneladas de N fixado anualmente em leguminosas, 77% sejam derivado da relação simbiótica entre os rizóbios e soja. No Brasil (segundo maior produtor de soja), as contribuições da FBN chegam a 94% para esta cultura, representando uma economia de $\approx 420 \text{ kg de N ha}^{-1}$ (HERRIDGE; PEOPLES; BODDEY, 2008).

O grande sucesso da FBN no Brasil, se deve aos programas de melhoramento genético da soja, que priorizaram ao longo das últimas décadas, o cultivo das plantas na ausência de nitrogênio, além da seleção de estirpes com alta competitividade e capacidade da fixação de nitrogênio. Apesar da pressão existente por parte das empresas ligadas à produção de fertilizantes, estudos apontam que a adição de adubos nitrogenados não beneficiam em nada o cultivo da soja no Brasil, independente da dose utilizada (HUNGRIA; MENDES, 2015). Porém, ao contrário do Brasil, programas de melhoramento da soja nos EUA apresentam um baixo interesse no aumento da FBN, principalmente em função dos baixos custos dos fertilizantes nitrogenados, levando a seleção de cultivares altamente dependentes de adubação nitrogenada (KESSEL; HARTLEY, 2000).

Mesmo no Brasil, programas de melhoramento têm se focado principalmente no aumento da produtividade, resistência a doenças, melhoria da qualidade das sementes e tratos nutricionais, além da adaptação a condições edafoclimáticas, como tolerância ao estresse hídrico, mas pouca atenção tem sido dada à FBN, apesar da importância do processo para a produtividade das culturas agrícolas. Somado a isso, preocupações em relação ao tratamento das sementes com fungicidas incompatíveis com rizóbios, que podem levar a uma desastrosa diminuição da nodulação, aparecem como desafios para a FBN na soja (HUNGRIA; ARAUJO; CAMPO, 2009).

Entre as gramíneas, o exemplo de maior potencial da aplicação de BPCP é a cana-de-açúcar. Yoneyama et al. (1997), em um estudo conduzido em diferentes regiões do Brasil, Filipinas e Japão, com 50 diferentes genótipos de cana-de-açúcar, observaram com o emprego da técnica de abundância natural de ^{15}N , contribuições de 0 a 72% de N derivado da FBN, dependendo da região e do cultivar empregado. Em um outro estudo, conduzido por Boddey et al. (2000), também quantificando a FBN utilizando a técnica de abundância natural de ^{15}N na cana-de-açúcar, observaram contribuições de 0 a 60% de derivado da FBN entre os 11 genótipos estudados.

No Brasil, um produto denominado “Master-fix Gramíneas”, contendo uma mistura de estirpes de *Azospirillum* em um veículo líquido, tem sido usado nas culturas de milho e arroz. Porém, estudos apontam que o uso desse inoculante não substitui o uso de fertilizantes nitrogenados e tampouco permite a redução da dose de N (REPKE et al., 2013; BARTCHECHEN et al., 2010). Na Argentina um produto comercializado como “Graminante”, inoculante com uma mistura de estirpes de *Azospirillum* em uma mistura de carbonato de cálcio e magnésio, quando aplicado nas culturas de milho e trigo, pode, segundo o fabricante, aumentar a produção em até 20% (LABORATORIO ALQUIMIA S.A, 2017). Porém, estudos experimentais não encontraram respostas significativas em trigo, aveia e milho inoculadas como o produto (CAMPOS; THEISEN; GNATTA, 2000; CAMPOS; THEISEN; GNATTA, 1999).

De qualquer forma, estudos com bactérias diazotróficas endofíticas ou endofíticas facultativas, como *Azospirillum*, em gramíneas apresentam resultados controversos, podendo uma mesma estirpe influenciar positivamente a produção de grãos e acúmulo de N em uma determinado genótipo vegetal e não apresentar influencia alguma em outro (GARCIA DE SALAMONE et al., 1996). Oliveira et al. (2006), avaliando o efeito de isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*, nas variedades de cana SP70-1143 e SP81-3250, observaram grande variação na contribuição da FBN de uma mesma estirpe nas variedades de cana estudadas.

Possivelmente, a baixa eficiência de algumas estirpes endofíticas esteja relacionada a sua sobrevivência no interior da planta. Lambais (2001) relatou que a inoculação de cana-de-açúcar com as diazotróficas endofíticas *Gluconacetobacter diazotrophicus* ou *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, induziu ou suprimiu a expressão de genes ligados aos sistema de defesa, como POX9 (peroxidase), PAL2 (fenilamina amônia-liase) e CAT3 (catalase). Relações mutualísticas simbióticas requerem um sofisticado balanço entre respostas de defesa da planta

e a demanda de nutrientes dos endófitos, portanto é necessário um afinado equilíbrio desta interação para que não se desenvolva uma reação de defesa e uma relação antagônica (KOGEL; FRANKEN; HÜCKELHOVEN, 2006).

Sendo assim, é possível que micro-organismos diazotróficos epifíticos estabeleçam estratégias de colonização mais eficientes com relação aos endofíticos, por colonizarem a superfície das plantas (CASSETARI, 2015). James et al. (2002) relataram a presença de bactérias diazotróficas epifíticas na superfície das folhas de duas variedades de arroz sem que fossem observadas respostas de defesa nas plantas, sugerindo uma vantagem adaptativa destes organismos em relação as bactérias endofíticas.

Outro fator de grande importância para o sucesso das BPCPs em culturas de importância agrícola é a formulação do inoculantes. A formulação de um inoculante deve conferir proteção ao inóculo e garantir um número mínimo de células viáveis durante a associação com a planta. Em geral, BPCPs inoculadas no solo sem um veículo adequado têm sua população diminuída rapidamente, frustrando os resultados esperados (BASHAN et al., 2014).

Diferentes veículos de inoculação, tais como turfa (RIGGS et al., 2001), argila (ANANDHAM et al., 2007) e microesferas de alginato (WU et al., 2011), entre outras, têm sido avaliados em várias formulações. Dentre esses veículos, o encapsulamento em microesferas tem se mostrado bastante promissor (SCHOEBITZ; LÓPEZ; ROLDÁN, 2013). As microesferas têm vantagens significativas em relação a outros tipos de veículos. Uma vez encapsuladas, as células vivas ficam protegidas contra tensões mecânicas e estresses ambientais (tais como alterações de pH, temperatura, presença de solventes orgânicos, ou substâncias tóxicas) e predadores. Diferentes tipos de polímeros podem ser usados para o encapsulamento, tais como poliacrilamida, poliuretano, ureia-formaldeído e goma gelana (JOHN et al., 2011). Porém, alginato é o mais comumente utilizado, por formar um polímero poroso quando geleificado com cátions (Ca^{+2}), ser natural, biodegradável e atóxico (HERRMANN; LESUEUR, 2013).

Young et al. (2006) inoculando BPCPs encapsuladas em esferas de alginato e bactérias suspensas em inoculante líquido, em alface, observaram sete dias após a inoculação que o número de bactérias no solo com inoculante líquido foi de 2.10^3 UFC (cm de raiz)⁻¹ e 2.10^4 UFC (cm de raiz)⁻¹, na rizosfera e rizoplano, respectivamente. Já, no solo com BPCPs encapsuladas, o número de células foi de 3.10^7 UFC (cm de raiz)⁻¹ e 4.10^5 UFC (cm de raiz)⁻¹, na rizosfera e rizoplano, respectivamente. Essa maior sobrevivência das células encapsuladas resultou em um melhor desenvolvido da parte aérea aos 21 dias de cultivo.

Em outro estudo, conduzido por Sivakumar, Parthasarathi e Larksmipriya (2014), variáveis como germinação das sementes, comprimento da parte aérea e comprimento da raiz do arroz, apresentaram incrementos significativos com a inoculação de BPCP encapsuladas em esferas de alginato, em comparação com o tratamento contendo células bacterianas livres, mostrando dessa forma que o encapsulamento do inóculo pode resultar em aumento da eficiência das BPCPs na promoção do crescimento das plantas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Abordagem Metodológica

O efeito de três isolados de bactérias diazotróficas isoladas da superfície das folhas da liteira da Mata Atlântica no crescimento do milho e tomate foram avaliados em condições de casa-de-vegetação. As plantas de milho foram cultivadas por 35 e 65 dias, e o tomateiro por 25 e 50 dias. Ensaios preliminares foram realizados para otimizar as doses de nitrogênio para milho e tomateiro. A atividade da nitrogenase e a produção de auxina pelos isolados bacterianos também foram avaliadas *in vitro*.

3.2. Seleção dos isolados para os ensaios

Os isolados utilizados foram selecionados com base nos estudos realizados por Cassetari (2015), a qual isolou e caracterizou 48 estirpes de bactérias diazotróficas da filosfera de espécies vegetais da Mata Atlântica, em relação as suas capacidades em reduzir acetileno, solubilizar fosfato inorgânico, produzir ácido indol-3-acético (AIA), produzir ACC-desaminase, quitinase e sideróforos. Dos 48 isolados de bactérias testados, a autora selecionou 10 para a realização de ensaios com cana-de-açúcar, em condições de casa-de-vegetação. Baseado nestes resultados, foram selecionados 3 isolados dentre os 10 testados por Cassetari (2015) em condições de casa-de-vegetação, levando-se em consideração não somente os ensaios “*in vivo*”, mas também os ensaios “*in vitro*”. Também foi realizada análise de agrupamento hierárquico usando-se o programa estatístico Past, no intuito de auxiliar na escolha de isolados com características diferentes, porém complementares.

3.3. Ensaio preliminares

Os objetivos dos ensaios preliminares foram avaliar a atividade dos isolados selecionados e determinar doses ideais de nitrogênio para as culturas do milho e do tomateiro, cultivados em vasos. Para isso foram realizados os seguintes ensaios: determinação da produção de ácido indol-3-acético pelos isolados bacterianos (*in vitro*), quantificação da atividade da nitrogenase dos isolados bacterianos (*in vitro*) e otimização de doses de nitrogênio para o milho e o tomateiro em vasos.

3.3.1. Determinação da produção de ácido indol-3-acético pelos isolados bacterianos (*in vitro*)

O método para detecção de AIA, descrito por Ahmad, Ahmad e Khan (2008), tem como base a alteração de coloração do meio devido à oxidação dos compostos indólicos, variando de amarelo (não oxidado) a vermelho (oxidado) (figura 1). Os isolados foram cultivados em meio Dyg (ANEXO A, RODRIGUES; MALAVOLTA; VICTOR, 1986) suplementado com 1 g L^{-1} de L-Triptofano, por 48 h a 28°C , sob agitação orbital constante de 120 rpm. Posteriormente o meio foi centrifugado a 3200 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pélete lavado com 10 mL de solução salina ($\text{NaCl } 0,85\%$). Este processo foi repetido duas vezes e ao final uma alíquota de 1 mL foi retirada para determinação da densidade ótica (OD) à 600 nm, utilizando-se um espectrofotômetro Hewlett Packard, modelo 8453. A OD da suspensão bacteriana foi ajustada para 0,6 - $0,8\text{ mL}^{-1}$. Uma alíquota de 1,5 mL da cultura dos isolados foi centrifugada a 3200 g por 10 minutos sendo depositado 1 mL do sobrenadante e adicionado no lugar 1 mL do reagente Salkowski ($\text{FeCl}_3\text{ } 0,5\text{ mol L}^{-1}\text{ mL}$; $\text{HClO}_4\text{ } 35\%$, 49 mL) (SERGEEVA; LIAIMER; BERGMAN, 2002) que permaneceu sob reação por 30 minutos no escuro. A concentração de AIA foi determinada através da absorbância à 535 nm, com base em uma curva padrão de AIA comercial, diluído em etanol 75% para concentrações de 1 a $128\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.3.2. Determinação da atividade da nitrogenase dos isolados bacterianos (*in vitro*)

Assim como para o teste da produção de AIA, os isolados foram cultivados em meio Dyg por 48 horas sob agitação orbital constante de 200 rpm, com três repetições por isolado. As culturas foram centrifugadas à 3200 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pélete lavado com 10 mL de solução salina ($\text{NaCl } 0,85\%$), sendo repetido duas vezes este processo. Ao final, uma alíquota de 1 mL foi retirada para realizar o ajuste da OD à 600 nm entre 0,6 e $0,8\text{ mL}^{-1}$. Foram inoculados 500 μL da suspensão de células bacterianas em frascos contendo 5 mL do meio semi-sólido JNFb (ANEXO B) sem biotina e sem azul de bromatimol. As culturas foram incubadas por 5 dias à 30°C no escuro, quando foi evidenciado o aparecimento da película característica.

