



Lívia Maria Ferraz da Fonseca

**INOCULAÇÃO COM ESTIRPES DE *AZOSPIRILLUM* E
ADUBAÇÃO NITROGENADA NO ACÚMULO DE
NUTRIENTES E PRODUTIVIDADE DE MILHO**

Sete Lagoas

2014

Livia Maria Ferraz da Fonseca

**INOCULAÇÃO COM ESTIRPES DE *AZOSPIRILLUM* E
ADUBAÇÃO NITROGENADA NO ACÚMULO DE
NUTRIENTES E PRODUTIVIDADE DE MILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias (área de concentração: Produção Vegetal) da Universidade Federal de São João Del Rei, Campus Sete Lagoas, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

Orientador: Profº Dr. Ivanildo Evódio Marriel

Coorientadora: Dra. Christiane Abreu de Oliveira Paiva

Sete Lagoas

2014

Lívia Maria Ferraz da Fonseca

**INOCULAÇÃO COM ESTIRPES DE *AZOSPIRILLUM* E
ADUBAÇÃO NITROGENADA NO ACÚMULO DE
NUTRIENTES E PRODUTIVIDADE DE MILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias (área de concentração: Produção Vegetal) da Universidade Federal de São João Del Rei, Campus Sete Lagoas, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

Orientador: Profº Dr. Ivanildo Evódio Marriel

Coorientadora: Dra. Christiane Abreu de Oliveira Paiva

Sete Lagoas, 21 de agosto de 2014

Banca examinadora:

Dr. Francisco Adriano de Souza – Embrapa Milho e Sorgo

Profº Dr. Silvino Guimarães Moreira - Universidade Federal de São João del Rei/CSL

Orientador: Profº Dr. Ivanildo Evódio Marriel

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Divisão de Biblioteca da UFSJ, MG, Brasil.

F676i Fonseca, Livia Maria Ferraz da ,1985.
2014 Inoculação com estirpes de Azospirillum e adubação nitrogenada no acúmulo de nutrientes e produtividade de milho / Livia Maria Ferraz da Fonseca.-- 2014.
47f.

Orientador: Ivanildo Evódio Marriel

Co-orientadora: Christiane Abreu de Oliveira Paiva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de São João Del-Rei, Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias.

Inclui bibliografia.

1. Milho - Cultivo - Teses. 2. Milho - Adubação - Bactérias diazotróficas - Teses. 3. Milho - Adubação nitrogenada - Teses. I. Marriel, Ivanildo Evódio. II. Paiva, Christiane Abreu de Oliveira. III. Universidade Federal de São João Del-Rei. Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias. IV. Título.

CDU: 63

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”.
Albert Einstein

DEDICO

À minha amada mãe, Nedina Natalina Ferraz da Fonseca, que nunca mediu esforços para que meus sonhos e objetivos fossem realizados. Que é o meu exemplo diário de força, persistência e amor. Que sempre me apoiou nos momentos mais difíceis, sendo sempre meu espelho.

Ao meu pai Joaquim Toledo da Fonseca (*in memoriam*), que sei que sentiria muito orgulho de me ver chegar até aqui. E sei que onde quer que ele esteja está olhando e me guiando sempre.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me guiar e me dar forças sempre para seguir em frente.

À minha mãe, pelo exemplo de vida, pela dedicação incansável, pelo amor, confiança, por ser meu porto seguro e nunca me deixar desistir. À minha irmã Léia pelo apoio, por entender minha ausência e pela paciência. Ao meu irmão Ivair pelas orações de sempre.

À cidade de Sete Lagoas pela hospitalidade e pelos dois anos maravilhosos aqui vividos. A Embrapa Milho e Sorgo por toda a infraestrutura para o desenvolvimento do meu trabalho. Ao meu orientador dr. Ivanildo por todos os ensinamentos, pela orientação, pela amizade e por me ajudar sempre, assim como minha coorientadora dra. Christiane agradeço imensamente pela paciência e pela orientação. Obrigada a todos do laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo pelo companheirismo, principalmente as amigas Carol e Aline, a analista Bianca pela paciência e motivação de sempre, um agradecimento especial à Renatinha por ter ajudado imensamente na realização deste trabalho. À amiga Denise por ter se tornado muito mais que uma companheira de mestrado, obrigada pela amizade, pelos ótimos momentos juntas, pelos estudos, pelo conhecimento.

Às minhas lindas amigas de mestrado Valéria e Nayara pelos momentos inesquecíveis. À amiga Mayara que se tornou uma irmã pra mim. Às minhas parceiras de república Roberta, Tamara e Karine pela convivência harmoniosa, por sermos uma família. Às minhas amigas de sempre e para sempre Simone e Té pelo apoio incondicional. Às amigas Sara e Thávilla pelo incentivo inicial para fazer o mestrado. Ao Ever por sempre me ouvir, me entender e aconselhar.

Ao programa de Pós-graduação em Produção Vegetal da UFSJ/CSL por contribuir para meu aperfeiçoamento profissional e intelectual.

À Banca examinadora pelo aceite do convite.

A todos que contribuíram para que mais esse sonho se tornasse realidade, deixo aqui o meu MUITO OBRIGADA!

INOCULAÇÃO COM ESTIRPES DE *AZOSPIRILLUM* E ADUBAÇÃO NITROGENADA NO ACÚMULO DE NUTRIENTES E PRODUTIVIDADE DE MILHO

RESUMO

O milho é um cereal de importância mundial, é insumo básico para a avicultura e suinocultura, dois setores altamente competitivos em nível internacional e grandes geradores de receitas, via exportação. O aumento da produtividade representa uma das bases para a redução do custo de produção, ao passo que o Brasil se torne competitivo também no que se diz respeito ao mercado internacional. O nitrogênio é um nutriente essencial para a cultura, sendo requerido em grandes quantidades, sendo que a importação de fertilizantes nitrogenados no país chega a até 75%. A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), realizada por bactérias diazotróficas, como as do gênero *Azospirillum*, é vista como uma das estratégias por reduzir a utilização de fertilizantes nitrogenados na agricultura e aumento da produção. Por tudo isso, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a influência de estirpes de bactérias diazotróficas sobre acúmulo de nutrientes e produtividade de milho e atividade microbiana do solo rizosférico sob quatro doses de nitrogênio. Os parâmetros analisados foram o acúmulo de massa seca, teor e eficiência no uso de nitrogênio, acúmulo dos nutrientes, nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), produtividade de grãos, atividade das enzimas arginase e urease. Os resultados mostraram que a dose de N aplicada em cobertura foi significativa ($p < 0.05$) para a produtividade de grãos, eficiência no uso de N, acúmulo de massa seca, teor de nitrogênio e atividade enzimática em geral. O uso da inoculação ocasionou efeito significativo ($p < 0.05$) para a atividade enzimática em geral e acúmulo do nutriente nitrogênio e potássio. Os resultados evidenciaram que existe uma certa especificidade na interação entre genótipo e estirpe, assim como estirpes e doses de fertilizantes nitrogenados. O uso da inoculação com *Azospirillum sp* apesar de ainda não substituir o uso de fertilizantes nitrogenados, deve ser considerado como uma alternativa promissora de sustentabilidade econômica e ambiental.

Palavras-chave: Bactérias diazotróficas, *Zeamays L.*, Nitrogênio.

INOCULATION WITH *Azospirillum* STRAINS AND NITROGEN FERTILIZATION ON NUTRIENT ACCUMULATION AND THE PRODUCTIVITY OF MAIZE

ABSTRACT

Maize is a globally important cereal, it is a fundamental input for aviculture and swine culture, two sectors highly competitive in the international level and generators of revenue, via exportation. The increase of productivity represents one of the fundamentals for the reduction of production cost, while Brazil also becomes competitive concerning the international market. Nitrogen is an essential nutrient for the culture, being required in large amounts, considering that, the import of nitrogen fertilizers in the country reaches 75%. Biological Nitrogen Fixation (BNF), performed by diazotrophic bacteria, such as those of the *Azospirillum* genus, is seen as one of the strategies to reduce the use of nitrogen fertilizers in agriculture and increase production. To do this, the main objective of this work was to evaluate the influence of diazotrophic bacteria strains over the nutrient accumulation and the productivity of maize as well as microbial activity of the rhizosphere under four doses of nitrogen. The parameters analyzed were the accumulation of dry mass, content and efficiency of nitrogen use, accumulation of the nutrients nitrogen (N), phosphorus (P) and potassium (K), grain productivity, activity of enzymes arginase and urease. The results showed that the nutrient dose applied in topping was significant ($p < 0.05$) for grain productivity, efficiency of N use, accumulation of dry mass, nitrogen content and enzyme activity in general. The use of inoculation caused significant effect ($p < 0.05$) for enzyme activity in general and accumulation of nitrogen and potassium. The results showed that there is a certain specificity in the interaction between genotype and strain, as well as strains and doses of nitrogen fertilizers. The use of inoculation with *Azospirillum* sp., despite not yet substituting the use of nitrogen fertilizers, must be considered as a promising alternative for economic and environmental sustainability.

Keywords: Diazotrophic bacteria, *Zea mays* L., Nitrogen.

SUMÁRIO

1 Introdução	10
2 Referencial Teórico.....	12
2.1 A importância do Agronegócio Brasileiro para a Economia	12
2.2 A Cultura do Milho.....	14
2.3 Funções do N e Importância da Adubação Nitrogenada na Cultura do Milho.....	15
2.4 Fixação Biológica Associativa.....	17
3. Objetivo Geral.....	19
3.1. Objetivos Específicos.....	19
4 Material e Métodos	19
4.1.1 Condução e Localização do Experimento.....	19
4.2 Características agronômicas avaliadas na cultura de milho.....	20
4.2.1 Acúmulo de Massa Seca da Parte Aérea.....	20
4.2.2 Produtividade de grãos de milho.....	20
4.2.3 Avaliação da Eficiência do Uso de N (EUN)	21
4.2.4 Acúmulo de Nitrogênio, Fósforo e Potássio na parte aérea das plantas	21
4.3 Análise da Atividade Microbiana do solo.....	22
4.3.1 Atividade enzimática	22
4.3.1.1 Atividade da Enzima Arginase	22
4.3.1.2 Atividade da enzima Urease	22
4.4 Análises Estatísticas.....	23
5 A Resultados e Discussão	23
5.1 Características agronômicas avaliadas na cultura de milho.....	23
5.1.1 Acúmulo De Massa Seca da parte aérea	23
5.1.2 Produtividade de grãos.....	25
5.1.3 Eficiência no Uso de Nitrogênio.....	28
5.1.4 Acúmulo de Nitrogênio, Fósforo e Potássio na parte aérea.....	30
5.2 A Análise da Atividade Microbiana do solo.....	33
5.2.1 Atividade das Enzimas Arginase e Urease	33
6 Conclusões	36
7 Referências Bibliográficas	37

INOCULAÇÃO COM ESTIRPES DE *AZOSPIRILLUM* E ADUBAÇÃO NITROGENADA NO ACÚMULO DE NUTRIENTES E PRODUTIVIDADE DE MILHO

1. Introdução:

O milho é uma cultura muito responsiva ao uso de nitrogênio para a sua produção e tem extrema importância econômica para o agronegócio brasileiro. Considerando apenas a produção primária, este cereal representa cerca de 37% da produção nacional de grãos. Ao mesmo tempo, é insumo básico para a avicultura e suinocultura nacional, dois setores altamente competitivos em nível internacional e grandes geradores de receitas, via exportação. O aumento da produtividade representa uma das bases para a redução do custo de produção, ao passo que o Brasil se torne competitivo também no que se diz respeito ao mercado internacional. A exportação é um dos principais caminhos para que a cadeia produtiva do milho se torne mais coordenada. Além disso, a necessidade de um novo fornecedor de milho no mundo está cada vez mais evidente. Atualmente, a taxa de crescimento do consumo do grão tem sido superior à taxa de crescimento da produção. Além disso, os principais fornecedores do cereal, como Estados Unidos e China têm apresentado elevado crescimento na taxa de consumo doméstico (MAPA, 2013).