Os frascos foram vedados e 1 mL de ar foi retirada de cada frasco sendo substituído por 1 mL de gás acetileno (AA, pureza 99,8%, Air Liquid). Os frascos foram incubados por mais 1 hora e em seguida 1 mL do ar dos frascos foi retirado e injetado no cromatógrafo gasoso

(Shimadzu–GC 2010), com detector de ionização de chama à 250°C e uma coluna HP-PLOT/Q à 60°C (Agilent J&W GC Columns, Santa Clara, Califórnia-EUA) (figura 2). Amostras incubadas sem acetileno foram utilizadas como controle negativo (brancos). Amostras do gás acetileno utilizado na incubação, também foram analisadas para a determinação da concentração de etileno contaminante.

A atividade da nitrogenase foi expressa pela taxa de redução de acetileno, em micromoles de acetileno reduzido por frasco, por hora de incubação, de acordo com a equação:

$$\mu\text{mol etileno (cultura}^{-1} \text{ h}^{-1}) = \frac{(S - C) \cdot V}{t \cdot 25.530}$$

Sendo, S = quantidade de etileno obtido na amostra após incubação; C = quantidade de etileno em frascos não incubados; V = volume “headspace” nos frascos de incubação;; t = tempo de incubação (h); 25530 = constante considerando condições de temperatura e pressão do local de leitura do etileno, para 1 mol de gás.

3.3.3. Ensaio para otimização das doses de N para o milho

Este ensaio foi realizado em casa-de-vegetação com o plantio de sementes de milho da variedade 2B587PW (Dow AgroSciences). Foram utilizados vasos contendo 5 kg de solo do horizonte A, com textura média, coletado na camada de 0-20 cm em um local próximo à estrada do Paredão Vermelho (22°41'1.45"S; 47°52'1.34"O), no município de Piracicaba, SP. O local escolhido para coleta do solo foi uma área coberta com braquiária cujo manejo foi apenas a roçagem, sem aplicação de fertilizantes. As características químicas do solo podem ser vistas na Tabela 1. A correção da acidez do solo foi feita seguindo-se as recomendações de Raij et al. (1997) para elevar a V% para 70% e o pH para 6,5, adicionando-se 3,45 g de carbonato de cálcio (CaCO₃) e 1,48 g de carbonato de magnésio (MgCO₃) por vaso. Cada vaso recebeu uma adubação de base correspondente a 1000 mg de P₂O₅ na forma de superfosfato simples (Ca(H₂PO₄)₂·H₂O + CaSO₄·2H₂O), 600 mg de K₂O na forma de cloreto de potássio (KCl), 28 mg de ácido bórico (H₃BO₃) e 43 mg de sulfato de zinco heptahidratado (ZnSO₄·7H₂O), também seguindo as recomendações de Raij et al. (1997).

Foram definidas 8 doses de nitrogênio, além do controle sem nitrogênio, para a definição da dose ótima. As doses previamente definidas, baseado na literatura, foram: 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 140 mg N kg⁻¹, na forma de ureia, totalizando 9 tratamentos.

Tabela 1. Características químicas do solo utilizado no experimento com milho

	pH	M.O	P	S	Ca	Mg	K	Al	H+Al	SB	CTC	V	m
	CaCl ₂	g dm ⁻³	Resina	Fosfato de cálcio 0,01 mol L ⁻¹	Resina			KCl 1 mol L ⁻¹	SMP				
			-----mg dm ⁻³ -----					mmol dm ⁻³ -----				%	%
0-20cm	4,3	18	5	8	3	2	2	1	34	7	41	17	56

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com 4 repetições totalizando 36 unidades experimentais. A colheita foi realizada aos 60 dias após o plantio, para avaliação da biomassa total da parte aérea.

3.3.4. Ensaio para otimização das doses de N para o tomateiro

Este ensaio foi realizado em casa-de-vegetação. Sementes de tomate *Solanum lycopersicum* L. cv. Micro–Tom foram germinadas em bandejas de isopor esterilizadas, contendo substrato Base Tubete Florestal C (Base Agro) mais vermiculita (1:1, v:v). Mudanças com três folhas verdadeiras foram transplantadas para vasos contendo 0,5 kg do substrato composto por areia lavada e vermiculita (2:1, v:v). Cada vaso recebeu uma adubação de base correspondente a 343 mg de P₂O₅ na forma de superfosfato simples (Ca(H₂PO₄)₂.H₂O + CaSO₄.2H₂O), 150 mg K₂O na forma de cloreto de potássio (KCl), 150 mg de carbonato de cálcio (CaCO₃), 104 mg de carbonato de magnésio (MgCO₃), 1 mL da solução de micronutrientes Hoagland e 1 mL da solução Fe-EDTA Hoagland (Sarruge, 1975).

Foram utilizadas 6 doses de nitrogênio além do controle sem N. As doses utilizadas foram: 75, 150, 225, 300, 375 e 450 mg N kg⁻¹ substrato, na forma de ureia, totalizando 7 diferentes tratamentos.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com 3 repetições, totalizando 21 unidades experimentais. A colheita foi realizada aos 60 dias após o transplante das mudas, para avaliação da biomassa total da parte aérea.

3.4. Determinação da eficiência dos isolados bacterianos na promoção do crescimento de milho

Este experimento foi realizado seguindo as mesmas condições usadas no ensaio preliminar do milho, com o plantio de sementes da variedade 2B587PW (Dow AgroSciences).

Foram utilizados vasos contendo 5 kg de solo do horizonte A, com textura média, coletado na camada de 0-20 cm em um local próximo à estrada do Paredão Vermelho (22°41'1.45"S; 47°52'1.34"O), no município de Piracicaba, SP. O local escolhido para coleta do solo foi uma área coberta com braquiária cujo manejo foi apenas a roçagem, sem aplicação de fertilizantes. As características químicas do solo podem ser vistas na Tabela 1. A correção da acidez do solo foi feita seguindo-se as recomendações de Raij et al. (1997) para elevar a V% para 70% e o pH para 6,5, adicionando-se 3,45 g de carbonato de cálcio (CaCO_3) e 1,48 g de carbonato de magnésio (MgCO_3) por vaso. Cada vaso recebeu uma adubação de base correspondente a 1000 mg de P_2O_5 na forma de superfosfato simples ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} + \text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 600 mg de K_2O na forma de cloreto de potássio (KCl), 28 mg de ácido bórico (H_3BO_3) e 43 mg de sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), também seguindo as recomendações de Raij et al. (1997). O cultivo foi realizado em casa-de-vegetação.

Os tratamentos foram organizados em esquema fatorial (4x3), sendo 3 isolados bacterianos e um controle não-inoculado; 3 doses de nitrogênio na forma de ureia: 0, 500 e 1000 mg por vaso. Foram realizadas coletas aos 35 e 65 dias após a inoculação (DAI), resultando em 24 diferentes tratamentos. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com 4 repetições, totalizando 96 unidades experimentais.

Na colheita aos 35 e 65 dias foram avaliados os seguintes parâmetros: biomassa da parte aérea e das raízes, atividade da nitrogenase (ensaio de redução do acetileno) e população de bactérias diazotróficas na rizosfera.

3.5. Preparo do inoculante

Os isolados bacterianos E5L, J8L e I7L foram cultivados em meio de cultura Dyg, por 24 horas a 30°C sob agitação orbital de 200 rpm. Posteriormente, o meio foi centrifugado a 3200 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pélete lavado com solução salina (NaCl 0,85%) para concentração das células e remoção do nitrogênio do meio de cultura. Este processo foi repetido 2 vezes e ao final uma alíquota de 1 mL foi retirada para determinação da densidade ótica (DO) à 600 nm. A DO da suspensão bacteriana foi ajustada para 0,8 - 0,6 mL^{-1} (aproximadamente 1.10^8 células por mL). As células bacterianas foram transferidas para um novo meio de cultura Dyg, com adição de 20 gramas de alginato de sódio por litro, devidamente homogeneizadas com o auxílio de agitador mecânico digital (IKA RW20) por 5 minutos à 1000 rpm, e 5 minutos à 1800 rpm.

As células bacterianas foram encapsuladas usando-se um encapsulador Jet Cutter tipo S (Figura 3), com configuração definida com base em ensaios prévios (Anexo C). Para a geleificação do alginato foi utilizada uma solução de CaCl_2 10%, por 3 horas. Após este período, as esferas foram lavadas 3 vezes com água ultra-pura e colocadas em uma câmara de fluxo laminar por um período de 12 horas, para retirar o excesso de água (Figura 3).

Uma alíquota de cada batelada de encapsulamento foi reservada para realização de contagem de células bacterianas, dissolvendo-se 1 mL de esferas em 9 mL de solução de citrato de sódio (10% v/v), sob agitação constante por 30 minutos. A suspensão resultante foi diluída seriamente em solução salina (0,85% NaCl), com posterior plaqueamento em meio Dyg e contagem de colônias após 24 h de inoculação, seguindo-se a metodologia proposta por Ivanova, Teunou e Poncelet (2005). Com base nesta contagem foi definida a aplicação de 1 grama de inoculante encapsulado por semente, correspondendo a 1.10^8 células por semente.

3.6. Avaliações realizadas na colheita

3.6.1. Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas na rizosfera do milho

Foram retiradas amostras de 1 grama de solo da rizosfera do milho aos 35 e 65 DAI, para a determinação do NMP de bactérias diazotróficas. O solo amostrado foi homogeneizado com 9 mL de solução salina e a suspensão usada para preparar uma série de diluições (10^{-2} - 10^{-7}). Uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição foi usada para inocular meio semi-sólido JNFb em tubos de ensaio (Figura 2), em triplicata conforme descrito por Dobereiner et al. (1995). As culturas foram mantidas a 30°C por 5 dias e posteriormente determinou-se se houve ou não crescimento bacteriano. O NMP de diazotróficos por grama de solo foi determinado com base em uma tabela de probabilidades de McCrady, e frequência de ocorrência de crescimento nas maiores diluições até onde se observou crescimento.

3.6.2. Atividade da Nitrogenase

A atividade da nitrogenase na rizosfera do milho foi determinada aos 35 e 65 DAI, com a retirada de amostras da raiz com solo rizosférico. Estas amostras foram acondicionadas em frascos de vidro herméticos de 1000 mL, e 10% da atmosfera de cada frasco foi substituída por acetileno (AA, pureza 99,8%, Air Liquid). A incubação foi feita por 12 horas. A

concentração do etileno nos frascos foi determinada por cromatografia gasosa utilizando-se um cromatógrafo a gás (Shimadzu–GC 2010), com detector de ionização de chama à 250°C e uma coluna HP-PLOT/Q à 60°C (Agilent J&W GC Columns, Santa Clara, Califórnia-EUA). Amostras incubadas sem acetileno foram utilizadas como controle negativo (brancos). Amostras do gás acetileno utilizado na incubação, também foram analisadas para a determinação da concentração de etileno contaminante.

A atividade da nitrogenase foi expressa pela taxa de redução de acetileno, em nanomoles de acetileno reduzido por grama de massa seca, por hora de incubação, de acordo com a equação:

$$nmol \text{ etileno } (g^{-1} ms^{-1} h^{-1}) = \frac{(S - C) V}{ms t 25.530}$$

Sendo, S = quantidade de etileno obtido na amostra após incubação; C = quantidade de etileno em frascos não incubados; V = volume “headspace” nos frascos de incubação; ms = matéria seca; t = tempo de incubação (h); 25530 = constante considerando condições de temperatura e pressão do local de leitura do etileno, para 1 mol de gás.

Para transformar a quantidade de etileno encontrado na equação anterior em nitrogênio fixado foi utilizado a relação descrita por (HARDY et al., 1968), de 1 mol de NH₃ para 3 moles de C₂H₄. A quantidade de nitrogênio fixado na rizosfera foi expressa em ng de N g⁻¹ h⁻¹.

3.7. Determinação da eficiência dos isolados bacterianos na promoção do crescimento do tomateiro

Este ensaio foi realizado em condições de casa-de-vegetação. Sementes de tomate *Solanum lycopersicum* L. cv. Micro–Tom, foram germinadas em bandejas de isopor esterilizadas, contendo areia lavada e vermiculita (2:1, v/v). Mudas com três folhas verdadeiras foram transplantadas para vasos contendo 1 kg do substrato que recebeu uma adubação de base correspondente a 686 mg de P₂O₅ (Ca(H₂PO₄)₂.H₂O + CaSO₄.2H₂O), 286 mg de K₂O na forma de cloreto de potássio (KCl), 300 mg de carbonato de cálcio (CaCO₃), 208 mg de carbonato de magnésio (MgCO₃), 1 mL da solução de micronutrientes de Hoagland e 1 mL da solução Fe-EDTA de Hoagland (Sarruge, 1975).

Os tratamentos foram organizados em um esquema fatorial (4x3), sendo 3 isolados bacterianos (E5L, J8L e I7L) e um controle não-inoculado; três doses de nitrogênio na forma de ureia: 0, 215 e 430 mg por vaso. Coletas foram realizadas aos 25 e 50 dias após a inoculação

(DAI), resultando em 24 tratamentos. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com 4 repetições, totalizando 96 unidades experimentais. O preparo do inoculante seguiu o mesmo protocolo do ensaio anterior.

Na colheita, aos 25 e 50 dias após a inoculação (DAI), foram avaliados os seguintes parâmetros: biomassa da parte aérea e das raízes, atividade da nitrogenase (ensaio de redução de acetileno) e população de diazotróficos na rizosfera, conforme detalhado para o ensaio anterior.

3.8. Análise estatística

Os dados de ambos ensaios foram submetidos à análise de variância, sendo as médias das variáveis comparadas pelo teste Duncan ($p < 0,05$). Os dados dos ensaios preliminares para otimização das doses de N foram submetidos a uma análise de regressão com desvio padrão.

Todas as análises foram feitas utilizando o programa estatístico R. (R CORE TEAM, 2016), sendo o teste Duncan realizado com auxílio do pacote *agricolae* (MENDIBURU, 2016).

Figura 1. Ensaio preliminares. **A.** determinação produção de ácido indol-3-acético (*in vitro*). **B.** Distribuição dos vasos no ensaio de otimização de doses de nitrogênio para milho. **C.** Distribuição dos vasos para ensaio de otimização de doses de nitrogênio para tomateiro.

Figura 2. Ensaios de redução de acetileno, determinação do NMP de bactérias e implantação do ensaio com tomate. **A.** Incubação das raízes de milho e solo rizosférico com acetileno; **B.** Injeção das amostras em cromatógrafo; **C.** Implantação do ensaio com tomate; **D.** Ensaio para determinação do número mais provável de bactérias diazotróficas na rizosfera.

Figura 3. Preparo do inoculante e instalação do ensaio com milho. **A.** Visão geral do encapsulador Jet Cutter S; **B.** Encapsulador em funcionamento, com a seta apontando para o jato de microcápsulas formado pelo aparelho e caindo na solução de CaCl_2 10%; **C.** Processo de secagem das microcápsulas em uma câmara de fluxo laminar; **D.** Diâmetro médio das microcápsulas; **E.** Inoculação das sementes de milho para o plantio; **F.** Estande inicial do ensaio com milho.

4. RESULTADOS

4.1. Otimização de doses de N para o milho

Os resultados da análise de regressão com base na variação da massa de matéria fresca, da parte aérea para o teste de otimização de doses de N para o milho podem ser vistos na Figura 4. Observa-se que houve aumento da biomassa da parte aérea até a dose 100 mg N kg⁻¹, quando se inicia uma redução dessa biomassa. Calculando-se a derivada da equação da curva, foi encontrado como ponto máximo o valor de 90,48 mg N kg⁻¹, que é o valor da dose de nitrogênio correspondente a máxima produção de biomassa da parte aérea. No ensaio com os isolados foi utilizada a dose de 100 mg N kg⁻¹, valor próximo à dose ideal demonstrada neste teste.

Fox et al. (2016), em um estudo com bactérias diazotróficas na cultura do milho, utilizaram a dose de 85 mg N kg⁻¹, em vasos de 1 e 10 litros contendo uma mistura de solo e vermiculita (1:1, v:v) cultivado em casa-de-vegetação. No entanto, as características do substrato diferiram daquelas do substrato usado neste experimento.

Figura 4. Matéria fresca da parte aérea de milho em função de doses de nitrogênio aos 60 DAP. Os dados representam médias de 4 repetições $\pm$ desvio padrão.

4.2. Otimização de doses de N para o tomateiro

Na Figura 5 são apresentados os resultados da análise de regressão com base na variação da massa de matéria fresca da parte aérea para o teste de otimização de doses de N para o tomateiro. Com base na curva de crescimento, observa-se aumento da biomassa da parte aérea até a dose 225 mg N kg⁻¹, a partir da qual houve diminuição da biomassa. Calculando-se a derivada da equação da curva foi encontrado como ponto máximo o valor de 235,75 mg N kg⁻¹, que é o valor correspondente a dose de nitrogênio onde a produção de biomassa da parte aérea é máxima. No ensaio com os isolados foi utilizada a dose de 200 mg N kg⁻¹, valor próximo à dose ideal encontrada neste ensaio.

Fracetto et al. (2013), em um estudo com micorriza arbuscular em tomate *Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom, utilizaram 240 mg N kg⁻¹, em vasos contendo 400 gramas do substrato composto por areia lavada e vermiculita (2:1, v:v), cultivado em casa-de-vegetação. O ensaio final com tomateiro foi realizado nas mesmas condições propostas por Fracetto et al. (2013), porém utilizando-se 200 mg N kg⁻¹ de substrato.

Figura 5. Matéria fresca da parte aérea de tomate em função de doses de nitrogênio aos 60 DAP. Os dados representam médias de 3 repetições $\pm$ desvio padrão.

4.3. Produção de AIA e atividade da nitrogenase dos isolados de bactérias diazotróficas

Os isolados aqui estudados já haviam sido avaliados quanto a produção de AIA e atividade da nitrogenase por Cassetari (2015). Com isso, o objetivo do estudo foi avaliar o quão ativo os isolados estavam depois do período de armazenamento à -80°C.

Os isolados apresentaram alta atividade tanto para a produção de AIA quanto para atividade da nitrogenase (Tabela 2). O isolado I7L foi o mais eficiente na produção de AIA e apresentou a maior atividade da nitrogenase *in vitro* (Tabela 2).

O isolado I7L apresentou a mais alta atividade da nitrogenase entre os três isolados testados, assim como maior produção de AIA. O isolado E5L apresentou atividade da nitrogenase próxima a apresentada por I7L, e superior à atividade apresentada por J8L. Porém com relação a produção de AIA, o isolado J8L foi superior ao isolado I7L. Comparativamente, Cassetari (2015) observou que os isolados E5L, I7L e J8L produziam 6,32; 39,75 e 36,95 $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$, respectivamente, e atividade da nitrogenase Alta, Alta e Média. Com isso, conclui-se que os isolados mantiveram suas atividades após armazenamento à - 80°C.

Tabela 2. Produção de AIA na presença de L-triptofano e atividade da nitrogenase por isolados de bactérias diazotróficas

Isolado	AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Etileno ($\mu\text{mol cultura}^{-1}\text{h}^{-1}$)
E5L	27,1 $\pm$ 1,9 ^b	1,82 $\pm$ 0,6 ^a
I7L	56,43 $\pm$ 7,33 ^a	2,37 $\pm$ 0,41 ^a
J8L	33,67 $\pm$ 1,86 ^b	0,23 $\pm$ 0,18 ^b

Para produção de AIA e atividade da nitrogenase, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Os dados representam médias de 3 repetições $\pm$ desvio padrão.

4.4. Inoculação do milho com bactérias diazotróficas epifíticas encapsulados em microesferas de alginato

A matéria seca da parte aérea (MSPA) do milho não apresentou diferenças significativas ($p>0,05$), comparando-se plantas inoculadas e não-inoculadas, aos 35 e aos 65 dias após a inoculação (DAI) (Tabela 3), apesar das plantas inoculadas com os isolado E5L apresentarem as maiores médias de MSPA aos 65 DAI. Aos 35 DAI, as médias de MSPA das plantas inoculadas com E5L, I7L e J8L foram muito próximas às médias do controle não-inoculado, não diferindo entre si estatisticamente ($p>0,05$).

Com relação ao fator “doses de nitrogênio”, diferenças significativas foram observadas ($p<0,05$), sendo que as plantas adubadas com 100 mg N kg⁻¹ apresentaram maior biomassa, principalmente aos 65 DAI (100% superior ao controle sem nitrogênio) e aos 35 DAI (54% superior). Plantas adubadas com 50 mg N kg⁻¹ e 100 mg N kg⁻¹ não diferiram entre si aos 35 DAI. A MSPA do controle sem nitrogênio foi significativamente menor em ambas coletas (35 DAI e 65 DAI). Os resultados obtidos com a dose 100 mg N kg⁻¹ confirmam os resultados do ensaio preliminar de otimização de doses de adubação nitrogenada para o milho (Figura 4).

Tabela 3. Matéria seca da parte aérea (g) de plantas de milho inoculadas com bactérias diazotróficas encapsuladas em esferas de alginato e sob diferentes doses de nitrogênio, aos 35 e 65 dias após a inoculação (DAI)

Isolado	Doses de Nitrogênio (mg N kg ⁻¹)			Média
	0	50	100	
Matéria seca da parte aérea (g vaso ⁻¹)				
-----35 DAI (V4) CV%= 11,6-----				
Não-inoculado	10,24 ns	15,09	14,72	13,35 ns
E5L	10,10	14,05	15,87	13,34
I7L	9,60	15,08	15,85	13,51
J8L	10,10	13,92	15,36	13,13
Média	10,01 B	14,53 A	15,45 A	
-----65 DAI (VT) CV%= 4,7-----				
Não-inoculado	27,97 ns	48,68	62,15	46,27 ns
E5L	30,64	49,58	63,88	48,03
I7L	30,88	49,48	60,92	47,09
J8L	28,87	50,80	61,79	47,15
Média	29,59 C	49,63 B	62,18 A	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical, não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p<0,05$) ns–Não significativo. Os dados representam médias de 4 repetições. Médias do fator “isolado” possui n=12. Médias do fator “doses de nitrogênio” possui n=16.

A massa seca de raízes (MSR) das plantas inoculadas e não-inoculadas apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) aos 65 DAI, com destaque para as plantas inoculadas com o isolado J8L, as quais apresentaram MSR 26% superior ao controle não-inoculado (Tabela 4). O desempenho superior das plantas inoculadas como o isolado J8L para a produção de MSR, pode ser explicado em partes pela alta atividade do isolado J8L para produção de AIA ($33,67 \mu\text{g mL}^{-1}$), determinada em ensaios preliminares (Tabela 2). Porém, a MSR de plantas inoculadas com os isolados E5L e I7L não diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) do controle não-inoculado (65 DAI). Aos 35 DAI, as médias de MSR de plantas inoculadas e não-inoculadas não diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

Em relação ao fator “doses de nitrogênio”, diferenças significativas para MSR foram observadas aos 35 e 65 DAI. Aos 35 DAI, plantas adubadas com 50 e 100 mg N kg^{-1} apresentaram médias de MSR 18% e 30% superiores ao controle sem nitrogênio, respectivamente. Aos 65 DAI, na dose 50 mg N kg^{-1} , a MSR foi em média 72% superior ao controle sem nitrogênio e na dose 100 mg kg^{-1} 83%. Contudo, diferenças significativas entre as doses 50 e 100 mg N kg^{-1} , aos 35 e 65 DAI, não foram observadas.

Tabela 4. Matéria seca da raiz (g) de plantas de milho inoculadas com bactérias diazotróficas encapsuladas em esferas de alginato e sob diferentes doses de nitrogênio, aos 35 e 65 dias após a inoculação (DAI)

Isolado	Doses de Nitrogênio (mg N kg ⁻¹)			Média
	0	50	100	
Matéria seca da raiz (g vaso ⁻¹)				
-----35 DAI (V4) CV%= 11,6-----				
Não-inoculado	10,24 ns	15,09	14,72	13,35 ns
E5L	10,10	14,05	15,87	13,34
I7L	9,60	15,08	15,85	13,51
J8L	10,10	13,92	15,36	13,13
Média	10,01 B	14,53 A	15,45 A	
-----65 DAI (VT) CV%= 4,7-----				
Não-inoculado	27,97 ns	48,68	62,15	46,27 ns
E5L	30,64	49,58	63,88	48,03
I7L	30,88	49,48	60,92	47,09
J8L	28,87	50,80	61,79	47,15
Média	29,59 C	49,63 B	62,18 A	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical, não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$) ns – Não significativo. Os dados representam médias de 4 repetições. Médias do fator “isolado” possui n=12. Médias do fator “doses de nitrogênio” possui n=16.

A atividade da nitrogenase foi avaliada aos 35 DAI e 65 DAI, sendo os resultados expressos em $\text{pmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e em $\text{pg N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Tabelas 5 e 6). Diferenças significativas ($p < 0,05$), entre plantas inoculadas e não-inoculadas foram observadas aos 65 DAI onde plantas inoculadas com isolado J8L, apresentaram média 50% superior ao controle não-inoculado. Plantas inoculadas com o isolado I7L apresentaram média 90% superior a plantas inoculadas com o isolado E5L, aos 65 DAI, porém sem diferir estatisticamente ($p > 0,05$) do controle não-inoculado. Aos 35 DAI, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) para a atividade da nitrogenase, em plantas inoculadas e não-inoculadas. Comparando a primeira coleta (35 DAI) com a segunda (65 DAI), observa-se um aumento da atividade da nitrogenase em plantas inoculadas com os isolados I7L e J8L. Porém para plantas inoculadas com o isolado E5L ou plantas não inoculadas houve uma diminuição da atividade da nitrogenase.