Como o nitrogênio é um nutriente essencial para as plantas, o gasto com fertilizantes nitrogenados são relativamente altos, podendo chegar a até 40% do custo total da produção. Para garantir que não falte esse tipo de adubo, o Brasil importa cerca de 75% do total de fertilizantes nitrogenados gastos na agricultura (ANANDA, 2013).

Os microrganismos existem no planeta Terra há mais de 4 bilhões de anos e a maioria ainda permanece desconhecido ao conhecimento humano, mesmo com a utilização de técnicas modernas de biologia molecular. As suas funções ainda são menos conhecidas (MELO et al, 2002). Os que residem no solo, estão associados ao ciclos biogeoquímicos globais, sendo considerados essenciais nos mesmos, disponibilizando nutrientes dentro das cadeias tróficas em sistemas aquáticos e terrestres. Somente um grupo relativamente pequeno de microrganismos, denominados diazotróficos ou fixadores de nitrogênio, são capazes de fixar o N atmosférico, em outras palavras, são capazes de transformar o N não disponível (N_2) em uma forma disponível para as plantas (amônio), onde bactérias do gênero *Azospirillum* fazem parte deste grupo. Esse processo é denominado fixação biológica do nitrogênio (FBN), sendo realizada pelo complexo

protéico da nitrogenase, a enzima que catalisa a reação a qual é formada por duas subunidades (Fe-proteína e MoFe-proteína). A participação da FBN no ciclo biogeoquímico do nitrogênio é, sobretudo importante ao passo que a atividade das bactérias diazotróficas representa cerca de 60% do nitrogênio anualmente fixado na Terra. A FBN é vista como uma das estratégias para reduzir a utilização de fertilizantes nitrogenados na agricultura e, portanto, representa uma nova implicação do governo federal e estadual, entre as medidas a serem adotadas fortemente na agricultura para a redução dos gases do efeito estufa, através do Programa ABC (Agricultura de Baixa Emissão de Carbono) vinculado à Política Nacional sobre Mudanças Climáticas.

Segundo Coelho et al. (2006) entre 70 a 90% das pesquisas realizadas no Brasil sob diversas condições de solo, clima e sistemas de manejo demonstraram respostas positivas da cultura do milho à adubação com N. Pesquisas com bactérias fixadoras de nitrogênio que vivem em associação com algumas culturas (soja, trigo e milho), têm revelado resultados promissores. Embora ainda não se consiga substituir totalmente o adubo nitrogenado em gramíneas, como ocorre com a soja, já foi constatada uma redução de até 50% da utilização do insumo nitrogenado, o que representa uma economia relevante, a qual pode ser repassada para o consumidor final. Esta tecnologia, atende totalmente a nova e crescente demanda por uma agricultura sustentável.

Bactérias do gênero *Azospirillum* ganharam relevante destaque em todo o mundo, a partir da década de 1970 (Döbereiner & Day, 1976; Döbereiner et al., 1976), com a descoberta pela pesquisadora da Embrapa, Dra. Johanna Döbereiner (1924-2000), da capacidade de fixação biológica do nitrogênio dessas bactérias quando em associação com gramíneas. A inoculação com *Azospirillum* promoveu maior desenvolvimento das raízes além de vários outros efeitos. Já foram constatados incrementos na absorção da água e minerais, maior tolerância a estresses tais como salinidade e seca, acarretando em uma planta com maior vigor e produtividade (ex.: Bashan & Holguin, 1997; Dobbela et al., 2001; Bashan et al., 2004).

A associação entre genótipos inoculados com *Azospirillum* e diferentes doses de N podem causar importante impacto na microbiota nativa do solo, assim como um impacto ambiental e econômico, tornando-se o seu estudo de extrema relevância para agricultura.

2. Referencial Teórico:

2.1 A importância do Agronegócio Brasileiro para a Economia:

O agronegócio brasileiro apresenta grande dinamismo e tem contribuído de forma crescente na economia do país, além de ser uma atividade que gera empregos e renda. O Brasil possui um clima matizado, abundância de energia solar e praticamente 13% de toda a água doce disponível na Terra. De 388 milhões de terras agricultáveis, férteis e com capacidade para elevada produtividade, 90 milhões ainda não foram explorados. Essas são algumas das características que fazem com o país tenha grande prospecção para a agropecuária e o que estiver relacionado às essas cadeias produtivas (Silva et al., 2007). O foco atualmente é alcançar a alta competitividade e modernidade, buscando a utilização contínua de tecnologias que visem à sustentabilidade (MAPA, 2013). Segundo o Cepea (Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada), nos últimos 14 anos, o volume de exportação do agronegócio cresceu 230%, os preços externos, 101%, e o saldo comercial, 468%. A receita com as exportações para o ano de 2013 foi de US\$ 101,5 bilhões, valor 4% superior ao do ano anterior, gerando um novo recorde, no caso do milho, observou-se um crescimento de 34.56% na exportação deste cereal, tendo a China como principal parceira comercial.

Ainda se referindo ao milho, pode-se dizer que sua produção é bem dispersa no Brasil (**Figura1**), sendo que as regiões Sul e Centro-oeste respondem como maiores produtoras. O estado de Minas Gerais ocupa o terceiro lugar no ranking, respondendo por relevante parte na produção nacional (MAPA, 2013). Estima-se que o Brasil possa chegar a produzir cerca de 93,6 milhões de toneladas nas safras de 2022/23. Além de um aumento na produção, o milho também tem aumentado a sua produtividade (apesar de ainda ser considerada baixa), o que pode diminuir a necessidade de se expandir a área plantada. Atualmente, o país cultiva em torno de 53 milhões de hectares nas duas safras. A adoção de novas tecnologias, entre outros fatores tem possibilitado uma produção mais sustentável.

O milho safrinha ou de segunda safra é cultivado sob sequeiro, de janeiro a abril, logo após a colheita da safra de verão, geralmente em sucessão à cultura da soja. Por ser produzido sob condições ambientais diferentes, tais como baixas temperaturas e/ou pouca disponibilidade de água no solo, o milho safrinha requer técnicas específicas de manejo que o diferenciam das

lavouras de milho verão. No início da década de 80, no Paraná, observou-se uma elevada necessidade pela produção de milho para uso na propriedade rural, principalmente por suinocultores e avicultores. Naquela época, as únicas opções economicamente viáveis, para semeadura no período outono/inverno, era a cultura de trigo, entretanto os produtores não estavam satisfeitos com os resultados. Por conta disso, iniciou-se a produção do milho safrinha, que apresentou uma boa perspectiva de colheita e comercialização do produto, pois passou a ser colhido numa época do ano de menor oferta.

Nos dias atuais, o milho safrinha, é um sucesso no Brasil. Tanto é que, o IBGE e a Conab o denominam de "Milho da Segunda Safra" e não mais de "Milho Safrinha", devido a sua relevância para o agronegócio brasileiro. Hoje, o Brasil cultiva uma área de aproximadamente 8 milhões de hectares de milho safrinha, que é praticamente a mesma área do milho verão. De acordo com os dados levantados pela Conab, os principais Estados produtores são: Mato Grosso, Paraná, Mato Grosso do Sul, Goiás e São Paulo, com as seguintes áreas: 3,3 milhões, 2,2 milhões, 1,5 milhões, 779 mil e 342 mil hectares, respectivamente.

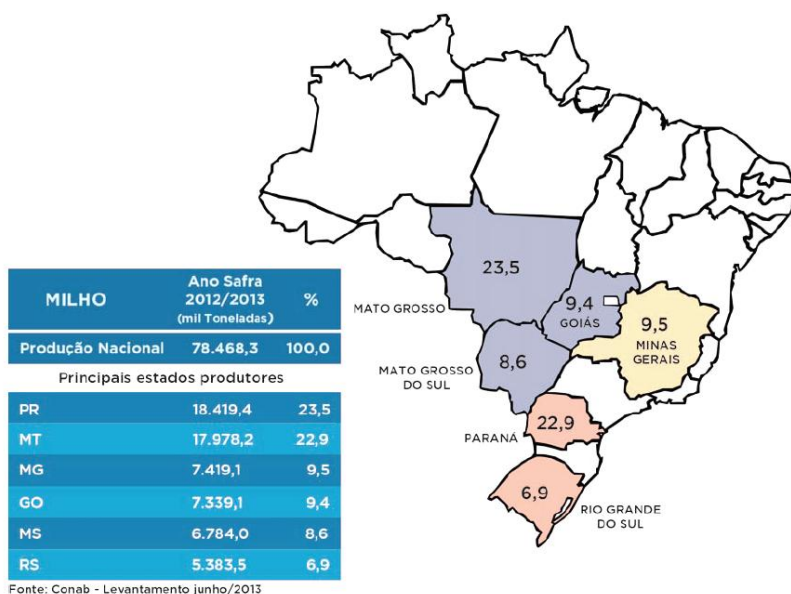


Figura 1. Principais estados produtores de Milho na safra 2012/2013. Imagem: MAPA,2013

Diante do crescimento populacional contínuo e elevada demanda por alimentos, o Brasil possui uma área que pode aumentar a produção de grãos, além de ser uma rica fonte de

biodiversidade, o Cerrado. Ele é considerado o segundo maior bioma do Brasil, perdendo apenas para a área da Amazônia (Borlaug, 2002). A área cultivada pelo Cerrado ocupa 54 milhões de hectares de pastagens; 21,6 milhões de hectares culturas; e 3,4 milhões de hectares de áreas reflorestadas (Embrapa). O solo do Cerrado é pobre em nutrientes em geral, sendo o latossolo, predominante na região, considerado um solo ácido. Apesar disso, é um solo antigo, profundo, com alta capacidade de drenagem. A realização de pesquisas que quantificaram quais as doses de corretivos, fosfatos e nitrogênio para os solos do cerrado fizeram com que os milhões de hectares do deserto ou savana brasileira, assim no meados até finais da década de 1960 se transformasse em um oásis de 79 milhões de hectares na década de 1970 (NOVAIS et al., 2007). Outro fator importante do Cerrado Brasileiro é a capacidade de armazenar carbono. A falta de florestas densas se compensa pela extensão e vegetação com raízes mais profundas. Tais raízes formam uma espécie de floresta subterrânea, que faz com que o Cerrado se torne também importante no que diz respeito à absorção de carbono da atmosfera terrestre (Hogan et al; 2002; Sawyer, 2002). O avanço e expansão da agricultura e a crescente modernização tecnológica, fizeram e fazem com que o solo do Cerrado possua benefícios inquestionáveis, como aumento na oferta de produtos agrícolas tanto para o mercado interno quanto externo, elevou-se a produtividade da agricultura, aumento na renda de vários municípios, melhoria na qualidade socioeconômica (Bonelli, 2001).

2.2 A Cultura do Milho:

O milho (*Zeamays* L.) é uma monocotiledônea pertencente à família Poaceae, gênero *Zea*, cientificamente denominado como *Zea mays* L.. Está entre as plantas de maior abrangência comercial no mundo, devido à diversidade de utilização. Sua origem foi provavelmente, nas Américas, possivelmente no México, América Central ou Sudoeste dos Estados Unidos (Garcia et al., 2006). Depois de descoberto, o milho foi levado para a Europa onde era cultivado em jardins, como espécie ornamental até que seu valor alimentício tornou-se conhecido. Devido à adaptabilidade nas diferentes condições edáficas, o milho passou a ser cultivado comercialmente em todo o mundo desde a latitude de 58° norte (antiga União Soviética) até 40°sul (Argentina) (Fornasier-Fillho, 2007; Teixeira et al., 2002).

No cenário mundial, o milho é o terceiro grão mais produzido no planeta, sendo superado apenas pelo arroz e trigo (Awira, 2011). Por ser um grão versátil, apresenta variadas maneiras de

utilização, desde alimentação humana, matéria-prima para indústrias de alta tecnologia, de cosméticos, bebidas, biocombustível e também alimentação animal, fazendo parte nas cadeias produtivas de bovinos, aves e suínos.