Em relação ao fator “doses de nitrogênio”, diferenças significativas foram observadas aos 65 DAI, onde plantas sem adubação nitrogenada apresentaram atividade da nitrogenase 53% superior às plantas com 50 e 100 mg N kg^{-1} . Como já esperado, a atividade da nitrogenase é potencializada em doses menores ou sem a adição de nitrogênio, já que altas concentrações de N podem inibir o complexo nitrogenase.

Tabela 5. Atividade da nitrogenase ($\text{pmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) nas raízes com solo rizosférico de plantas de milho inoculadas com bactérias diazotróficas encapsuladas em esferas de alginato, sob diferentes doses de nitrogênio, aos 35 e 65 dias após a inoculação (DAI)

Isolado	Doses de Nitrogênio (mg N kg ⁻¹)			Média
	0	50	100	
Atividade da nitrogenase (pmol C ₂ H ₄ g ⁻¹ h ⁻¹)				
-----35 DAI (V4) CV%= 63,1-----				
Não-inoculado	22 ns	21	13	19 ns
E5L	7	9	26	14
I7L	15	9	9	11
J8L	16	13	19	16
Média	15 ns	13	17	
-----65 DAI (VT) CV%= 49,1-----				
Não-inoculado	21 ns	12	14	16 bc
E5L	11	14	9	11 c
I7L	31	18	13	21 ab
J8L	30	16	25	23 a
Média	23 A	15 B	15 B	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical, não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). ns–Não significativo. Os dados representam médias de 4 repetições. Médias do fator “isolado” possui n=12. Médias do fator “doses de nitrogênio” possui n=16.

Tabela 6. Atividade da nitrogenase ($\text{pg N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) nas raízes com solo rizosférico de plantas de milho inoculadas com bactérias diazotróficas encapsuladas em esferas de alginato e sob diferentes doses de nitrogênio, aos 35 e 65 dias após a inoculação (DAI)

Isolado	Doses de Nitrogênio (mg N kg ⁻¹)			Média
	0	50	100	
Atividade da nitrogenase (pg N g ⁻¹ h ⁻¹)				
-----35 DAI (V4) CV%= 63,7-----				
Não-inoculado	209 ns	200	120	176 ns
E5L	059	085	246	130
I7L	143	086	082	104
J8L	151	120	179	150
Média	140 ns	123	157	
-----65 DAI (VT) CV%= 49,1-----				
Não-inoculado	198 ns	110	127	145 bc
E5L	099	128	077	101 c
I7L	291	171	120	194 ab
J8L	277	146	231	218 a
Média	216 A	139 B	139 B	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). ns–Não significativo. Os dados representam médias de 4 repetições. Médias do fator “isolado” possui $n=12$. Médias do fator “doses de nitrogênio” possui $n=16$.

As populações de bactérias diazotróficas na rizosfera do milho, determinadas pela técnica do número mais provável (NMP), não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre plantas inoculadas e não-inoculadas, aos 35 e aos 65 dias após a inoculação (DAI) (Tabela 7), Comparando-se as duas coletas (35 DAI e 65 DAI), houve uma redução nas populações de bactérias diazotróficas nas plantas inoculadas e não-inoculadas, com destaque para plantas inoculadas com o isolado E5L que apresentaram uma redução de 88% aos 65 DAI.

As doses de N (fator “doses de nitrogênio”) não afetaram significativamente o NMP de bactérias diazotróficas na rizosfera do milho aos 35 DAI e aos 65 DAI.

Tabela 7. Número mais provável de bactérias diazotróficas por grama de solo rizosférico de plantas de milho inoculadas com bactérias diazotróficas encapsuladas em esferas de alginato e com diferentes doses de nitrogênio, aos 35 e 65 dias após a inoculação (DAI)

Isolado	Doses de Nitrogênio (mg N kg ⁻¹)			Média	
	0	50	100		
Número mais provável (células/g solo)					
-----35 DAI (V4) CV%= 88,8-----					
Não-inoculado	4,25E+07 ns	4,74E+07	4,10E+07	4,36E+07 ns	
E5L	6,21E+07	2,63E+07	1,01E+08	6,32E+07	
I7L	5,63E+07	4,06E+07	4,69E+07	4,79E+07	
J8L	1,96E+07	5,30E+07	1,55E+07	2,94E+07	
Média	4,51E+07 ns	4,18E+07	5,11E+07		
-----65 DAI (VT) CV%= 7,5-----					
Não-inoculado	3,04E+06 ns	8,08E+06	3,14E+07	1,42E+07 ns	
E5L	1,14E+07	1,88E+06	8,38E+06	7,21E+06	
I7L	3,54E+07	6,11E+06	8,25E+06	1,66E+07	
J8L	7,88E+06	7,00E+06	3,99E+07	1,83E+07	
Média	1,44E+07 ns	5,77E+06	2,20E+07		

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical, não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). ns–Não significativo. Os dados representam médias de 4 repetições. Médias do fator “isolado” possui $n=12$. Médias do fator “doses de nitrogênio” possui $n=16$.

4.5. Inoculação do tomateiro com bactérias diazotróficas epifíticas encapsulados em microesferas de alginato

A MSPA de tomateiros inoculados e não-inoculados, aos 25 DAI, apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) (Tabela 8). Plantas inoculadas com o isolado E5L apresentaram MSPA 39% superior ao controle não-inoculado. Aos 50 DAI, não foram observadas diferenças significativas na MSPA de plantas inoculadas e não-inoculadas ($p > 0,05$).

As doses de nitrogênio (fator “doses de nitrogênio”) afetaram significativamente a MSPA aos 50 DAI ($p < 0,05$), onde plantas adubadas com 100 e 200 mg N kg⁻¹ apresentaram médias de MSPA 16% e 24% superiores ao controle sem nitrogênio, respectivamente. Aos 25 DAI não foram observadas diferenças significativas para o fator “doses de nitrogênio”. Os resultados obtidos com a dose 200 mg N kg⁻¹ aos 50 DAI, confirmam os resultados do ensaio preliminar de otimização de doses para o tomateiro (Figura 5).

Tabela 8. Matéria seca da parte aérea (g) de plantas de tomate inoculadas com bactérias diazotróficas encapsuladas em esferas de alginato e sob diferentes doses de nitrogênio, aos 25 e 50 dias após a inoculação (DAI)

Isolado	Doses de Nitrogênio (mg N kg ⁻¹)			Média
	0	50	100	
Matéria seca da parte aérea (g vaso ⁻¹)				
-----25 DAI CV%= 21,1-----				
Não-inoculado	0,86	0,74	0,76	0,79 b
E5L	1,06	1,19	1,05	1,10 a
I7L	0,93	0,89	0,80	0,87 b
J8L	0,87	0,88	0,67	0,81 b
Média	0,93 ns	0,92	0,82	
-----50 DAI CV%= 8,9-----				
Não-inoculado	5,13 ns	6,07	7,18	6,13 ns
E5L	5,58	6,44	6,33	6,12
I7L	4,94	5,91	6,86	5,90
J8L	5,91	6,62	6,57	6,36
Média	5,39 C	6,26 B	6,73 A	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical, não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). ns–Não significativo. Os dados representam médias de 4 repetições. Médias do fator “isolado” possui $n=12$. Médias do fator “doses de nitrogênio” possui $n=16$.

A MSR do tomateiro apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) aos 50 DAI em plantas inoculadas com o isolado E5L sendo 31% superior à MSR de plantas inoculadas com o isolado I7L (Tabela 9), porém não diferindo do controle não-inoculado. Aos 25 DAI, foram observadas diferenças ao nível de significância de 6,9% para MSR, onde plantas inoculadas com o isolado E5L apresentaram média 41% superior ao controle sem inoculação.

As doses de nitrogênio (fator “doses de nitrogênio”) não afetaram significativamente a MSR aos 25 e aos 50 DAI ($p > 0,05$).

Fazendo-se uma análise comparativa entre as variáveis MSPA e MSR, com o foco no fator “doses de nitrogênio”, observa-se que, aos 50 DAI, plantas cultivadas com 200 mg N kg⁻¹ apresentaram MSPA superior ao controle sem nitrogênio, ao passo que plantas nesta mesma dose de N apresentaram MSR menor que o controle sem nitrogênio, mostrando aqui um possível efeito do direcionamento dos fotoassimilados para a parte aérea, em situação de abundância do nitrogênio.

Tabela 9. Matéria seca da raiz (mg) de plantas de tomate inoculadas com bactérias diazotróficas encapsuladas em esferas de alginato e sob diferentes doses de nitrogênio aos 25 e 50 dias após a inoculação (DAI)

Isolado	Doses de Nitrogênio (mg N kg ⁻¹)			Média
	0	50	100	
Matéria seca da raiz (mg vaso ⁻¹)				
-----25 DAI CV%= 32,1-----				
Não-inoculado	53 ns	83	55	63 b
E5L	75	73	120	89 a
I7L	70	78	75	74 ab
J8L	98	68	90	85 ab
Média	74 ns	75	85	
-----50 DAI CV%= 27,9-----				
Não-inoculado	413	600	440	484 a
E5L	406	541	436	461 a
I7L	357	339	351	349 b
J8L	506	403	379	429 ab
Média	421 ns	471	401	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical, não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). ns–Não significativo. Os dados representam médias de 4 repetições. Médias do fator “isolado” possui $n=12$. Médias do fator “doses de nitrogênio” possui $n=16$.

A atividade da nitrogenase foi avaliada aos 35 DAI e 65 DAI, sendo os resultados expressos em $\text{pmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e em $\text{pg N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Tabelas 10 e 11). Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram observadas aos 50 DAI, entre plantas inoculadas e não-inoculadas, onde a atividade da nitrogenase em plantas inoculadas com o isolado I7L foi de $3,5 \text{ pmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, 191% superior aos $1,2 \text{ pmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ encontrados em plantas não-inoculadas. Aos 25 DAI não foram observadas diferenças significativas para o fator “Isolado”.

Em relação ao fator “doses de nitrogênio”, diferenças significativas não foram observadas para atividade da nitrogenase aos 25 e aos 50 DAI ($p > 0,05$).

Tabela 10. Atividade da nitrogenase ($\text{pmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) na raiz com solo rizosférico de plantas de tomate inoculadas com bactérias diazotróficas encapsuladas em esferas de alginato e com diferentes doses de nitrogênio aos 35 e 65 DAI

Isolado	Doses de Nitrogênio (mg N kg ⁻¹)			Média
	0	50	100	
Atividade da nitrogenase (pmol C ₂ H ₄ g ⁻¹ h ⁻¹)				
-----25 DAI CV%= 89,1-----				
Não-inoculado	5,8 ns	6,8	7,5	6,7 ns
E5L	9,3	4,3	7,8	7,1
I7L	2,3	4,8	5,3	4,1
J8L	3,5	4,5	2,0	3,3
Média	5,2 ns	5,1	5,6	
-----50 DAI CV%= 75,1-----				
Não-inoculado	1,7 ns	0,8	1,3	1,2 b
E5L	3,2	3,1	2,0	2,7 ab
I7L	4,3	4,3	2,0	3,5 a
J8L	2,1	4,0	2,8	3,0 ab
Média	2,82 ns	3,1	2,0	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). ns–Não significativo. Os dados representam médias de 4 repetições. Médias do fator “isolado” possui $n=12$. Médias do fator “doses de nitrogênio” possui $n=16$.

Tabela 11. Atividade da nitrogenase ($\text{pg N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) na raiz com solo rizosférico de plantas de tomate inoculadas com bactérias diazotróficas encapsuladas em esferas de alginato e com diferentes doses de nitrogênio aos 35 e 65 DAI

Isolado	Doses de Nitrogênio (mg N kg ⁻¹)			Média
	0	50	100	
Atividade da nitrogenase (pg N g ⁻¹ h ⁻¹)				
-----25 DAI CV%= 89,1-----				
Não-inoculado	54,8 ns	64,5	68,8	62,7 ns
E5L	88,0	40,0	73,3	67,1
I7L	21,0	44,0	48,3	37,8
J8L	32,3	41,8	17,5	30,5
Média	49,0 ns	47,6	51,9	
-----50 DAI CV%= 75,2-----				
Não-inoculado	15,7 ns	7,6	11,7	11,7 b
E5L	29,6	28,8	18,4	25,6 ab
I7L	40,3	40,5	18,4	33,1 a
J8L	19,6	37,4	25,8	27,6 ab
Média	26,3 ns	28,6	18,6	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). ns–Não significativo. Os dados representam médias de 4 repetições. Médias do fator “isolado” possui $n=12$. Médias do fator “doses de nitrogênio” possui $n=16$.

As populações de bactérias diazotróficas na rizosfera do tomate, determinadas pelo método do número mais provável (NMP), aos 25 DAI, foram de $9,28 \cdot 10^5$ células/g em plantas inoculadas com o isolado E5L e $4,59 \cdot 10^5$ células/g em plantas não-inoculadas, diferindo entre si a um nível de significância de 8,1% (Tabela 12). Aos 50 DAI não foram observadas diferenças significativas para as populações de bactérias diazotróficas entre plantas inoculadas e não-inoculadas.