Apesar de o Brasil possuir relevante ocupação no ranking de produção do grão, a produtividade ainda é muito baixa se comparada aos principais produtores (Estados Unidos e China). Entre os principais fatores para a baixa produtividade do milho no Brasil, encontram-se a pequena densidade de plantio, a implantação da cultura em épocas inadequadas, o uso de cultivares com pouca adaptação à região e/ou ao sistema de produção inserido, inadequada correção e a adubação do solo e o baixo uso de fertilizantes, especialmente a adubação nitrogenada em cobertura (Cruz et al., 2009).

2.3 Funções do N e Importância da Adubação Nitrogenada na Cultura do Milho:

Assim como na maioria das culturas, os nutrientes mais requeridos pela cultura do milho são o N, P, K sendo o N, exigido em maior quantidade. As altas produtividades no milho têm sido garantidas pela adaptação de cultivares às mais variadas situações de clima e solo, pelo melhoramento genético, pela melhoria das propriedades químicas, físicas e biológicas dos solos cultivados, além de adoção de práticas culturais, tais como a utilização de doses elevadas de fertilizantes químicos.

O N faz parte da molécula de clorofila, aminoácidos e proteínas, de diversas enzimas que estão ligadas ao crescimento e desenvolvimento das plantas. Atua em processos vitais da planta, tais como, fotossíntese e respiração (Marschner, 1995; Malavolta, 2006).

O manejo de N tem sido uma das práticas mais estudadas no sentido de melhorar sua eficiência e uso, na área de fertilidade do solo, devido ao potencial de resposta das culturas e dos altos custos do nutriente. Além disso, o suprimento inadequado de nitrogênio pode causar a limitação da produtividade do milho, além de ocasionar contaminação ambiental e elevar os custos de produção (Okumura et al., 2011). Dessa forma, há relatos na literatura de que ele esteja relacionado também no aumento de peso de grãos (Ferreira et al., 2001; Amaral Filho et al., 2005), no número de espigas por planta (Fernandes et al., 2005), na altura de plantas e peso de

espigas (Araújo et al., 2004), no comprimento da espiga e crescimento radicular (Bull, 1993), no diâmetro do colmo (Mar et al., 2003), na produção de matéria seca (Araújo et al., 2004 Duete et al., 2008).

A quantidade necessária de N pela cultura do milho varia de acordo com estágio de desenvolvimento da planta, sendo menor no início do desenvolvimento e tendo o ápice durante o florescimento até a formação de grãos (Okumura et al., 2011). Apenas 2% do N do solo, estão em forma inorgânica de amônio (NH_4^+) e/ou nitrato (NO_3^-), prontamente disponíveis para a planta (Malavolta, 2006), produtos da mineralização durante o cultivo através da hidrólise enzimática realizada pela comunidade microbiana do solo e/ou pela aplicação de fertilizantes nitrogenados (Cordeiro e Hoek, 2007).

O Brasil importa atualmente cerca de 75% de N, 51% de P e 91% de K para garantir que não falte insumos para agricultura. Entre 2010 e 2011, o consumo de NPK aumentou em 32%, sendo que a produção interna teve um aumento de apenas 4,04%, no mesmo período. De acordo com a ANDA - Associação Nacional para Difusão de Adubos (2014), nos últimos 10 anos, a produção de fertilizantes expandiu 35,5% entre 1998 e 2007. Por sua vez, as importações de fertilizantes cresceram 140,5%, no mesmo período. Atualmente, as indústrias brasileiras de fertilizantes vem operando no limite da sua capacidade instalada, necessitando de instalações de novas unidades, dada que a expansão da produção tem sido inferior à das importações, que crescem cada vez mais em termos de participação sobre a oferta (ANDA, 2012).

A alta dependência da importação traz o risco de, no futuro, o país enfrentar escassez de insumos básicos. Isso ocorre porque países produtores de fertilizantes, como China, Índia e EUA, são também grandes consumidores. Com o aumento de suas demandas internas, esses países tendem a limitar suas exportações, reduzindo a oferta mundial. O governo chinês já anunciou o aumento de taxas de exportação de alguns produtos visando a assegurar a oferta de fertilizantes para a sua produção de alimentos.

Dentro deste contexto, torna-se relevante a busca de alternativas que contribuam para reduzir a dependência de fertilizantes importados, reduzir custo de produção e emissão de gases de efeito estufa atribuídas à agricultura. Dentre essas alternativas destaca-se a fixação biológica de nitrogênio.

2.4 Fixação Biológica Associativa

Nos dias atuais, em busca de uma agricultura mais sustentável e diminuição de fertilizantes químicos, o uso de bactérias que promovam crescimento e melhore a produtividade de plantas, está crescendo gradativamente (Hungria, 2011). No caso da associação biológica associativa, as bactérias do gênero *Azospirillum* têm sido as mais bem estudadas.

As bactérias do gênero *Azospirillum* são classificadas como diazotróficas (capazes de fixar o N atmosférico) e se encontram em associações com gramíneas, constituindo um dos grupos mais estudados, com várias pesquisas relacionadas a ecologia, fisiologia e genética (Baldani et al., 1997; Bashan; Holguin, 1997). São capazes de promover um maior crescimento e desenvolvimento do sistema radicular, promovendo então melhor absorção de água e nutrientes, o que pode ocasionar incrementos nos aspectos agrônômicos da planta. Tais microrganismos pertencem à classe α das proteobactérias, que abrange um extenso número de bactérias associativas a plantas, tais como *Herbaspirillum*, *Penibacillus* e *Glucanacetobacter* (Hartmann; Baldani, 2006).

Esses microrganismos apresentam metabolismo de Carbono (C) e Nitrogênio (N) bem diversificado, o que aumenta suas condições de competitividade durante o processo de colonização. Quanto às fontes de carbono, elas apresentam uma preferência por ácidos orgânicos, como malato, piruvato e succinato, assim como uma preferência de frutose sobre glucose (Quadros, 2009). No que se refere ao N, as principais fontes são amônia, nitrato, nitrito, aminoácidos e nitrogênio molecular (N_2) (Trentini, 2010). O gênero *Azospirillum* possui uma grande distribuição em solos tropicais e subtropicais, entretanto, ainda não se sabe como sobrevivem no solo na ausência de plantas hospedeiras. Há relatos de que essas bactérias possuem diferentes mecanismos de proteção, como formação de cistos e produção de melanina, que podem ajudar na sobrevivência em condições que não são favoráveis (Del Gallo; Fendirik, 1994).

O modo de ação dessas bactérias ainda não é totalmente conhecido. Existem diversos trabalhos publicados que afirmam que bactérias do gênero *Azospirillum* produzem fitohormônios capazes de estimular o crescimento e desenvolvimento de raízes em várias espécies de plantas (Hungria, 2011). Um melhor desenvolvimento do sistema radicular pode resultar em melhoria na absorção de água e nutrientes, maior tolerância a estresses, tais como salinidade e seca, o que vem a melhorar o vigor e produção da planta (Bashan & Holguin, 1997; Dobbelaere et al., 2001;

Bashan et al.,2004), e maior tolerância a fitopatógenos (Correa et al.,2008). Trabalhos mais recentes mostram respostas fisiológicas induzidas por *Azospirillum*, como melhoria nos aspectos fotossintéticos das folhas, tais como teor de clorofila e condutância estomática, maior teor de prolina na parte aérea e raízes, melhoria no potencial hídrico, aumento no teor de água do apoplasto, melhor elasticidade da parede celular, maior produção de biomassa e altura de plantas (Barassiet al. 2008). Sabe-se que além de fixar o N atmosférico quando estão associadas com gramíneas, essas bactérias podem atuar na solubilização do fosfato inorgânico (Verma et. al, 2001).

É válido ressaltar que o sucesso da associação dessas bactérias com a planta hospedeira está relacionado com o genótipo vegetal (Iniguez et. al, 2004) com as características específicas do solo (Oliveira et. al, 2006). No que se refere à associação com cereais, muitos estudos tem mostrado benefícios da inoculação com *Azospirillum*, como em trigo, cevada e aveia, onde a inoculação proporcionou incrementos significativos na produtividade (Didonet, 1998; Dalla Santa et. al, 2004). Na grande maioria dos estudos, o uso do *Azospirillum* é recomendado para a agricultura a fim de reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados, o que pode chegar em até 50% (Hungria, 2010), além de poder aumentar em até 30% a produtividade de um modo geral (Okon; Lanbadera-Gonzales, 1994). Segundo Didonet et. al (1996), a associação dessas bactérias com a planta torna-se mais eficiente quando a cultura é adubada com diferentes doses de nitrogênio, comparado com o efeito da bactéria isoladamente. Se referindo especificamente ao milho, vários trabalhos têm demonstrado os benefícios do uso de inoculantes do gênero *Azospirillum*, tais como aumento na produtividade de grãos, aumento da matéria seca, acúmulo de N na parte aérea (Okon; Lanbadera-Gonzales, 1994). Tais benefícios, principalmente na produtividade não é correlacionado apenas com o aumento de N, mas também como os nutrientes P e K(Bashan & Holguin, 1997; Steenhoudt & Vanderleyden, 2000; Bashan et al., 2004). Portanto, é importante que novos estudos continuem sendo realizados em prol de uma melhoria na eficácia dessa associação bactéria-planta.

3. Objetivo Geral:

Avaliar a influência de estirpes de bactérias do gênero *Azospirillum* sobre acúmulo de nutrientes e produtividade de milho e atividade microbiana do solo rizosférico sob quatro níveis de nitrogênio.

3.1 Objetivos Específicos:

Avaliar a influência de estirpes do gênero *Azospirillum* sobre o acúmulo de nutrientes e a produtividade de grãos de milho em solo de cerrado, com diferentes doses de N em cobertura;

Avaliar a influência de estirpes do gênero *Azospirillum* sobre a eficiência no uso de nitrogênio;

Avaliar a influência de estirpes do gênero *Azospirillum* sobre a atividade de enzimas envolvidas na ciclagem de nitrogênio na rizosfera das plantas de milho.

4. Materiais e Métodos:

4.1 Condução e localização do experimento:

O experimento foi conduzido no ano agrícola de 2012/2013, na Embrapa Milho e Sorgo, na cidade de Sete Lagoas, Minas Gerais, localizada na latitude de 19°28'S e longitude de 44°15'W, na altitude de 732 m. O solo do local é um solo de Cerrado, classificado como Latossolo Vermelho distrófico, textura argilosa, com baixa disponibilidade de Nitrogênio.

Utilizaram-se seis inoculantes da coleção de bactérias diazotróficas da Embrapa Milho e Sorgo e um controle (sem inoculante) (**tabela 1**) sob quatro níveis de nitrogênio (N), na forma de uréia (N0 = 0 de N em cobertura; N1 = 40Kg de N em cobertura; N2 = 100Kg de N em cobertura; N3 = 160Kg de N em cobertura). Os inoculantes foram preparados seguindo a metodologia descrita por Oliveira et al., 2012. Cada estirpe foi preparada em caldo de soja tripcaseína, pelo período de 72 horas, na temperatura de 29°C sob agitação. Passado esse período, as culturas enriquecidas foram centrifugadas, ressuspensas em solução salina

(0,85%NaCl) e então a densidade ótica foi ajustada para 1,0 a 500nm, o que equivale a aproximadamente 10^8 células viáveis por mL.

O milho foi semeado em delineamento de blocos ao acaso, no esquema de parcelas subdivididas; tendo as doses de N nas parcelas e inoculantes nas subparcelas; com parcelas constituídas de 4 linhas de 5 metros cada uma, com o espaçamento de 0.7 metros entre linhas e 4 repetições. A cultivar utilizada foi a 30F35 H. A adubação utilizada na semeadura foi de 250 kg ha⁻¹ do formulado NPK 8-28-16, fornecendo 20, 70 e 40 kg ha⁻¹ de NPK respectivamente. Os demais tratos culturais foram realizados de acordo com as recomendações para a cultura do milho. Todas as avaliações foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Milho e Sorgo.

Tabela1. Relação dos Inoculantes utilizados no trabalho em estudo.