O fator “doses de nitrogênio” não teve efeito significativo sobre as populações de bactérias diazotróficas entre plantas cultivadas com adição de nitrogênio ou sem adição de nitrogênio ($p > 0,05$), aos 25 e 50 DAI.

Tabela 12. Número mais provável de bactérias diazotróficas por grama de solo rizosférico de plantas de tomate inoculadas com bactérias diazotróficas encapsuladas em esferas de alginato e com diferentes doses de nitrogênio aos 35 e 65 DAI

Isolado	Doses de Nitrogênio (mg N kg ⁻¹)			Média	
	0	50	100		
Número mais provável (células/g solo)					
-----25 DAI CV%= 32,1-----					
Não-inoculado	5,19E+05 ns	3,14E+05	5,46E+05	4,59E+05	b
E5L	9,17E+05	8,83E+05	9,83E+05	9,28E+05	a
I7L	3,94E+05	7,88E+05	6,13E+05	5,98E+05	ab
J8L	6,11E+05	4,19E+05	4,63E+05	4,98E+05	b
Média	6,10E+05 ns	6,01E+05	6,51E+05		
-----50 DAI CV%= 27,9 -----					
Não-inoculado	6,38E+05 ns	6,24E+05	6,63E+05	6,41E+05	ns
E5L	5,50E+05	1,25E+06	1,25E+06	1,02E+06	
I7L	1,01E+06	7,75E+05	1,01E+06	9,33E+05	
J8L	1,09E+06	7,25E+05	1,18E+06	9,96E+05	
Média	8,22E+05 ns	8,43E+05	1,02E+06		

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). ns – Não significativo. Os dados representam médias de 4 repetições. Médias do fator “isolado” possui n=12. Médias do fator “doses de nitrogênio” possui n=16.

5. DISCUSSÃO

O sucesso do emprego de organismos diazotróficos na agricultura, alavancado principalmente pela aplicação de rizóbios na soja, levou nos últimos anos a uma intensificação do número de trabalhos explorando relações de sucesso entre micro-organismos diazotróficos e culturas de interesse econômico, como milho (FOX et al., 2016), cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2006), trigo (VAN DOMMELEN et al., 2009), tomate (ISLAM et al., 2013), entre outras. Hungria et al. (2010), no trabalho que resultou no lançamento do primeiro inoculante na forma líquida para milho e trigo, estudaram os efeitos da aplicação de estirpes de *Azospirillum brasilense* e *Azospirillum lipoferum*, obtendo ganhos de produtividade na ordem de 16 a 30% para o milho e 9 a 18% para o trigo, em ensaios realizados sob condições de campo em duas diferentes cidades no sul do Brasil. A melhor absorção dos nutrientes em plantas inoculadas, levou os autores a atribuir os ganhos obtidos a uma outra característica comum entre bactérias diazotróficas associativas, que é a produção de fitormônios como auxina, giberelina, ácido abscísico, entre outros.

Resultados positivos com aplicação de *Azospirillum* ssp., também foram observados por Lana et al. (2012), que, em um estudo com a aplicação de estirpes de *A. brasilense* na cultura do milho em condições de campo, obtiveram incrementos de produtividade entre 7,4 e 15,4%. Os autores observaram que plantas inoculadas com *Azospirillum* ssp., sem a adição de adubação nitrogenada de cobertura, apresentaram produção similar às plantas não-inoculadas e adubadas com N em cobertura, sugerindo que é possível substituir a adubação de cobertura pela inoculação com *Azospirillum* ssp. Os autores ainda atribuíram os incrementos na produção de grãos e MSPA ao estímulo que *Azospirillum* ssp. provoca no desenvolvimento do sistema radicular, com incremento na densidade e no tamanho de pelos radiculares e no volume de raízes laterais, resultando em uma maior capacidade de absorção e utilização de água e nutrientes. No presente estudo foram observadas diferenças significativas na MSR no milho e no tomateiro, inoculados com os isolados J8L e E5L. Porém no caso do milho, este maior volume de raízes não resultou em maior MSPA.

Pandolfo et al. (2015), também inoculando milho com estirpes de *A. brasilense*, não obtiveram diferenças significativas na produção, em um estudo conduzido em condições de campo em dois diferentes locais e em duas safras. A respeito dos resultados obtidos, os autores consideram que um dos fatores limitantes para o sucesso da inoculação com *Azospirillum* na cultura do milho é a especificidade entre genótipo das plantas e das estirpes bacterianas, além

de condições edafoclimáticas, levando a uma certa imprevisibilidade e inconsistência de resultados.

Também estudando os efeitos da inoculação do milho com *A. brasilense*, Kappes et al. (2013) obtiveram respostas positivas para o índice de clorofila foliar em plantas inoculadas. Porém, esta mesma resposta não foi observada na produção de grãos. Resultados similares foram obtidos por Torres et al. (2015), os quais analisaram os efeitos da inoculação de *A. brasilense* no milho, e observaram índices de clorofila foliar superiores em plantas inoculadas, mas não observaram diferenças significativas na produção de grãos, entre plantas inoculadas e não-inoculadas. O índice de clorofila foliar é bastante sensível ao incremento de nitrogênio, devido à participação deste nutriente na biossíntese da clorofila, e é conhecido como um parâmetro relevante para a avaliação da FBN (COSTA et al., 2015). No presente trabalho, as plantas inoculadas com a estirpe I7L apresentaram atividade da nitrogenase na rizosfera quase três vezes superior ao controle não-inoculado, no ensaio com tomate aos 50 DAI, porém não alterou os demais parâmetros fisiológicos da planta.

Em um estudo conduzido por três anos, Riggs et al. (2001) avaliaram os efeitos de diversas estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas pertencentes a diferentes gêneros e isoladas de diferentes culturas, sobre oito genótipos de milho, em condições de casa-de-vegetação e campo. Ao final dos ensaios, os autores concluíram que nenhuma estirpe era capaz de diminuir os sintomas de deficiência de nitrogênio, tanto no campo quanto em casa-de-vegetação. Os autores levantaram a hipótese de que uma das causas da baixa eficiência apresentada pelos isolados estudados se deve à ausência de altos níveis de sacarose no apoplasto para que o diazotrófico prospere e se torne uma bactéria dominante nesse ambiente. Porém, segundo Muthukumarasamy et al. (2002) culturas como milho e cana-de-açúcar possuem altos níveis de sacarose no apoplasto, sendo este um importante fator para o sucesso da colonização de muitos micro-organismos diazotróficos.

Dobbelaere et al (2001) realizaram um levantamento de ensaios de inoculação de *Azospirillum* nas culturas do milho, trigo, sorgo e cevada em condições de campo e casa-de-vegetação, na Bélgica, Uruguai, México e Israel, durante o período de 1994 a 2001. Entre os pontos observados, os autores destacam que o número de células de *Azospirillum* por semente é um fator limitante, sendo a concentração de 10^6 UFC (unidades formadoras de colônia) um valor considerado baixo, e a faixa entre 10^7 e 10^8 UFC um valor ótimo. No presente trabalho, foram inoculados aproximadamente 10^8 UFC por semente de milho e tomateiro. Outro ponto destacado pelos autores é a frequente ocorrência de efeitos positivos no início do desenvolvimento da planta, os quais não são transformados em incrementos na produção final.

Esta é uma observação frequente em solos bem adubados. Assim, efeitos maiores são potencialmente obtidos em condições de adubação nitrogenada intermediária. No presente estudo, os efeitos do inoculante para a atividade da nitrogenase na rizosfera do milho, foram mais pronunciados com doses menores de N, aos 65 DAI (Tabela 5). No ensaio com o tomateiro, assim como destacado por Dobbelaere et al (2001), também foram observados efeitos positivos da inoculação no início do ciclo que não se materializaram em ganhos produtivos aos 50 DAI, porém não houve efeito de dose de N nesse estágio.

Utilizando estirpes de *A. brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* para inocular milho, em ensaios realizados em condições de campo, Araújo et al. (2015) observaram que plantas inoculadas com ambas estirpes apresentavam maior eficiência do uso do nitrogênio nas doses menores de N (84% para 30 kg N ha⁻¹ e 64% para 120 kg N ha⁻¹), e atribuíram este efeito, assim como Lana et al. (2012), a um estímulo não-nutricional provocado pelo inoculante, promovendo melhor desenvolvimento do sistema radicular e consequentemente maior absorção dos nutrientes. Também foi observado pelos autores, através da aplicação da técnica de diluição isotópica de ¹⁵N, que a FBN por *A. brasilense* contribuía com 19% do N na planta e a *H. seropedicae* com 9%. Com isso os autores concluíram que parte do efeito no crescimento das plantas é derivado da FBN e outra parte da liberação de fitormônios, como auxina.

O efeito dos fitormônios produzidos pelas BPCP também são recorrentes em estudos com culturas de famílias distantes da Poaceae, como Solanaceae. Tripathi et al. (2013), inoculando tomateiro com seis isolados fixadores de nitrogênio, observaram que 5 dos 6 isolados contribuíam de forma significativa para o aumento da altura da planta, diâmetro do fruto, nitrogênio na parte aérea e matéria fresca da raiz. Assim como já abordado nos trabalhos anteriores, os autores associaram o incremento do sistema radicular à liberação dos fitormônios. Neste estudo incrementos de 41%, na MSR de plantas inoculadas com os isolados E5L, aos 25 DAI, em relação ao controle não-inoculado, foram observados em plantas de tomateiro (Tabela 9). Esse isolado, em estudos preliminares, apresentou uma produção de 27 µg mL⁻¹ de auxina *in vitro*.

Corroborando Menaka et al. (2013), Islan et al. (2013) também observaram incrementos significativos na MSR de tomateiro e pimenteira, inoculadas com nove estirpes de BPCP com alta produção de auxina e atividade de ACC-desaminase *in vitro*. Altos níveis de atividade da nitrogenase também foram observados no ensaio com pimenteira, em casa-de-vegetação, onde as plantas inoculadas com três diferentes isolados apresentaram taxas de redução de acetileno de até 20 nmol de etileno h⁻¹ g⁻¹ de raiz seca. No presente estudo, as taxas de redução de acetileno foram baixas no ensaio com tomateiro (Tabela 10), sugerindo que

aumento de MSR e MSPA, observadas aos 25 DAI em plantas com o isolado E5L, está relacionado com a produção de fitormônios.

Islan et al. (2013) também destacam que a atividade da ACC-desaminase da ordem de 0,33 nM de α -ketobutirato/min/mg de proteína é suficiente para que as bactérias promovam o crescimento e desenvolvimento da planta. A aplicação de fitormônios exógenos tem um importante papel no desenvolvimento das plantas. Porém, em casos específicos, auxina por exemplo, podem em concentrações elevadas ativar a síntese de etileno (RIBAUDO et al., 2006). Dobbelaere et al. (2001) observaram que a inoculação de trigo com *A. brasilense* à uma densidade de inóculo de 10^5 - 10^6 UFC/ planta estimulou o desenvolvimento radicular. Porém, altas densidades de inóculo (10^7 - 10^8 UFC / planta) não mostraram efeito ou, em alguns casos, chegaram a inibir o desenvolvimento das raízes. Este efeito inibitório, segundo os autores, estaria associado ao grande número de células bacterianas, produzindo quantidades excessivas de fitormônios que causam a inibição do crescimento radicular, enquanto menores concentrações de bactérias tendem a produzir níveis intermediários de AIA, promovendo aumentos no desenvolvimento de raízes. Neste mesmo trabalho foram também inoculadas plantas de milho, mas o efeito deletério da alta densidade de inóculo não foi observado, sugerindo que a densidade ideal de inóculo depende também da planta a ser inoculada. No presente trabalho foi utilizado a densidade de inóculo de aproximadamente 10^8 UFC/planta, para o milho e o tomateiro, mas as atividades de ACC-desaminase ou produção de etileno não foram avaliadas.

Em um trabalho aplicando *A. brasilense* no sulco de plantio do milho, Morais et al. (2016) destacam que altas concentrações do inoculante podem, além de exercer efeito inibitório no desenvolvimento radicular provocado por altas taxas de auxina, provocar também um desbalanço na população de micro-organismos do solo, removendo micro-organismos que desenvolvem associações benéficas na rizosfera da planta. Ainda neste estudo, foi observado que altas doses de nitrogênio não afetavam o efeito do inoculante no crescimento das plantas, sugerindo que o micro-organismo inoculado possuía mecanismos de promoção de crescimento diferentes da FBN.