Codificação do Inoculante	Inoculante
EO	Controle (sem inoculante)
E1	BDCMS 01
E2	BDCMS 02
E3	BDCMS 03
E4	BDCMS 04
E5	BDUFRJ
E6	Inoculante Comercial

4.2 Características agronômicas avaliadas na cultura de milho:

Os seguintes parâmetros foram analisados: o acúmulo de massa seca, eficiência no uso de nitrogênio, acúmulo dos nutrientes NPK e produtividade de grãos.

4.2.1 Acúmulo de Massa Seca da Parte Aérea:

Para determinação da massa seca dos tecidos vegetais, três plantas por parcela foram colhidas e então submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar, sob temperatura de 65°C até atingirem massa constante, segundo a metodologia de Oliveira et al. (2012).

4.2.2 Produtividade de grãos de Milho:

Para se estimar a produtividade de grãos, as plantas foram colhidas e como área útil para se estimar a produção, utilizaram-se as duas linhas centrais, eliminando 0.7m nas extremidades. Retirou-se toda a palha das espigas de cada parcela e depois contato individualmente, o número de fileiras de grãos, obtendo-se o valor médio. O mesmo procedimento foi usado para o número de espigas. As espigas foram debulhadas para determinação de peso de grãos e dados de produção, a umidade foi corrigida para 13% e assim a produtividade foi calculada, conforme descrito por Res et al. (2012).

4.2.3 Avaliação da Eficiência do Uso de N (EUN):

Utilizou-se a metodologia descrita por Mollet al. (1982), na qual a EUN é dada pelo produto da eficiência na absorção de N (EAN) e eficiência na utilização de N (EUtN); onde:

- EAN= Quantidade de N na planta / N aplicado no solo;
- EUtN= Produtividade de grãos / Quantidade de N na planta;

$$EUN= EAN \times EUtN$$

Para obter as eficiências, primeiramente foi necessário estimar a matéria seca da parte aérea e massa de grãos. Após a maturidade fisiológica, coletou-se três plantas por parcela e foi separado o grão da parte aérea e logo em seguida foi feita a pesagem da parte aérea. Retirou-se uma amostra de 1000 gramas que foi colocada em estufa a 65°C ate que alcançasse massa constante, obtendo-se assim a massa da parte aérea seca (MSPA). O mesmo procedimento foi utilizado para massa de grãos. Depois de determinado os teores de N, calculou-se os conteúdos de N total absorvido através da multiplicação dos teores de N pela massa seca da parte aérea e massa de grãos, podendo então calcular a EUN assim como seus componentes primários.

4.2.4 Acúmulo de Nitrogênio, Fósforo e Potássio na parte aérea das plantas

Foi obtido através da multiplicação do teor de NPK pelo peso da massa seca, conforme descrito por Wallauetal, (2008).

4,3 Análise da Atividade Microbiana do solo:

4.3.1 Atividade enzimática:

A coleta de amostras de solo rizosférico para a avaliação da atividade das enzimas realizou-se durante o estágio de florescimento. As plantas foram retiradas do solo com o sistema radicular inteiro. As raízes foram sacudidas e somente o solo bem aderido às raízes foi considerado como solo rizosférico. Este foi colocado em sacos plásticos estéreis, peneirado e armazenado em recipiente de vidro e conduzido ao laboratório para análise.

4.3.1.1 Atividade da Enzima Arginase:

A atividade da arginase nas amostras do solo foi determinada por meio da quantificação de amônio liberado pela hidrólise da arginina utilizando-se o método colorimétrico de Alef & Keiner (1986). Amostras de 1,0 g de solo foram tratadas com 0,25 mL de solução de L-arginine (0,2 g/L) e incubadas por uma hora, a 37 °C. Após a incubação, adicionou-se 4mL de solução de KCl, 1M em cada amostra que ficaram sob agitação por 30 minutos. Uma alíquota de 100 µl do sobrenadante de cada amostra foi retirada e misturada a 1,0 mL da solução de reagentes para colorimétrica. Após sessenta minutos, realizou-se a leitura no espectrofotômetro a 660 nm.

4.3.1.2 Atividade da enzima Urease:

A atividade da urease nas amostras do substrato foi determinada por meio da quantificação de amônio liberado pela hidrólise da uréia utilizando-se o método colorimétrico preconizado por Kandeler e Gerber (1988). Amostras de 0,5 g de solo foram tratadas com 0,25 mL de solução de ureia (4,8 g/L) e incubadas por uma hora a 37 °C. Após a incubação, adicionou-se 5mL de solução de KCl, 1 M em cada amostra que ficaram sob agitação por 30 minutos. Uma alíquota de 100 µl do sobrenadante de cada amostra foi retirada e misturada a 1,0 mL da solução de reagentes para colorimetria. Após sessenta minutos, realizou-se a leitura no espectrofotômetro a 660 nm.

4.4 Análises Estatísticas:

Todas as variáveis foram submetidas às análises de variância e quando significativas foi realizado o teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade ou regressão quando se tratava de fatores quantitativos através do programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011).

5.Resultados e Discussão:

5.1 Características agronômicas avaliadas na cultura de milho:

5.1.1 Influência da inoculação no acúmulo de massa seca da parte aérea:

O acúmulo de massa seca não foi influenciado pela interação de doses de N com inoculantes ($p>0.05$) (**Figura 2**), porém quando se comparou a dose de N isoladamente, esta influenciou significativamente ($p<0.05$) o acúmulo de massa seca na parte aérea da planta, gerando uma regressão polinomial quadrática (**Figura 3**). Isso corrobora com os resultados encontrados por diversos autores, como por exemplo, Majerowicz et. al 2002, que demonstraram que o aumento na dose de N propiciou maior teor de massa seca. Fernandes et al 2005 observaram também que quanto maior a disponibilidade de N, maior foi o acúmulo de massa seca. Resultados divergentes ao nosso foi encontrado por Moraes 2012 , onde não se encontrou diferenças significativas para o acúmulo de matéria seca quanto a dose de N nem para a interação de doses com inoculantes. Segundo Fallik et. al (1988) e Arsac et. al (1990), a concentração do *Azospirillum* no inoculante tem maior importância que sua dose. Tais autores comentam que níveis considerados acima do ótimo podem inibir o crescimento de plantas inoculadas, assim como concentrações abaixo do recomendado pode não apresentar efeito no crescimento, conseqüentemente, não proporcionando ganhos em produtividade. No entanto, as doses utilizadas no presente trabalho estão dentro das doses consideradas adequadas para a cultura do milho (EMBRAPA, 2012).

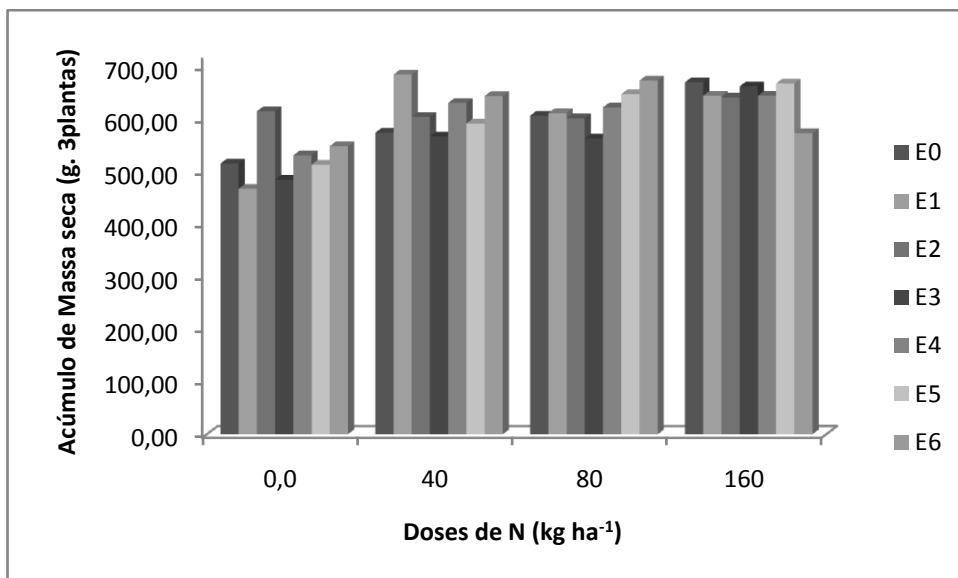


Figura 2- Acúmulo de massa seca (g.3 plantas⁻¹) em amostras de solo rizosférico de plantas de milho cultivadas em solo de cerrado na presença de seis inoculantes (E0, E1, E2, E3, E4, E5 e E6) e um controle E0 (sem inoculação) sob quatro níveis de N em cobertura. Valores médios de quatro repetições.

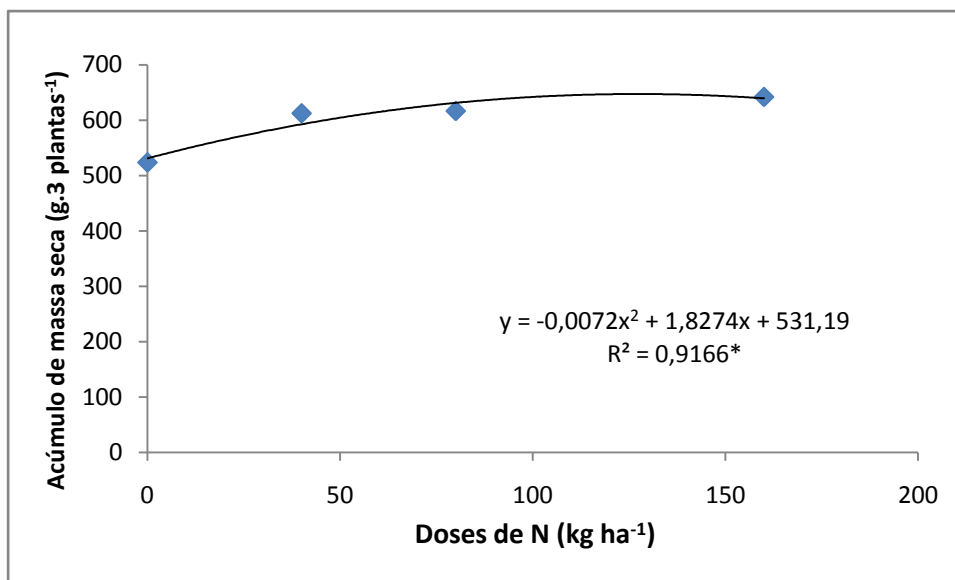


Figura 3- Efeito de doses de nitrogênio na quantidade amentada de massa secada parte aérea (g.3 plantas⁻¹) de plantas de milho cultivadas em solo de cerrado na presença de seis inoculantes e um controle (sem inoculação) sob quatro níveis de N em cobertura. Valores médios de quatro repetições.

5.1.2 Produtividade de grãos de milho:

As médias de produtividade para as seis estirpes e o controle (sem uso da inoculação), nos quatro níveis de nitrogênio estão apresentadas na **tabela2**. Houve diferença significativa ($p < 0.05$) na interação de dose com inoculante. Para os níveis N0, N1 e N2 não houve diferenciação entre as estirpes e o controle. No nível N3, as estirpes formaram dois grupos, o com as maiores médias (E1, E0 e E4) se agruparam com o controle; o outro grupo com quatro estirpes (E2, E3, E5 e E6) teve as menores médias de produtividade. Esse resultado difere dos obtidos por Dinonet et al. (1996), onde a inoculação com *Azospirillum* juntamente com a presença de adubação nitrogenada aumentou o índice de produtividade, indicando que a associação *Azospirillum*-Milho usa mais eficientemente o nitrogênio mineral aplicado ao solo, nossos tratamentos nem sempre se mostraram eficientes para a produtividade, e até mesmo observou-se efeito negativo sobre a produtividade quanto aos inoculantes, outro ponto a ser levado em consideração comparando os trabalhos são os genótipos utilizados e os isolados. Os trabalhos encontrados na literatura de maior sucesso relatam que a interação planta-inoculante pode estar relacionada a fatores da própria bactéria, como a escolha da estirpe, o número ideal de células e sua viabilidade (Okonet al. 1995). Em um trabalho mais recente, Quadros (2009) mostrou que a inoculação com *Azospirillum brasilense* e a aplicação de 50 kg ha^{-1} de nitrogênio na base, apresentou rendimento de grãos igual à aplicação de 130 kg ha^{-1} de N isoladamente para dois híbridos de milho. Portugal et al 2013, ao avaliarem a inoculação de *Azospirillum* via foliar e doses de N em cobertura verificaram acréscimos de produtividade para todas as doses de N na presença do inoculante, ocorrendo decréscimo na produção onde não houve inoculação.

Tabela 2- Produtividade média de grãos de milho, com plantas cultivadas em solo de cerrado na presença de seis inoculantes e um controle (sem inoculação) sob quatro níveis de N em cobertura. Valores médios de quatro repetições.

Inoculantes	Doses de Nitrogênio (kg ha ⁻¹)				Médias
	0	40	80	160	
	-----	Produtividade	-----	-----	
		(kg ha ⁻¹)			
E0	5483,93 b*	5944,10 b	6279,56 b	8168,55 a	6469,04 b
E1	5588,13 b	7109,99 b	6943,48 b	7795,25 a	6859,21 a
E2	5751,17 b	6896,79 b	7305,19 b	7038,88 b	6748,01 b
E3	6059,12 b	6591,63 b	6772,55 b	7257,92 b	6670,31 b
E4	5412,45 b	6978,90 b	7231,06 b	8520,01 a	7035,60 a
E5	6444,24 b	6783,70 b	6432,40 b	6988,37 b	6662,18 b
E6	5984,75 b	6213,95 b	7453,35 b	7491,04 b	6785,77 b
Médias	5817,68 b	6645,58 b	6916,80b	7608,57 a	6747,16

*médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% na coluna. N0= 0 ; N1= 40 ; N2= 80 e N3= 160 Kg ha⁻¹ de N em cobertura.

Além desses fatores associados às bactérias, os efeitos da inoculação podem também variar em função de fatores extrínsecos tais como, as condições e condução do ensaio, as técnicas utilizadas na inoculação, as características físico-químicas do solo e as próprias interações do *Azospirillum* com a comunidade microbiana nativa do solo (Chotte et al. 2002). Assim, todos esses fatores podem influenciar no tamanho da população dessas bactérias e assim afetar de forma indireta a fixação biológica de nitrogênio (FBN) e a produção de reguladores de crescimento pelas bactérias e, conseqüentemente, os parâmetros de crescimento da planta (Gadagiet al. 2004).

De maneira geral, o uso da inoculação com *Azospirillum* aumentou em até 20% a produtividade (**Figura 4**), porém, estatisticamente esse aumento não foi significativo ($p > 0.05$). Na região sul do Brasil, observa-se que a produtividade de milho pode ter incrementos de até 30%, dependendo da estirpe bacteriana (Hungria et al. 2010). O que geralmente se observa na produtividade de milho é dado em função da dose de fertilizante nitrogenado aplicado, sendo que quanto maior a dose, maiores são os ganhos em produtividade, o que foi observado também no nosso trabalho. Ao passo que a dose de nitrogênio aplicada em cobertura aumentou a produtividade também se elevou, como pode ser mostrado pela regressão na **figura 5**. Morais (2012) observou que o incremento na dose de N provocou maiores médias no rendimento de grãos de milho. Roesch et. al 2006 observaram inibição da colonização por bactérias

diazotróficas em milho quando se aplicava altas doses de N. Tal efeito pode ocorrer devido ao fato de que o N pode modificar o estado fisiológico da planta e, conseqüentemente, a interação com bactérias diazotróficas (Reis et. al, 2000).

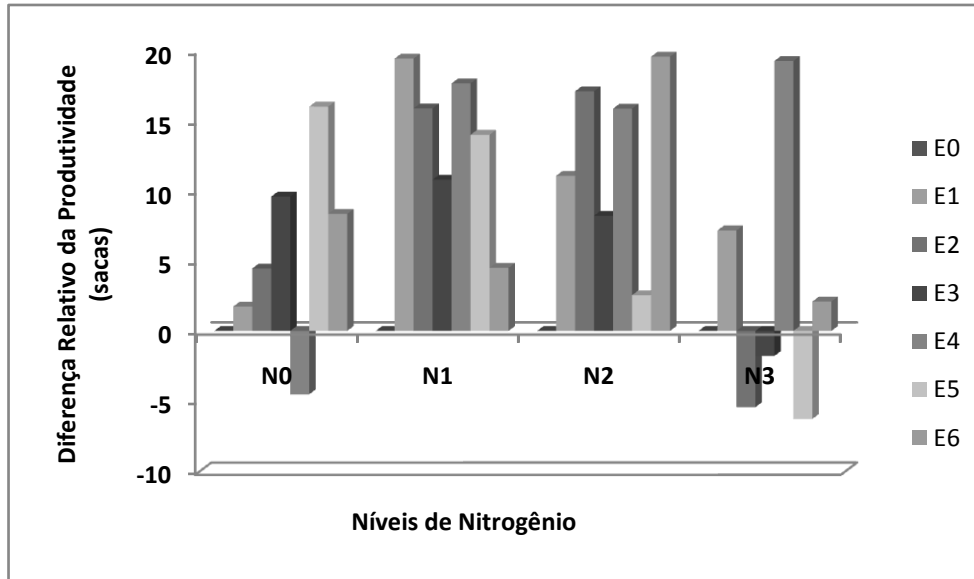


Figura 4. Diferença relativa na produtividade de grãos de milho (em sacas) de plantas cultivadas em solo de cerrado na presença de seis inoculantes e um controle (sem inoculação) sob quatro níveis de N em cobertura. Valores médios de quatro repetições.

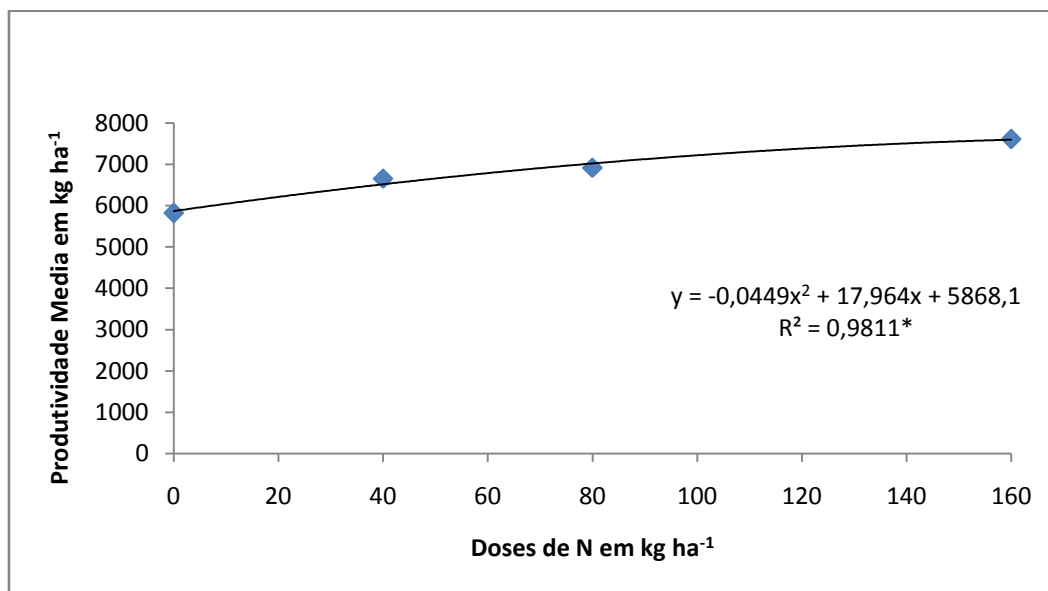


Figura 5- Regressão polinomial quadrática da produtividade de grãos de milho de plantas cultivadas em solo de cerrado na presença de seis inoculantes e um controle (sem inoculação) em função de quatro níveis de N em cobertura.

5.1.3 Eficiência no Uso de Nitrogênio:

A eficiência no uso de nitrogênio assim como seus componentes está apresentada na **tabela 6**. A dose aplicada de N foi significativa ($p < 0.05$) para a eficiência de absorção e eficiência de uso de N ao passo que a dose de nitrogênio aumentou tanto a absorção quanto a eficiência diminuíram (**Figuras 6a e 6b**), gerando uma regressão polinomial de ordem quadrática, já a eficiência de utilização de N não foi influenciada pela dose, o que corrobora com os resultados de Moll et al. (1982), que verificaram que híbridos foram menos eficientes no uso de nitrogênio em altos níveis de adubos nitrogenados. Normalmente, o aproveitamento de N diminui ao passo que se aumenta a dose aplicada, pelo fato do suprimento de N ultrapassar a demanda cultura; tal diminuição pode ter como consequência perda de amônia, que se intensifica com a dose aplicada, ademais, o fertilizante nitrogenado além de onerar custos elevados na produção, sua perda pode causar danos ao meio ambiente, como liberação de óxido nitroso na atmosfera (N_2O) e contaminação do lençol freático. Araujo et al 2013, ao avaliar a absorção de genótipos de milho inoculados com *Herbaspirillum* em diferentes níveis de N, verificou que ocorreu maior eficiência de utilização de N por plantas de milho em resposta às doses de nitrogênio.

Tabela 6. Componentes da eficiência de uso do nitrogênio: EAN (eficiência de absorção); EUtN (eficiência da utilização); e a Eficiência no Uso de Nitrogênio (EUN).

Tratamentos		Avaliações		
Doses de N(Kg ha⁻¹)				
	Inoc.	EAN (g.planta)	EUtN(g.planta)	EUN (g. kg planta)
0	E0	6,81	43,48	296,07
	E1	6,95	43,31	300,99
	E2	6,49	45,34	294,31
	E4	6,82	40,19	274,25
	E5	6,82	47,59	324,49
	E6	6,65	48,65	323,67
40	E0	2,33	46,88	109,24
	E1	2,37	53,84	127,65

	E2	2,47	46,84	115,68
	E3	2,52	43,83	110,46
	E4	2,36	49,89	117,79
	E5	2,42	46,86	113,33
	E6	2,32	50,51	117,14
	E0	1,49	39,36	58,66
	E1	1,55	41,02	63,73
	E2	1,61	43,98	70,85
	E3	1,63	38,73	63,21
	E4	1,61	40,91	66,06
	E5	1,58	39,99	63,34
80	E6	1,57	43,71	68,64
	E0	0,91	45,62	41,57
	E1	0,91	41,64	37,82
	E2	1,06	37,82	40,25
	E3	0,91	44,24	40,40
	E4	0,92	41,25	37,75
	E5	0,87	40,44	35,14
160	E6	0,90	43,82	39,57