Estudando os efeitos de uma mistura de BPCPs, composta por estipes de *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus pumilus*, aplicadas no tomateiro, Adesemoye; Torbert e Kloepper (2010) observaram que o inoculante utilizado melhorou a eficiência do uso de fertilizantes químicos pelas plantas, reduzindo a aplicação de N à 75% do ideal, sem provocar perdas na produtividade. Segundo os autores, os benefícios obtidos com a inoculação de BPCPs podem ser vistos a partir de duas perspectivas: pela primeira, a maior absorção de N devido a aplicação

das BPCPs, requer um menor uso de fertilizantes, enquanto ainda mantem a alta produtividade; pela segunda, o uso de BPCPs pode ajudar a reduzir a lixiviação de N durante o período de crescimento das plantas e reduzir o N residual nos solos após a colheita. Corroborando os resultados de Adesemoye, Torbert e Kloepper (2010), Galindo et al. (2016), em um estudo com a aplicação de *A. brasilense* no milho, observaram uma maior eficiência do uso do fertilizante nitrogenado em plantas inoculadas, resultando em menores perdas de N. Plantas inoculadas com BPCPs, tendem a aumentar as taxas de fixação de CO₂, resultando em um desenvolvimento maior e mais rápido do sistema radicular, e melhorando a absorção dos nutrientes (PANKIEVICZ et al., 2015).

A grande maioria das BPCPs utilizadas nos estudos com não-leguminosas são classificadas como endofíticas obrigatórias ou facultativas, quando a sua forma de colonização. Sala et al. (2005), testando isolados diazotróficos endofíticos dos gêneros *Azospirillum* ssp. e *Herbaspirillum* ssp. em dois genótipos de trigo, constataram que em um dos genótipos estudados, apenas um isolado causou incrementos significativos nos parâmetros de crescimento avaliados, apesar das bactérias terem sido inoculadas no genótipo do qual foram originalmente isoladas. Assim eles concluíram que uma das variáveis que contribui para a complexidade das respostas à inoculação é a especificidade planta-bactéria. Iniguez, Dong e Triplett (2004), avaliando o efeito de isolados endofíticos do gênero *Klebsiella* em três cultivares de trigo, observaram que apenas um dos cultivares apresentou ganhos significativos na MSPA com a inoculação de estirpes originalmente isoladas do milho.

Inoculando três cultivares de sorgo com um consórcio de quatro estirpes de *Burkholderia* ssp. e *Herbaspirillum* ssp., Santos et al. (2017) encontraram aumentos significativos do crescimento das plantas em todos genótipos em relação ao controle não-inoculado, independente da dose de fertilizante nitrogenado aplicada. Estes resultados sugerem que uso de consórcios microbianos para inoculação de plantas pode ser uma alternativa para minimizar a especificidade genotípica.

Com relação a atividade da nitrogenase, as maiores taxas encontrados no presente trabalho foram de 30 pmol C₂H₄ g⁻¹ h¹ (Tabelas 6 e 11), valores relativamente baixos se comparados com os resultados apresentados por Elbeltagy et al. (2001), os quais avaliaram o efeito de estirpes endofíticas de *Herbaspirillum* spp., em quatro genótipos de arroz, sendo dois do tipo selvagem e dois melhorados geneticamente, e observaram que os genótipos selvagens inoculados apresentavam atividade da nitrogenase de 66 nmol C₂H₄ g⁻¹ h⁻¹. Porém, genótipos melhorados geneticamente, também inoculados, não apresentaram atividade da nitrogenase

detectável, sugerindo a existência de uma certa especificidade ou afinidade da planta hospedeira em relação a determinados grupos de endofíticos.

Avaliando os efeitos da BPCP *Enterobacter radicincitans* no tomateiro, Berger, Brock e Ruppel (2013) observaram que plantas inoculadas tiveram redução da expressão dos genes *LeLoxA* e *LeAOS3*, envolvidos na síntese de enzimas da via do ácido jasmônico, que é antogônico ao ácido salicílico e está envolvido nas respostas de defesa das plantas, sugerindo desta forma que a presença de *E. radicincitans* pode alterar o balanço de fitormônios que controlam o sistema de defesa do tomateiro. Foi observada, também, uma supressão do gene *LePRI* (regulado por ácido salicílico), quando adicionadas altas doses de N ao solo. A supressão de *LePRI* em condições de alto N, pode estar associada às maiores taxas de colonização pelas bactérias nessas condições.

Com o objetivo de melhor compreender o efeito do sistema de defesa das plantas nas bactérias endofíticas, Iniguez et al. (2005) inocularam *Medicago truncatula* com uma estirpe da BPCP *Klebsiella pneumoniae*, e observaram que mutantes vegetais insensíveis ao etileno apresentaram uma hipercolonização, quando comparado com o genótipo parental não mutante. A adição exógena do inibidor de etileno, (1-Metilciclopropeno), ao parental não-mutante incrementou a colonização endofítica por *K. pneumoniae*. Genes da via de sinalização de etileno são diferencialmente expressos na presença de endófitos benéficos (CAVALCANTE et al., 2007). A expressão de genes que codificam um receptor de etileno e um fator responsivo ao etileno é, até certo ponto, dependente do genótipo vegetal e das espécies bacterianas inoculadas, indicando que a via de sinalização de etileno está envolvida na regulação da colonização dos tecidos vegetais pelas bactérias endofíticas (HARDOIM; VAN OVERBEEK; ELSAS, 2008).

É possível que BPCP epifíticas tenham uma vantagem adaptativa em relação às endofíticas, por serem menos afetadas pelo sistema de defesa da planta. Giri e Pati (2004) isolaram uma BPCP da filosfera de espécies arbóreas de uma floresta decídua de Midnapore, Índia, e inocularam em milho, em condições de campo. Os autores observaram incrementos na produtividade de até 37% nas plantas inoculadas sem adição de N, em comparação com o respectivo controle não-inoculado. Porém, comparado com o tratamento com adição de adubação nitrogenada, os valores foram relativamente menores, sugerindo que bactérias diazotróficas da filosfera não possuem um hospedeiro específico (GIRI; PATI, 2004). As estirpes testadas no presente trabalho foram isoladas da filosfera de bambu da Mata Atlântica, tendo mostrado capacidade de promover crescimento de cana-de-açúcar (CASSETARI, 2015).

Estudos com BPCPs originalmente isoladas do tronco de Pinus, com a superfície esterilizada, de uma floresta em regeneração próxima a Williams Lake no Canadá, mostraram,

em ensaios realizados em casa-de-vegetação, incrementos na MSPA de milho de até 38% em plantas inoculadas com as estirpes bacterianas estudadas. Com relação à FBN, utilizando a técnica de diluição isotópica de ^{15}N , foram observados incrementos de até 19% no nitrogênio derivado da fixação biológica na planta. No entanto, foi encontrada baixa colonização endofítica nas raízes do milho, sugerindo que essas BPCPs possuem característica epifítica e não são capazes de colonizar efetivamente o interior das plantas. Os resultados mostraram também que possivelmente as estirpes de *Paenibacillus* isolados do *Pinus* interagem mutualisticamente com o milho, fornecendo nitrogênio para a planta hospedeira através da fixação biológica em locais de colonização na planta ricos em nutrientes (PURI; PADDA; CHANWAY, 2015).

Um dos argumentos para o uso de BPCPs endofíticas é de que no interior das plantas, essas bactérias estariam mais protegidas de estresses abióticos como variações extremas de temperatura, pH, nutrientes e disponibilidade de água, além de estresses bióticos como a competição, em relação a micro-organismos de vida livre, da rizosfera ou filosfera (CHANWAY; ANAND; YANG, 2014). Neste sentido, a técnica de encapsulamento de micro-organismos aparece como uma importante alternativa para fornecer proteção contra diversos tipos de estresses bióticos e abióticos para BPCPs com potencial agrônomo, além de possuir inúmeras vantagens em relação a outros tipos de veículos de inoculação (SCHOEBITZ; LÓPEZ; ROLDÁN, 2013).

Testando a inoculação de BPCPs encapsuladas em microesferas de alginato de sódio na cultura do algodão, WU et al. (2011) observaram que mesmo em condições de estresses salino, plantas inoculadas com BPCPs encapsuladas mantinham a mesma taxa de germinação e produção de matéria seca, se comparado com o tratamento sem estresse salino. Em contraste, plantas inoculadas com células bacterianas livres tiveram queda de 16% na matéria seca da parte aérea, além de 4% na taxa de germinação das sementes. Esses dados sugerem que microcápsulas promovem um microambiente que pode proteger as células microbianas de adversidades abióticas e incrementar a sobrevivência dos micro-organismos em condições de alta salinidade.

Estudos de inoculação das BPCPs *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas corrugata* encapsuladas em esferas de alginato de sódio, mostraram incrementos de até 141% e 67% na MSPA de plantas de milho inoculadas com BPCP encapsuladas, e na forma livre, respectivamente, em comparação com os controles não-inoculados. Para MSR também foram observados aumentos significativos (86%) em plantas inoculadas com as microcápsulas, em comparação com o controle não-inoculado. Com relação ao número de unidades formadoras de colônia (UFC), raízes de plantas inoculadas com BPCPs encapsuladas mostraram uma

população de aproximadamente 1.10^6 UFC g^{-1} de solo enquanto que raízes de plantas inoculadas 1.10^3 UFC g^{-1} de solo, aos 42 DAI (TRIVEDI et al., 2005). No ensaio com milho do presente trabalho foram observados incrementos na MSR de até 33% para plantas inoculadas com isolados encapsuladas em microesferas de alginato de sódio (Tabela 4).

Apesar de conferir proteção ao inóculo, cápsulas de alginato são biodegradadas no solo ao longo do tempo (Young et al., 2006), podendo a taxa de degradação variar em função das propriedades físicas e químicas da esfera, tais como grau de porosidade, material de enchimento (quando existente) ou biopolímero utilizado no processo de formação das microcápsulas (CHAN et al., 2011). Neste estudo aos 25 DAI não foram detectadas esferas de alginato íntegras no solo. Esses dados sugerem que diminuir a taxa de degradação das microesferas no solo, talvez seja uma alternativa para aumentar a eficiência do inóculo, e deve ser avaliada no futuro.

O solo é um ambiente hostil para a introdução de bactérias benéficas. O tampão biológico que é exercido pela biomassa microbiana metabolicamente ativa do solo é uma possível explicação para o fracasso de muitos inoculantes. A competição é ainda mais intensa na rizosfera devido à alta densidade populacional microbiana, geralmente 10 a 20 vezes maior do que no solo não-rizosférico. Na maioria dos casos, a densidade inicial do inóculo introduzido, declina progressivamente ao longo do tempo, tornando-se pequena sua proporção em relação a microbiota total da rizosfera (LANDA et al., 2002).

Sendo assim, é possível que o fato da população final de micro-organismos diazotróficos em plantas inoculadas neste estudo não terem diferido significativamente do controle sem inoculação, com exceção para o isolado E5L no tomateiro aos 25 DAI (Tabelas 8 e 13), se deve à presença da comunidade de diazotróficas nativa que possivelmente se manteve ativa ao longo do tempo nas plantas inoculadas e não-inoculadas.

No intuito de melhorar a capacidade de BPCPs em colonizar a rizosfera de plantas de interesse agrônomo e consequentemente potencializar os mecanismos de promoção de crescimento, Setten et al. (2013) obtiveram uma estirpe mutante de *Pseudomonas* a partir da recombinação genética de uma *Pseudomonas*, com característica de agente de controle biológico altamente competitivo e a capacidade de colonizar a rizosfera de uma vasta variedade de espécies, com uma *Pseudomonas* fixadora de nitrogênio. Em ensaios em casa-de-vegetação com a estirpe mutante gerada (Pf-5 X940), os autores observaram alta capacidade de promover crescimento mesmo na ausência de N (equivalente quase 100% da adubação nitrogenada) para as plantas de alfafa, milho e *Arabidopsis*.

No sentido de confirmar os resultados obtidos por Setten et al. (2013), Fox et al. (2016) realizaram ensaios em casa-de-vegetação com milho e trigo utilizando a mesma estirpe Pf-5

X940, e observaram incrementos na biomassa de 115% para o milho e 112% para trigo em plantas inoculadas com Pf-5 X940, em comparação com plantas inoculadas com a estirpe parental não fixadora de N Pf-5. As quantidades de N derivada da fixação biológica de N, determinadas através da técnica de diluição isotópica de N¹⁵, mostraram até 82% de nitrogênio derivado da fixação biológica na parte aérea de plantas inoculados com a estirpe Pf-5 X940. No entanto, o tamanho da população de Pf-5 X940 na rizosfera das plantas aos 60 dias após inoculação, foi baixa em comparação com a estirpe parental não fixadora de N. Os autores sugerem que o custo da manutenção da FBN pode levar as bactérias diazotróficas a reduzirem sua capacidade de sobrevivência.