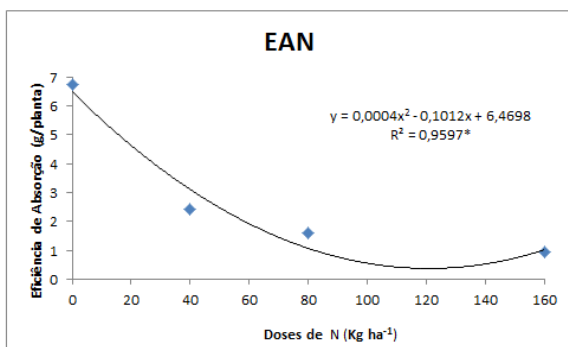


Figura 6a- Eficiência na Absorção de Nitrogênio em função da dose de N aplicada

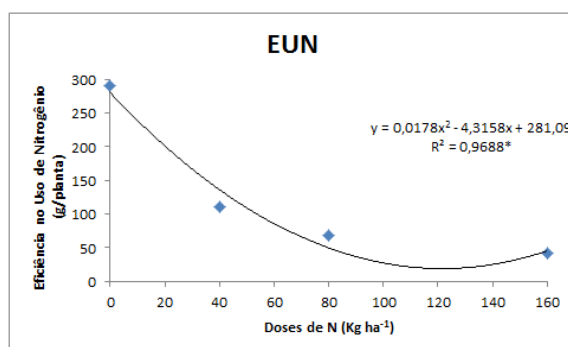
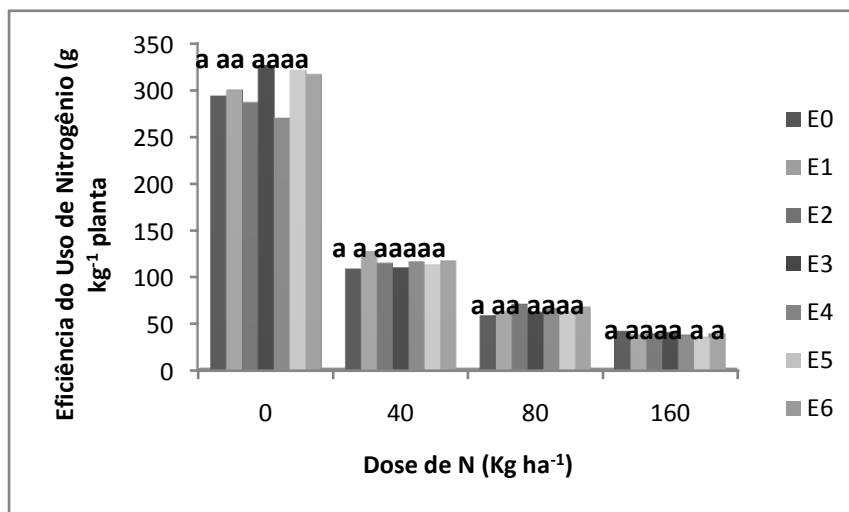


Figura 6b- Eficiência no Uso de Nitrogênio em função da dose de N aplicada

As diferentes estirpes do inoculante, assim como a interação inoculante com doses de N não apresentaram respostas significativas ($p > 0.05$) quanto a EUN (**Figura 7**), concordando com resultados apresentados por outros autores como Dotto et al. (2010), que verificaram que a inoculação com *Azospirillum* não ocasionou efeito significativo na eficiência do uso de

nitrogênio, o mesmo resultado também foi observado por Repke et al. (2013), onde não houve efeitos significativos decorrentes da aplicação do inoculante *Azospirillum brasilense* nas sementes de milho e tão pouco na interação inoculante x doses de nitrogênio. Ainda conhece-se pouco sobre as respostas das culturas às inoculações com *Azospirillum*. Níveis que ultrapassem o ótimo podem causar efeito inibitório no crescimento das plantas inoculadas, enquanto que em baixas concentrações não possui efeito algum na fase vegetativa.



*médias seguidas letras semelhantes não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5%.

Figura 7-Comportamento das seis estirpes de *Azospirillum*(E1, E2, E3, E4, E5, E6) e o controle (E0) para cada nível N em cobertura em amostras de solo rizosférico de plantas de milho cultivadas em solo de cerrado. Valores médios de quatro repetições.

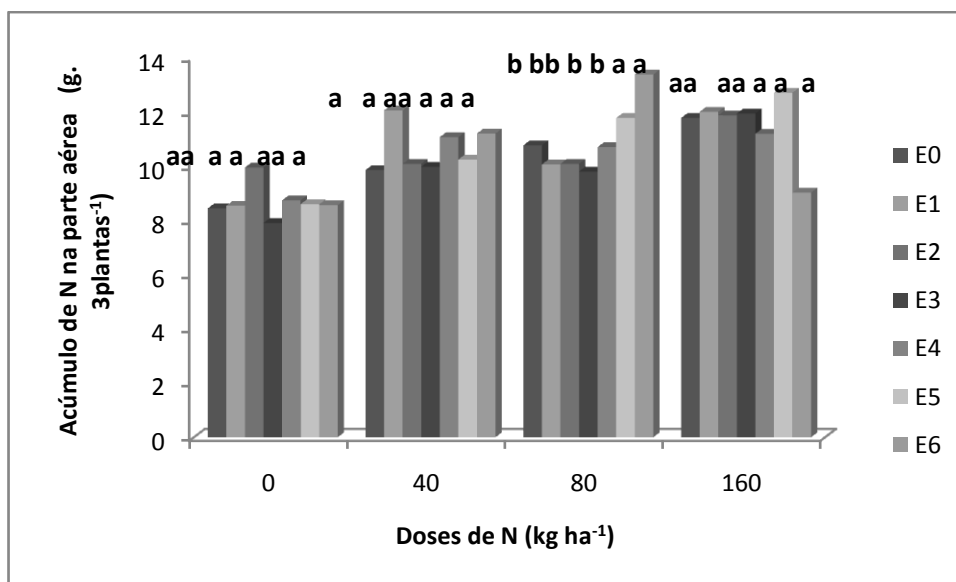
5.1.4 Acúmulo de Nitrogênio (N), Fósforo (P) e Potássio (K) na parte aérea:

O acúmulo de nitrogênio (N) e potássio (K) na parte aérea sofreu influência da interação se doses de N com inoculantes ($p < 0.05$) (**Figura 8a e 8b**), porém para o fósforo, o acúmulo deste nutriente na parte aérea não sofreu influência da inoculação, tampouco da dose de N aplicada (**Figura 8c**). Geralmente, quando se eleva a quantidade de N aplicada, aumenta-se a absorção de P pela planta, entretanto, neste trabalho isso não foi constatado. Morais (2012), Reis et. al (2008), Junior (2012) e diversos outros autores verificaram que quando se aumenta a dose do fertilizante nitrogenado, o teor de fósforo na parte aérea da planta se eleva também.

De acordo com Guerreiro (2008), bactérias diazotróficas tendem a estimular a produção de fitohormônios como auxinas, giberelinas e citocininas, sendo que esta última faz a mobilização de nitrogênio e potássio da raiz para as folhas, podendo então ser um dos motivos para a resposta significativa. Tanto para o N quanto para o K, a interação foi significativa na dose de 80 kg ha⁻¹, sendo que para ambos, as melhores estipes foram a E5 e E6. Há relatos de que bactérias do gênero *Azospirillum* não têm rendimento adequado em solos com altos níveis de fertilizantes (Dobbelaere et. al, 2003). O efeito negativo da inoculação em altas doses de N já foi demonstrado por alguns autores. Hungria (2011), trabalhando com milho inoculado, observou que o efeito da inoculação era anulado quando se usava 100% do fertilizante nitrogenado

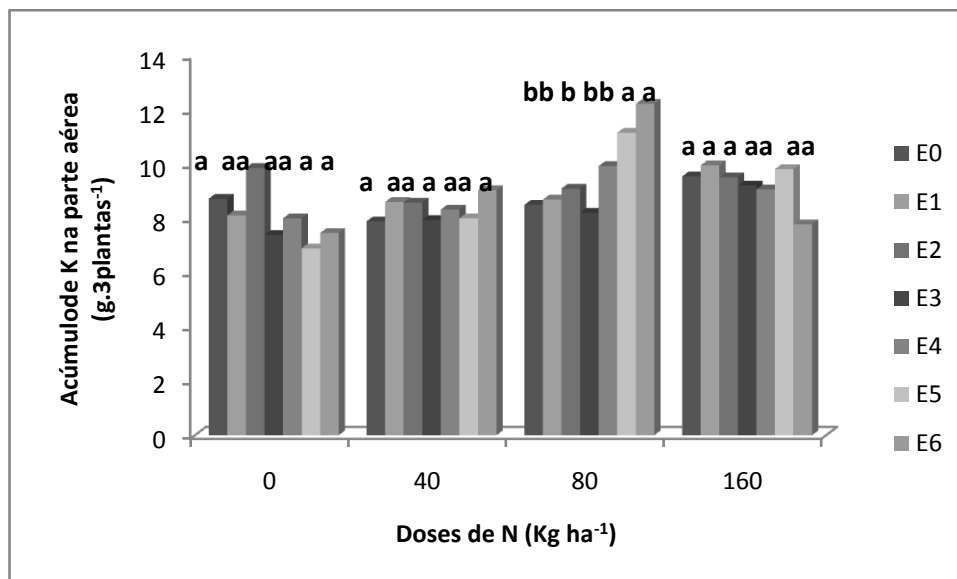
Júnior (2012) observou que quanto maior a disponibilidade de nitrogênio no solo, maior foi o teor deste elemento na planta, concordando também com nossos resultados (**Figura 8d**). O acúmulo de N na planta é influenciado de forma direta pela adubação nitrogenada (Killorn, 1992). Maiores absorções de nitrogênio e conseqüentemente maiores teores de N podem ser explicadas pelo fato de que este elemento participa ativamente do metabolismo da planta, biossíntese de proteínas e clorofila.

Similar aos nossos resultados, a inoculação com *Azospirillum* também promoveu um maior acúmulo de N na parte aérea de plantas de trigo, em trabalho realizado por Islam et. al (2002). O maior teor de N nas plantas inoculadas é resultado não somente da FBN, mas também de mecanismos de promoção do crescimento, que podem melhorar a capacidade das plantas em absorver este nutriente (Araujo et al 2013).



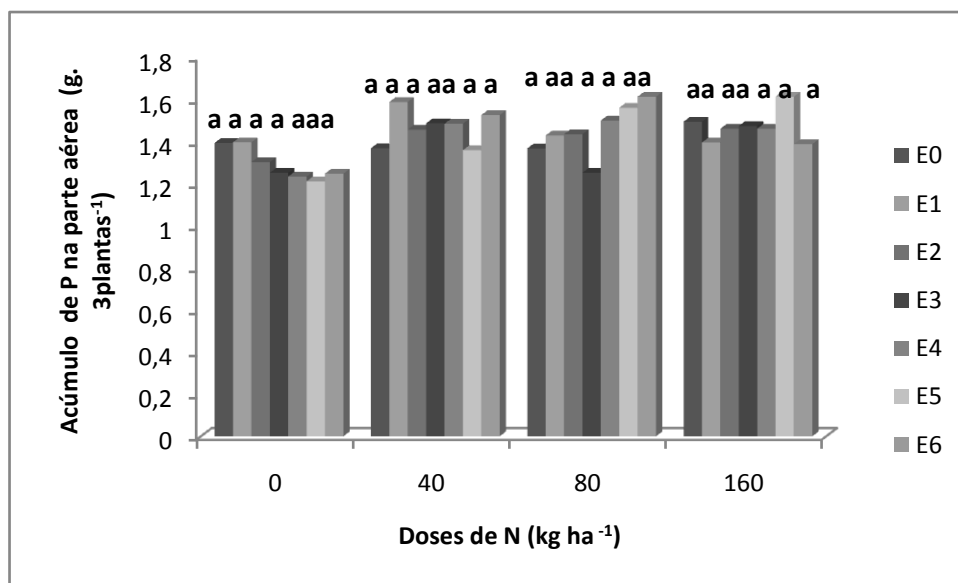
*médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5%

Figura 8a- Acúmulo de Nitrogênio (N) na parte aérea de plantas de milho cultivadas em solo de cerrado na presença de seis inoculantes e um controle (sem inoculação) sob quatro níveis de N em cobertura. Valores médios de quatro repetições



*médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5%

Figura 8b- Acúmulo de Potássio (K) na parte aérea de plantas de milho cultivadas em solo de cerrado na presença de seis inoculantes e um controle (sem inoculação) sob quatro níveis de N em cobertura. Valores médios de quatro repetições.



*médias seguidas por letras semelhantes não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5%

Figura 8c- Acúmulo de Fósforo (P) na parte aérea de plantas de milho cultivadas em solo de cerrado na presença de seis inoculantes e um controle (sem inoculação) sob quatro níveis de N em cobertura. Valores médios de quatro repetições.

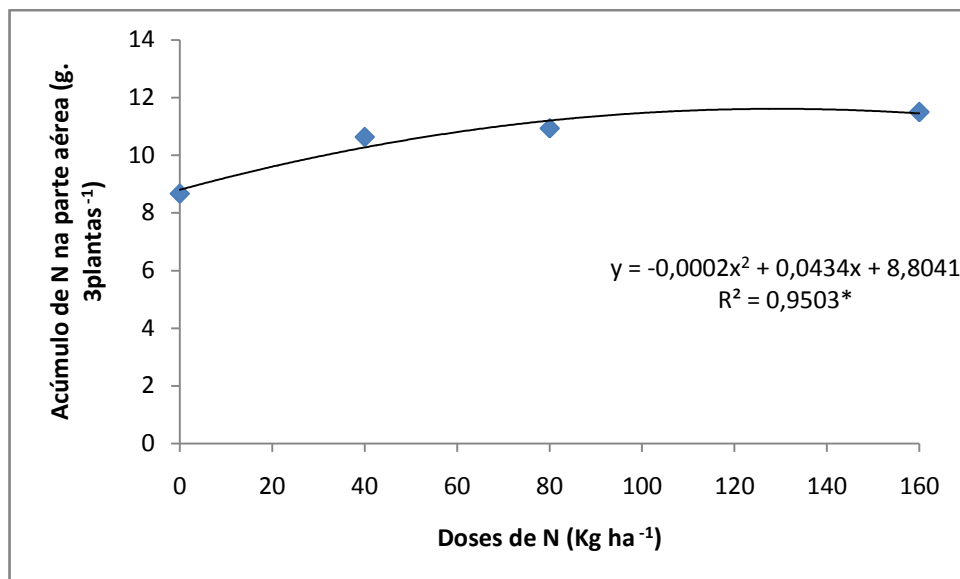


Figura 8d- Regressão polinomial quadrática de acúmulo de Nitrogênio (N) na parte aérea de plantas de milho cultivadas em solo de cerrado na presença de seis inoculantes e um controle (sem inoculação) sob quatro níveis de N em cobertura em função apenas da dose de N. Valores médios de quatro repetições.

5.2 Análise da Atividade Microbiana do solo:

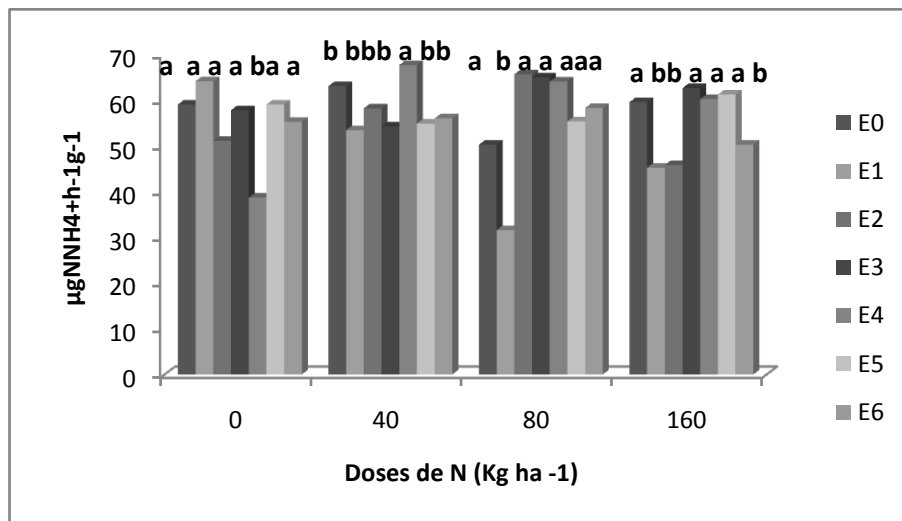
5.2.1 Atividade das Enzimas Arginase e Urease:

A atividade de enzimas constitui um bioindicador sensível para detecção de alterações em função de manejo e uso do solo. A atividade da arginase representa a comunidade microbiana metabolicamente ativa, que reflete a fração de nitrogênio potencialmente disponível às plantas; enquanto que a da urease torna-se cumulativa no solo.

Os resultados obtidos para a enzima arginase estão representados na **Figura 9a**. As médias de valores nos tratamentos variaram entre 31,61 $\mu\text{gNNH}_4^+\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$ para o tratamento contendo o inoculante E2 na dose onde recebeu 80 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ de N em cobertura e 67,76 $\mu\text{gNNH}_4^+\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$ para o tratamento contendo o inoculante E4 onde a dose de N em cobertura foi de 40 $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$. De acordo

com a análise de variância, houve diferença significativa ($p < 0,05$) para a interação inoculante e doses de N para as doses de 80 e 160 $\text{Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$.

Na dose não onde houve adubação nitrogenada de cobertura, a estirpe E4 comportou-se de forma diferente, apresentando menor atividade enzimática. Para a dose de 40 kg ha^{-1} , a estirpe E4 se distinguiu das demais, sendo estatisticamente diferente ($p < 0,05$) das demais nessa atividade enzimática. Na dose onde ocorreu a adubação de 80 $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ o inoculante E2 diferiu dos demais, tendo uma atividade enzimática mais reduzida que os demais tratamentos. Na dose onde a adubação foi de 160 $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$, os tratamentos E2, E3 e E6 apresentaram médias estatisticamente iguais, com valores mais baixos. E os tratamentos E0, E1, E5 e E4 apresentaram os valores mais elevados, porém nesse grupo de maiores médias está o controle E0, portanto, não pode-se concluir que a inoculação contribuiu para o aumento da atividade desta enzima.

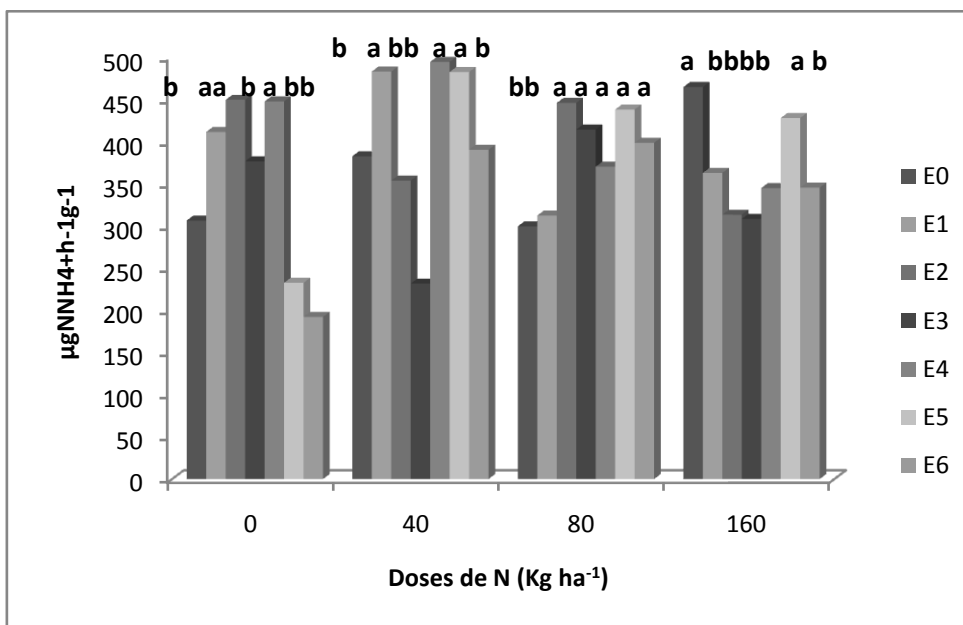


*médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5%

Figura 9a- Atividade da enzima arginase ($\mu\text{gN-NH}_4^+\text{h}^{-1}\text{g solo}^{-1}$) em amostras de solo rizosférico de plantas de milho cultivadas em solo de cerrado na presença de seis inoculantes e um controle (sem inoculação) sob quatro níveis de N em cobertura. Valores médios de quatro repetições.

Os dados observados para a atividade da urease estão apresentados na **figura 9b**. O comportamento desta enzima foi similar ao da arginase, porém com valores 10 vezes superiores. As médias dos valores de tratamento para essa enzima teve variações entre 192,06 $\mu\text{gN-NH}_4^+\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$ para E6 na dose onde não houve adubação de cobertura e 493,99 $\mu\text{gN-NH}_4^+\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$ para E4 na dose 40 kg ha^{-1} de N em cobertura. De acordo com análise estatística houve diferença significativa ($p < 0,05$) na interação de inoculantes com doses para esta enzima. Nos tratamentos

onde não houve aplicação de N em cobertura, as estirpes que estimularam maior atividade da urease foram a E1, E2 e E4, diferindo significativamente das demais. Já para a dose de 40 kg ha⁻¹, as estirpes E1, E4 e E5 obtiveram as melhores médias. Na dose de 80 kg ha⁻¹, somente a estirpe E1 se juntou ao controle E0, todas as outras formaram um grupo com maiores médias, propiciando maior atividade da urease. Na dose de 160 kg ha⁻¹, a estirpe que obteve a melhor média foi a E5, porém, foi estatisticamente igual ao controle E0, portanto não podendo concluir que a inoculação surtiu efeito positivo para a atividade enzimática da urease nesta dose.



*médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5%

Figura 9b-Atividade da enzima urease ($\mu\text{gN-NH}_4^+\text{h}^{-1}\text{g solo}^{-1}$) em amostras de solo rizosférico de plantas de milho cultivadas em solo de cerrado na presença de seis inoculantes e um controle (sem inoculação) sob quatro níveis de N em cobertura. Valores médios de quatro repetições.

Os resultados demonstram que a atividade de ambas as enzimas apresentaram uma certa sensibilidade para detectar diferenças entre os tratamentos. Esses resultados diferem com os encontrados por Reis et al. (2014), que ao avaliarem métodos de inoculação a base de *Azospirillum* em milho, somente a enzima arginase apresentou elevação de sua atividade.

De acordo com estudos realizados por Carneiro et al. (2009) em solo do Cerrado sob diferentes sistemas de uso e manejo, ao avaliar atributos químicos, físicos e biológicos de solos ele observou que a atividade da urease foi alterada pelo manejo e uso do solo. O que foi

observador por Valpassos et al. (2007) ao avaliarem propriedades microbiológicas do solo que a atividade era maior em áreas menos impactadas.

A atividade da arginase e urease está diretamente ligada a conversão de compostos nitrogenados em amônio (Skoulobris et al., 2001). A atividade enzimática da arginase sofre influência da microbiota metabolicamente ativa, fazendo com que ocorra a degradação da arginina no solo (Marriel et al. 2008). Já as ureases dos microrganismos têm papel fisiológico de grande importância uma vez que proporciona que estes utilizem uréia como fonte de N (Moble et al., 1995). A microbiota do solo pode influenciar de forma direta a atividade enzimática, uma vez que são suscetíveis a diferentes variações e perturbações do ambiente como temperatura e manejo (Lisboa, 2009).

6 Conclusões:

O uso da inoculação constitui uma importante ferramenta para incrementar ganhos em produtividade em grãos de milho, sendo economicamente viável.

Diferentes estirpes proporcionam resultados divergentes, o que configura ainda mais a especificidade entre genótipo e inoculante.

O uso de bactérias do gênero *Azospirillum* é capaz de promover maior atividade enzimática no solo, conseqüentemente, maior ciclagem de nutrientes.

O uso da inoculação com *Azospirillum* sp apesar de ainda não substituir o uso de fertilizantes nitrogenados, deve ser considerado como uma alternativa promissora de sustentabilidade econômica e ambiental.

7. Referências Bibliográficas:

ALEF, K. and KEINER, D. Arginine ammonification, as simple method to estimate microbial activity potential in soils. **Soil Biol, Biochem.**, v.18no2:233-235, 1986.

ALEF, K.; NANNIPIERI, P. Enzyme activities. In ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.) *Methods in applied microbiology and biochemistry*. London: Academic Press, p.311-374, 1995.

ARAÚJO, E. de O.; MERCANTE, F. M.; VITORINO, A. C. T.; NUNES, D. P.; PAIM, L. R.; MENDES, D. A. E. Absorção de nitrogênio por genótipos de milho inoculados com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. In: **SEMINÁRIO NACIONAL [DE] MILHO SAFRINHA**, 12., 2013, Dourados. Estabilidade e produtividade: anais. Brasília, DF: Embrapa; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2013. Editado por: Germani Concenço, Gessi Ceccon. 1 CD-ROM.