De qualquer forma, os resultados obtidos por Fox et al. (2016) somado aos estudos apresentados no presente trabalho, levam a concluir que BPCPs contribuem para o desenvolvimento das plantas de diferentes formas, podendo uma mesma BPCP possuir um ou mais mecanismos de promoção de crescimento. O quão eficiente estas BPCPs são para promover o crescimento das plantas depende de fatores relacionados aos genótipos das BPCPs e das plantas, além de fatores intrínsecos do ambiente.

6. CONCLUSÃO

Ensaio *in vitro* apontavam o isolado diazotrófico I7L como a estirpe de maior potencial para promover o crescimento de plantas, porém foram observados, nos ensaios de inoculação do milho e tomateiro, aumentos significativos de MSR e MSPA somente com os isolados J8L e E5L. Enquanto o isolado E5L causou aumento significativo da MSR e MSPA apenas na primeira coleta do tomateiro, o isolado J8L alterou significativamente os parâmetros de crescimento do milho na segunda coleta, aos 60 DAI, sugerindo que os dois isolados apresentam diferentes mecanismos de promoção de crescimento e colonização da rizosfera.

Os ensaios de redução de acetileno nos experimentos com o tomateiro sugerem que as contribuições de E5L para o crescimento da planta não foram devido à FBN. Nos ensaios com milho, plantas inoculadas com o isolado J8L apresentaram aumentos significativos na atividade da nitrogenase, sugerindo que parte do aumento da MSR em plantas inoculadas com o isolado J8L foi derivado da FBN, podendo os efeitos de ambos isolados serem mais significativos se a persistência das microcápsulas no solo for maior.

Os isolados E5L e J8L, originalmente isolados da superfície de folhas da liteira de espécies vegetais da Mata Atlântica, causaram aumentos significativos de MSR, MSPA e atividade da nitrogenase na rizosfera, indicando potencial de uso biotecnológico que pode ser aumentado com a utilização de consórcios bacterianos ou alterando a formulação das microcápsulas.

REFERÊNCIAS

- ABOU-EL-SEOUD, I. I.; ABDEL-MEGEED, A. Impact of rock materials and biofertilizations on P and K availability for maize (*Zea Maize*) under calcareous soil conditions. **Saudi journal of biological sciences**, v. 19, n. 1, p. 55–63, 2012.
- ADESEMOYE, A. O.; TORBERT, H. A.; KLOEPPER, J. W. Increased plant uptake of nitrogen from ^{15}N -depleted fertilizer using plant growth-promoting rhizobacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 46, n. 1, p. 54–58, 2010.
- 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, 2014.
- AHMAD, F.; AHMAD A, I.; KHAN, M. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, v. 163, p. 173–181, 2008.
- ANANDHAM, R. et al. Potential for plant growth promotion in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cv. ALR-2 by co-inoculation of sulfur-oxidizing bacteria and *Rhizobium*. **Microbiological research**, v. 162, n. 2, p. 139–53, 2007.
- ARAÚJO, E. O. et al. Effect of nitrogen fertilization associated with diazotrophic bacteria inoculation on nitrogen use efficiency and its biological fixation by corn determined using ^{15}N . **African Journal of Microbiology Research**, v.9, N. 9, p.643-650, 2015.
- BALDANI, J. I. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5–6, p. 911–922, 1997.
- BARBIERI, P. et al. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. **FEMS Microbiology Letters**, v. 36, p. 87–90, 1986.
- BARBOSA, H.R.; ALTERTHUM, F. The role of extracellular polysaccharide in cell viability and nitrogenase activity of *Beijerinckia derxii*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 986-988, 1992.
- BARTCHECHEN, A. et al. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasiliense* na produtividade da cultura do milho (*Zea mays* L). **Campo Digital**, v. 5, n. 1, p. 56–59, 2010.
- BASHAN, Y. et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant and Soil**, v. 378, n. 1–2, p. 1–33, 2014.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *azospirillum* promotes plant growth-a critical assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, n. C, p. 77–136, 2010.

BASHAN, Y.; SINGH, M.; LEVANONY, H. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. **Canadian Journal of Botany**, v. 67, p. 2429–2434, 1988.

BERGER, B.; BROCK, A. K.; RUPPEL, S. Nitrogen supply influences plant growth and transcriptional responses induced by *Enterobacter radicincitans* in *Solanum lycopersicum*. **Plant Soil**, v. 370, p. 641–652, 2013.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012.

BODDEY, R. M. et al. Use of the ¹⁵N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 57, n. 3, p. 235–270, 2000.

BODDEY, R. M. et al. Techniques for the quantification of plant-associated biological nitrogen fixation. In: DAKORA, F. D. et al. (Ed.). **Biological Nitrogen Fixation: Towards Poverty Alleviation Through Sustainable Agriculture**. Berkeley: Springer, 2008. Section. 1A, p. 37–41.

BOTTINI, R.; CASSAN, F.; PICCOLI, P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 5, p. 497–503, 2004.

CAMPOS, B.-H. C. DE; THEISEN, S.; GNATTA, V. Inoculante “graminante” nas culturas de trigo e aveia. **Ciência Rural**, v. 29, n. 3, p. 401–407, 1999.

CAMPOS, B.-H. C. DE; THEISEN, S.; GNATTA, V. Avaliação do inoculante “Graminante” na cultura de milho. **Ciência Rural**, v. 30, n. 4, p. 713–715, 2000.

CASSÁN, F. et al. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 28–35, 2009.

CASSETARI, A. S. **Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas**. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz ESALQ-USP, Piracicaba, 2015.

CAVALCANTE, J. J. V et al. Members of the ethylene signalling pathway are regulated in sugarcane during the association with nitrogen-fixing endophytic bacteria. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 3, p. 673–686, 2007.

CHAN, E. S. et al. Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 1, p. 225–232, 2011.

CHANWAY, C. P.; ANAND, R.; YANG, H. Nitrogen fixation outside and inside plant tissues. In: OHYAMA, T.(Ed.) **Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation**. Croatia:In Tech, 2014. p. 3-23

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Nono levantamento de grãos, safra 2016/2017**. Brasília, 2017, 161 p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_06_08_09_02_48_boletim_graos_junho_2017.pdf>. Acesso em: 10 julho 2017.

COSTA, R. R. G. F. et al. Efficiency of inoculant with *Azospirillum brasilense* on the growth and yield of second-harvest maize1. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 45, n. 3, p. 304–311, set. 2015.

DIXON, R.A.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 621–631, 2004.

DIXON, R.A.; POSTGATE, J.R. Genetic transfer of nitrogen fixation from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli*. **Nature**, v. 237, p. 102-103, 1972.

DOBBELAERE, S. et al. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 871–879, 2001.

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

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Fixação biológica de nitrogênio**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2014 Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-fixacao-biologica-de-nitrogenio/nota-tecnica>> Acesso em: 30 nov. 2015.

ELBELTAGY, A. et al. Endophytic Colonization and In Planta Nitrogen Fixation by a *Herbaspirillum* sp . Isolated from Wild Rice Species Endophytic Colonization and In Planta Nitrogen Fixation by a *Herbaspirillum* sp . Isolated from Wild Rice Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5285–5293, 2001.

ERISMAN, J. W. et al. How a century of ammonia synthesis changed the world. **Nature Geoscience**, v. 1, n. October 2008, p. 636–639, 2008.

FOX, A. R. et al. Major cereal crops benefit from biological nitrogen fixation when inoculated with the nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas protegens* Pf-5 X940. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 10, p. 3522–3534, 2016.

FRACETTO, G. G. M. et al. Tomato ethylene mutants exhibit differences in arbuscular mycorrhiza development and levels of plant defense-related transcripts. **Symbiosis**, v. 60, n. 3, p. 155–167, 2013.

FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1–2, p. 35–59, 2009.

GALINDO, F. S. et al. Corn Yield and Foliar Diagnosis Affected by Nitrogen Fertilization and Inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 40, n. 1, p. 1-18, 2016.

GARCIA DE SALAMONE, I. E. et al. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the ^{15}N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v. 23, n. 3, p. 249–256, 1996.

GEDDES, B. A. et al. Use of plant colonizing bacteria as chassis for transfer of N_2 -fixation to cereals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 32, p. 216–222, 2015.

GERHARDT, E. C. M. et al. **Regulação pós-traducional da enzima nitrogenase em *Azospirillum brasilense***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2012.

GIRI, S.; PATI, B. R. A comparative study on phyllosphere nitrogen fixation by newly isolated *Corynebacterium* spp. and *Flavobacterium* spp. and their potentialities as biofertilizer. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 51, n. 1–2, p. 47–56, 2004.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1-15, 2012.

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological research**, v. 169, n. 1, p. 30–39, 2014.

GOUGH, C.; CULLIMORE, J. Lipo-chitoooligosaccharide Signaling in Endosymbiotic Plant-Microbe Interactions. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, v. 24, n. 8, p. 867–878, 2011.

GUPTA, M. et al. Enhanced biomass and steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* treated with phosphate-solubilizing bacteria and rock phosphate. **Plant Growth Regulation**, v. 65, n. 3, p. 449–457, 2011.

HALBLEIB, C.M.; LUDDEN, P.W. Regulation of biological nitrogen fixation. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1081-1084, 2000.

HARARI, A.; KIGEL, J.; OKON, Y. Involvement of IAA in the interaction between *Azospirillum brasilense* and *Panicum miliaceum* roots. **Plant and Soil**, v. 110, p. 275–282, 1988.

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, 2008.

HARDY, R. W. F. et al. The Acetylene -Ethylene Assay for N_2 Fixation: Laboratory and Field Evaluation. **Plant Physiology**, v. 43, p. 1185–1207, 1968.

HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, v. 311, n. 1–2, p. 1–18, 2008.

HERRMANN, L.; LESUEUR, D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 20, p. 8859–8873, 2013.

HINRICHSSEN, S. et al. Recent developments in synthetic nitrogen fixation. **Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. A: Inorg. Chem.**, v. 108, p. 17–47, 2012.

HOFFMAN, B. M. et al. Mechanism of Nitrogen Fixation by Nitrogenase : The Next Stage. **Chemical Reviews**, v.114, p. 4041-4062, 2014.

HOSSAIN M. B.; SATTAR M. A. Effect of Inorganic Phosphorus Fertilizer and Inoculants on Yield and Phosphorus Use Efficiency of Wheat. **Journal of Environmental Science and Natural Resources**, v. 7, n. 1, p. 75–79, 2014.

HUERGO, L. F. et al. P II signal transduction proteins: Pivotal players in post-translational control of nitrogenase activity. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 176–190, 2012.

HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1, p. 413–425, 2010.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S.; CAMPO, R. J. Biological nitrogen fixation as a key component of Nutrition for the soybean crop in Brazil. In: PROCEEDINGS OF THE 8TH WORLD SOYBEAN CONFERENCE, 2009, Beijing:Chinese Academy of Agricultural Sciences/Crop Science Society of China, 2009.

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C. Nitrogen Fixation with Soybean: The Perfect Symbiosis? **Biological Nitrogen Fixation**, v. 2, n. 55, p. 1009–1024, 2015.

INIGUEZ, A. L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E. W. Nitrogen Fixation in Wheat Provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 10, p. 1078–1085, 2004.

INIGUEZ, A. L. et al. Regulation of Enteric Endophytic Bacterial Colonization by Plant Defenses. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18, n. 2, p. 169–178, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola-LSPA IBGE** Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_%5Bmensal%5D/Fasciculo/lspa_201704.pdf>. Acesso em: 10 de Julho 2017

INTERNATIONAL PLANT NUTRITION INSTITUTE. Disponível em: <<http://brasil.ipni.net/article/BRS-3132>>. Acesso em: 10 Julho 2017

ISLAM, M. R. et al. Nitrogen-fixing bacteria with multiple plant growth-promoting activities enhance growth of tomato and red pepper. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n. 12, p. 1004–1015, 2013.

IVANOVA, E.; TEUNOU, E.; PONCELET, D. Alginate based macrocavities as inoculants carriers for production of nitrogen biofertilisers. In: BALKAN SCIENTIFIC CONFERENCE OF BIOLOGY.2005. Bulgaria, Plovdiv. Proceedings...Bulgaria, Plovdiv, 2005. p.19–21.

JAMES, E. K. et al. Infection and Colonization of Rice Seedlings by the Plant Growth-Promoting Bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, n. 9, p. 894–906, 2002.

JIA, H.-P.; QUADRELLI, E. A. Mechanistic aspects of dinitrogen cleavage and hydrogenation to produce ammonia in catalysis and organometallic chemistry: relevance of metal hydride bonds and dihydrogen. **Chem. Soc. Rev.**, v. 43, n. 2, p. 547–564, 2014.

JOHN, R. P. et al. Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 31, p. 211–226, 2011.

JONES, K. M. et al. How rhizobial symbionts invade plants : the Sinorhizobium – Medicago model. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. August, p. 619–633, 2007.

KANDEMIR, T. et al. The Haber-Bosch process revisited: On the real structure and stability of “ammonia iron” under working conditions. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 52, n. 48, p. 12723–12726, 2013.

KAPPES, C. et al. Inoculação de sementes com bactéria diazotrófica e aplicação de nitrogênio em cobertura e foliar em milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 527–538, 2013.

KESSEL, C. VAN; HARTLEY, C. Agricultural management of grain legumes : has it led to an increase in nitrogen fixation ?. **Field Crops Research**, v. 65, p.165-181, 2000.

KEUTER, A.; VELDKAMP, E.; CORRE, M. D. Asymbiotic biological nitrogen fixation in a temperate grassland as affected by management practices. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 70, p. 38–46, 2014.

KHALID, A. et al. Effect of substrate-dependent microbial ethylene production on plant growth. **Microbiology**, v.75, n. 2, p. 277-283, 2006.

KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 389–397, 18 jan. 1994.

KOGEL, K. H.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite - what decides? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 4, p. 358–363, 2006.

KOLB, W.; MARTIN, P. Response of plant roots to inoculation with *Azospirillum brasilense* and to application of indoleacetic acid. In: KLINGMÜLLER, W.(Ed.). **Azospirillum III: genetics, physiology, ecology**. Berlin: Springer, 1985. p. 215–221

LABORATÓRIO ALQUIMIA S.A. Disponível em:

<[http:// www.alquimia.com.ar/p-g-maiz.html](http://www.alquimia.com.ar/p-g-maiz.html)> <[http:// www.alquimia.com.ar/p-g-trigo.html](http://www.alquimia.com.ar/p-g-trigo.html)>.

Acesso em:04 de Julho de 2017

LAMBAIS, M. R. In silico differential display of defense-related expressed sequence tags from sugarcane tissues infected with diazotrophic endophytes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, n. 1–4, p. 103–111, 2001.

LANA, M. DO C. et al. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Revista Ceres**, v. 59, n. 3, p. 399–405, jun. 2012.

LANDA, B. B. et al. Differential ability of genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* strains to colonize the roots of pea plants. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 7, p. 3226–37, jul. 2002.

LOGANATHAN, P.; NAIR, S. Crop-specific endophytic colonization by a novel, salt-tolerant, N₂-fixing and phosphate-solubilizing *Gluconacetobacter* sp. from wild rice. **Biotechnology Letters**, v.25, p. 497–501, 2003.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 64, p. 541-556, 2009.

MAHANTY, T. et al. Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. **Environmental Science and Pollution Research**, n. November, p. 1–21, 2016.

MARTINEZ-ARGUDO, I. et al. The NifL-NifA System: a Multidomain Transcriptional Regulatory Complex That Integrates Environmental Signals **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 3, p. 601–610, 2004.

MENDIBURU, F. *Agricolae*: statistical procedures for agricultural research. **R package** version 1.2-4, 2016. URL <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>

MORAIS, T. P. et al. Inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* in the seed furrow. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 47, n. 2, p. 290–298, 2016.

MOREIRA, F. M. et al. Bactérias diazotróficas associativas: Diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, p.74-99, 2010.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2 ed. Lavras: UFLA, 2006. 729p.

MOURE, V. R. et al. The nitrogenase regulatory enzyme dinitrogenase reductase adpribosyltransferase (DraT) is activated by direct interaction with the signal transduction protein glnB. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 2, p. 279–286, 2013.

MUTHUKUMARASAMY, R. et al. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. **Current Science**, v. 83, n. 2, p. 137-145, 2002.

NIETO, K.F.;FRANKENBERGER Jr, W.T. Biosynthesis of cytokinins by *azotobacter choroococcum*. **Soil Biology & Biochemistry**, v.21, n 7, p.967-972,1989.

NIJHOFF, M. et al. Absciscic acid and gibberellin-like substances in roots and root nodules of Glycine max The process of root nodule formation in legumes requires a number of. **Plant and Soil**, v. 26, p. 19–26, 1982.

OLIVARES, J.; BEDMAR, E. J.; SANJUÁN, J. Biological nitrogen fixation in the context of global change. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 26, n. 5, p. 486–94, 2013.

OLIVEIRA, A. L. M. et al. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, n. 1–2, p. 23–32, 2006.

ONOFRE-LEMUS, J. et al. ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in Burkholderia species, and its growth-promoting effect on tomato plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 20, p. 6581–6590, 2009.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **Agenda 2030**

Disponível em <<http://nacoesunidas.org/pos2015/agenda2030/>>. Acesso em: 30 de novembro de 2015

PANDOLFO, C. M. et al. Desempenho de milho inoculado com Azospirillum brasilense associado a doses de nitrogênio em cobertura. **Agropecuária Catarinense** n. 43, p. 94–99, 2015.

PANKIEVICZ, V. C. S. et al. Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. **Plant Journal**, v. 81, n. 6, p. 907–919, 2015.

PARK, M. et al. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. **Microbiological Research**, v. 160, p. 127–133, 2005.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 220, n. Pope 1993, p. 207–220, 1996.

POOLE, R. K.; HILL, S. Respiratory Protection of Nitrogenase Activity in Azotobacter vinelandii — Roles of the Terminal Oxidases. **Bioscience Reports**, v. 17, n. 3, p. 303–317, 1997.

PURI, A.; PADDA, K. P.; CHANWAY, C. P. Can a diazotrophic endophyte originally isolated from lodgepole pine colonize an agricultural crop (corn) and promote its growth? **Soil Biology and Biochemistry**, v. 89, p. 210–216, 2015.

RAIJ, B.V.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A; FURLANI, A.M.C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2.ed. Campinas: IAC, 1996.256p. (IAC. Boletim Técnico, 100).

RAZON, L. F. Life cycle energy and greenhouse gas profile of a process for the production of ammonium sulfate from nitrogen-fixing photosynthetic cyanobacteria. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 339–346, 2012.

RAZON, L.F. Life cycle analysis of an alternative to the Haber-Bosch process: Non-renewable energy usage and global warming potential of liquid ammonia from cyanobacteria. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v.33, p.618-624, 2014.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

REED, S. C.; CLEVELAND, C. C.; TOWNSEND, A. R. Tree Species Control Rates of Free-Living Nitrogen Fixation in a Tropical Rain Forest. **Ecology**, v. 89, n. 10, p. 2924–2934, 2008.

REES, D. C.; HOWARD, J. B. Nitrogenase: Standing at the crossroads. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, n. 5, p. 559–566, 2000.

REPKE, R. A. et al. Eficiência da Azospirillum brasilense Combinada com Doses de Nitrogênio no Desenvolvimento de Plantas de Milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 12, n. 3, p. 214–226, 2013.

RIBAUDO, C. M. et al. Azospirillum sp. Promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 25, n. 2, p. 175–185, 2006.

RIGGS, P.J. et al. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p.829–836, 2001.

RODRIGUES, N.J.; MALAVOLTA, J.R.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de Xanthomonas campestris pv. citri Tipo B. **Summa Phytolopathologica**, Botucatu, v. 2, p. 16, 1986.

SALA, V. M. R. et al. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 1, p. 345–352, 2005.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v. 111, n. 5, p. 743–767, 2013.

SANTOS, C. L. R. et al. Contribution of a mixed inoculant containing strains of Burkholderia spp. and Herbaspirillum spp. to the growth of three sorghum genotypes under increased nitrogen fertilization levels. **Applied Soil Ecology**, v. 113, p. 96–106, 2017.

SANTOS, K. F. D. N. et al. Wheat colonization by an Azospirillum brasilense ammonium-excreting strain reveals upregulation of nitrogenase and superior plant growth promotion. **Plant and Soil**, p. 1–11, 2016.

SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas para crescimento de plantas. **Summa Phytolopathologica**, Botucatu, v.1, p. 231-234, 1975.

SCHMITZ, R. A; KLOPPROGGE, K.; GRABBE, R. Regulation of nitrogen fixation in Klebsiella pneumoniae and Azotobacter vinelandii: NifL, transducing two environmental signals to the nif transcriptional activator NifA. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 235–242, 2002.

SCHOEBITZ, M.; LÓPEZ, M. D.; ROLDÁN, A. Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil-plant fertilization. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 33, n. 4, p. 751–765, 2013.

SERGEEVA, E.; LIAIMER, A.; BERGMAN, B. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. **Source: Planta**, v. 215, n. 2, p. 229–238, 2002.

SETTEN, L. et al. Engineering *Pseudomonas protegens* Pf-5 for Nitrogen Fixation and its Application to Improve Plant Growth under Nitrogen-Deficient Conditions. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

SHAHAROONA, B. et al. Fertilizer-dependent efficiency of *Pseudomonads* for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 1, p. 147–155, 2008.

SILVA, M.F. et al. Survival of endophytic bacteria in polymer-based inoculants and efficiency of their application to sugarcane. **Plant Soil**, v.356, p. 231–243, 2012.

SIVAKUMAR, P. K.; PARTHASARTHI, R.; LAKSHMIPRIYA, V. P. Original Research Article Encapsulation of plant growth promoting inoculant in bacterial alginate beads enriched with humic acid. **International Jornal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 6, p. 415–422, 2014.

SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J.; SRINIVASAN, M. Rhizosphere Bacterial Signalling: A Love Parade Beneath Our Feet. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 30, n. 4, p. 205–240, 19 jan. 2004.

SUMAN, A. et al. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant Growth Regulation**, v.47, p. 155–162, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Tradução de SANTARÉM, E.R. 4ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2009. 817p

TALBOYS, P. J. et al. Auxin secretion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 both stimulates root exudation and limits phosphorus uptake in *Triticum aestivum*. **BMC Plant Biology**, 14:51, p. 1–9, 2014.

TORRES, J. L. R. et al. Corn agronomic evaluation under different doses of nitrogen and seed inoculation in savanna. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 26, p. 2568–2575, 25 jun. 2015.

TRIPATHI, J. et al. Comparative effectiveness of different isolates of *Azospirillum* on nitrogen fixation and yield and yield attributing characters of tomato in Chhattisgarh. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 28, p. 3615–3620, 2013.

TRIVEDI, P. et al. Carrier-based preparations of plant growth-promoting bacterial inoculants suitable for use in cooler regions. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p. 941–945, 2005.

UNKOVICH, M.; BALDOCK, J. Measurement of asymbiotic N₂ fixation in Australian

agriculture. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 2915–2921, 2008.

URETA, A.; NORDLUND, S. Evidence for Conformational Protection of Nitrogenase against Oxygen in *Gluconacetobacter diazotrophicus* by a Putative FeSII Protein. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 20, p. 5805–5809, 2002.

VAN DOMMELEN, A. et al. Wheat growth promotion through inoculation with an ammonium-excreting mutant of *Azospirillum brasilense*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 45, n. 5, p. 549–553, 2009.

WEERT, S. et al. Flagella-Driven Chemotaxis Towards Exudate Components Is an Important Trait for Tomato Root Colonization by *Pseudomonas fluorescens*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, n. 11, p. 1173–1180, 2002.

WU, Z. et al. Preparation of calcium-alginate microcapsuled microbial fertilizer coating *Klebsiella oxytoca* Rs-5 and its performance under salinity stress. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, n. 2, p. 152–159, 2011.

YONEYAMA, T. et al. The natural ¹⁵N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). **Plant and Soil**, v.189 p. 239–244, 1997.

YOUNG, C.-C. et al. Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid. **Biotechnology Bioengineering**, v.95, p.76-83, 2006.

ZHAO, Y. et al. Diversity of nitrogenase systems in diazotrophs. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 48, n. 7, p. 745–755, 2006.

ANEXOS

ANEXO A. Meio de cultura Dyg (RODRIGUES; MALAVOLTA; VICTOR, 1986)

Glicose	2g
Ácido málico.....	2g
Peptona.....	1,5g
Extrato de levedura	2g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄	0,5g
Ácido glutâmico.....	1,8g

Completar com água destilada para 1L

Ajustar pH para 7,5

ANEXO B. Meio de cultura JNFb (DOBEREINER et al., 1995).

Ácido Málico.....	5g
K ₂ HPO ₄	0,6g
KH ₂ PO ₄	1,8g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,2g
NaCl	0,1g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02g
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,002g
Azul de Bromotimol (0,5% em 2N de KOH).....	2mL
FeEDTA (1,64%)	4mL
KOH	4,5g
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,00008g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0024g

Completar com água destilada para 1L

Ajustar pH para 7,5

ANEXO C. Configuração utilizada no Jet Cutter

Motor	2007 rpm
Wires	60
Wire	100 μ m
Nozzle	900 μ m
Angle.....	41 deg
Flowrate	4,6 g/s
Density	1,00 g/mL
Shrinkage	1 diam
Jet velocity	7,23 m/s
Jet-wire –ratio	1,15
Cylinder ratio	3,9
Theor.loss.....	8,7 %
Theor. Diameter drop.....	1521 μ m;
Theor. Diameter bead.....	1521 μ m
Bomba.....	50 %