ARUNACHALAN, A. & MELKANIA, N. P. Influence of soil properties on microbial populations, activity and biomass in humid subtropical mountains ecosystems of India. **Biol Fertil Soils**. v. 30, p. 217-223, 2009.

AWIKA, J. M. Major Cereal Grains Production and use Around the World. In: AWIKA, J. M.; PIRONEN, V.; BEAN, S. (eds). **Advances in Cereal Science: Implications to Food Processing and Health Promotion**. Washington: ACS Symposium Series, American Chemical Society, 2011, v. 1089, p. 1-13.

BASHAN, Y.; BUSTILLOS, J. J.; LEYVA, L. A.; HERNANDEZ, J.-P.; BACILIO, M. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. **Biology and Fertility of Soils**, v.42, p.279-285, 2006.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.103-121, 1997.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relations: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p.521-577, 2004.

BASI, S. Associação de Azospirillum brasilense e de nitrogênio em cobertura na cultura do milho. 2013. 50 f. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO, Guarapuava.

BORLAUG, N.E.2002. Feeding a World of 10 billion people: the miracle ahead. In: R. Bailey (ed). **Global warming and other eco-myths**.Pp. 29-60. Competitive Enterprise Institute, Roseville, USA.

BONELLI, R. 2001. Impactos Econômicos e Sociais de Longo Prazo da Expansão Agropecuária no Brasil: Revolução Invisível e Inclusão Social. Instituto de Pesquisa Agronômica Aplicada (IPEA). **Textos para discussão**. P.838. Rio de Janeiro.

CARNEIRO, M. A. C.; SOUZA, E. D. DE; REIS, E. F. DOS; PEREIRA, H. S.; AZEVEDO, W. R. DE. Atributos físicos, químicos e biológicos de solo de cerrado sob 66 diferentes sistemas de uso e manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 147-157, 2009.

CAVALLET, L. E.; PESSOA, A. C. S.; HELMICH J. J.; HELMICH P. R.; OST C. F.; Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com *Azospirillum spp*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental** vol.4 no.1 Campina Grande Jan./Apr. 2000.

CEPEA - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Exportação do agronegócio é recorde em 2013 e eleva superávit do Brasil. Disponível em <http://agricultura.ruralbr.com.br/noticia/2014/02/exportacao-do-agronegocio-e-recorde-em-2013-e-eleva-superavit-do-brasil-4412770.html> . Acesso em 12/01/2014.

CHOTTE, J. et al.; Changes in bacterial communities and Azospirillum diversity in soil fractions of a tropical soil under 3 or 19 years of natural fallow.**Soil Biology and Biochemistry**. Elmsford, v. 34, p.1083-1092, 2002.

COELHO,A.M. **Nutrição e Adubação do Milho**. Sete Lagoas. Embrapa-CNPMS, 2006. 10p. (Embrapa-CNPMS, Boletim técnico,78).

COELHO, A. M. O potássio na cultura do milho. In: YAMADA, T.; ROBERTS, T. L. (Ed.). **Simpósio sobre potássio na agricultura brasileira**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potássio e do Fósforo, 2005. p. 610-658.

CORREA, O.S.; ROMERO, A.M.; SORIA, M.A.; DE ESTRADA, M. *Azospirillum brasilense*-plant genotype interactions modify tomato response to bacterial diseases, and root and foliar microbial communities. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.87-95.

CRUZ, J. C.; FILHO, I. A. P.; GARCIA, J.C.; GOMES, P. H. A.; FERNANDES, J. S. C.; ALBERNAZ, W. M. Avaliação de Sistemas de produção de Milho na região de Sete Lagoas, MG. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Circular Técnica, 123**. Sete Lagoas, 2009.

DEL GALLO, M.; FENDIRIK, I. The Rhizosphere and *Azospirillum*. In: OKON Y. (eds) *Azospirillum* Plants Associations. Boca Raton: CRC Press, 1994 p.57-75.

DICK, R. P. Soil enzyme activities as indicators of soil quality. In: DORAN, J. V.; COLEMAN, D. C.; BEZDICEK, D. F.; STEWART, B. A. (Ed.). Defining soil quality of a sustainable environment (Ed.). Madison: **Soil Science Society of America**, 1994. v. 35, p. 107-1247.

DIDONET, A.D.; RODRIGUES, O; KENNER, M.H. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.16, n.9, p.645-651, 1996.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.; BALDANI, J.I.; Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasília: Embrapa-SPI: Itaguaí: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60p. il. 1995, 60p.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and A.

irakense strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 36, n. 4, p. 284-297, 2002.

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

DOBEREINER, J. Fixação de Nitrogênio em Associação com Gramíneas. In: CARDOSO, E. J. B. N. (eds) **Microbiologia do Solo**. Campinas. Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 1992, p.173-180.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como Isolar e Identificar Bactérias Diazotróficas de Plantas Não-Leguminosas**. Brasília. EMBRAPA-SPI/ Itaguaí: EMPRAPA-CNPAB, 1995. 60p.

DOBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative Symbiosis in Tropical Grasses: Characterization of Microorganisms and Dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W. E.; NYMAN, C. T. (eds) **Nitrogen Fixation**. Pullman: Washington State University, 1976 v.2 p. 518-538.

DUETE, R.R.C.; MURAOKA, T.; SILVA, E.C.; AMBROSANO, E.J.; TRIVELIN, P.C.O.; Acúmulo de ¹⁵N pelos grãos de milho em função da fonte nitrogenada em latossolo vermelho. **Bragantia**, Campinas, v.68, n.2, p.463-472, 2009.

EMBRAPA MILHO E SORGO. Nutrição e Adubação do Milho. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_2ed/feraduba.htm> .Acesso em 02 de maio de 2014.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa Agropecuária do Cerrado (CPAC). Disponível em <<http://www.cpac.embrapa.br/>>. Acesso em 15 de abril de 2014.

FERNANDES, F. C. S.; LIBARDI, P. L.; TRIVELIN, P. C. O. Parcelamento da adubação nitrogenada na cultura do milho e utilização do N residual pela sucessão aveia preta - milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 4, p. 1138-1141, 2008.

FERREIRA, D.F. SISVAR - Sistema de análise de variância. Versão 5.3. DEX.Lavras-MG: UFLA, 2011.

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

GADAGI, R. S., et al.; The effect of combined *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilizer on plant growth promotion and yield response of the blanket flower *Gaillardia pulchella*. **Scientia Horticulturae**. Amsterdam, v.100, p.323-332, 2004.

GARCIA, J. C.; MATTOSO, M. J.; DUARTE, J. O. Importância do Milho em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v.27, n-233,p. 7-12, 2006.

GARLAND,J.L.;MILLS,A.L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community – level sole – carbon –sour ceutilization. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.2351-2359, 1991.

GOMES, R. F.; SILVA, A. G. da; ASSIS, R. L. de; PIRES, F. R. Efeito de doses e da época de aplicação de nitrogênio nos caracteres agrônômicos da cultura do milho sob plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 31, n. 5, p. 931-938, 2007.

GUERREIRO, R. T. Selecao de *Bacillus*spp Promotores de Crescimento de Milho. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de agronomia do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2008.

GUIMARÃES, Salomão Lima et al. Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada em cultivares de arroz. **Revista Caatinga**, v. 23, n. 4, p. 32-39, 2010.

GUIMARÃES, F. A. R.; PAIXÃO, G. P.; GUIMARÃES, F. C. N.; SILVEIRA, H. M.; FERREIRA, F. A. Biomassa e Atividade Microbiana Associada a Plantas Daninhas e de Milho

Cultivadas em Diferentes Manejos de Fertilidade do Solo. In: XXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DA CIENCIA DAS PLANTAS DANINHAS NA ERA DA BIOTECNOLOGIA, 1. , 2012. Campo Grande/MS. **Resumos...** XXVIII CBCPD, 2012. p. 191.

HOGAN, D. J.; CUNHA, J. M. C.; CARMO, R. L. Uso do Solo e Mudança de Sua Cobertura no Centro-Oeste do Brasil: Consequências Demográficas, Sociais e Ambientais. In: HOGAN, D. J. et al. (Orgs.) **Migração e Ambiente no Centro-Oeste**, Campinas: PRONEX/UNICAMP, 2002. P. 149-174.

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

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283). (ISSN 1516-781X; N 283), 2010.

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

KANDELER,E.;GERBER,H. Short-termas say of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. **Biol. Fertil. Soils**, v6, p68-72, 1988.

LEITE,L.F.C,ARAÚJO,A.S.F.; **Ecologia Microbiana do Solo**. Teresina. Embrapa Meio norte CPAMN, 2007. 24p. Embrapa Meio-Norte-CPAMN, Boletimtécnico,164.

MAPA- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Brasil Projeções do Agronegócio 2010/2011 a 2020/2021. Disponível em<http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/PROJECOES%20DO%20AGRONEGOCIO%202010-11%20a%202020-21%20-%202020-0.pdf>.Acesso em: 03 de maio de 2014.

MALAVOLTA, E.; MORAES, M.F. Fundamentos do nitrogênio e do enxofre na nutrição mineral das plantas cultivadas. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S.; VITTI, G. C. (Ed.). **Nitrogênio e Enxofre na Agricultura Brasileira**. Piracicaba: Internacional Plant Nutrition Institute, 2007. 722 p.

MALAVOLTA, E.; MORAES, M. F.; LAVRES JÚNIOR, J.; MALAVOLTA, M. Micronutrientes e metais pesados - essencialidade e toxidez. Cap.4, p.117-154. In: PATERNIANI, E. (Ed.). **Ciência, agricultura e sociedade**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 403 p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2 ed. Piracicaba: Potafós, 1997. 319p.

MARRIEL, I. E.; ADELÁRIO, F. M. S.; BORGES, A. L.; OLIVEIRA, A. A. N.; SILVA, U. C.; GUIMARAES, L. J. M. Variação da atividade de arginase e urease na rizosfera de genótipos de milho contrastantes no uso de nitrogênio. In: **Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, 2008, Londrina, 2008.

MARRIEL, I.E.; OLIVEIRA, C.A.; UTIDA, M.K.; MONTEIRO, G.G.; ALVARENGA, R.C.; CRUZ, J.C.; **Bioindicadores de Qualidade do Solo de Cerrado sob Sistemas de Manejo para a Produção Orgânica**. Sete lagoas. Embrapa-CNPMS, 2005. 6p. (Embrapa-CNPMS, Boletim técnico, 73.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Ghiconacetobacter azoto captans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microbial Ecology**. New York. v. 51, n. 3, p. 326-335, 2006.

MELO, F.B.; RIBEIRO, V.Q.; ANDRADE JUNIOR, A.S. Doses e formas de parcelamento de nitrogênio para a produção de milho sob plantio direto. **Revista Ciência Agronômica**, v.39, n.2, p.275-280, 2008.

MEIRA, F. A.; BUZETTI, S.; ANDREOTTI, M.; ARF, O.; SÁ, M. C.; ANDRADE, J. A. C. Fontes e épocas de aplicação do nitrogênio na cultura do milho irrigado. **Seminário: Ciências agrárias**, v.30, p. 275 - 284, 2009.

MENDES, I.C.; HUNGRIA, M.; REIS JUNIOR, F.B.; FERNANDES, M.F.; CHAER, G.M.; MERCANTE, F.M.; ZILLI, J.E. **Bioindicadores para avaliação da qualidade dos solos tropicais: utopia ou realidade?** Distrito Federal. Embrapa Cerrados, 2005. 31p. (Embrapa Cerrados, Boletim técnico, 112).

MIJANGOS, I; PEREZ, R.; ALZIBU, I.; GARDISU, C. Effects of fertilization and tillage on soil biological parameters. **Enzyme and microbial technology**, v. 40, p. 100-106. 2006.

MOBLEY HL, ISLAND MD, HAUSINGER RP. 1995. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiol. Rev.** 59, 451-480.

MOLL, R. H.; KAMPRATH, E. L.; JACKSON, A. (1982) Analysis and Interpretation of factors with contribute to efficiency of nitrogen utilization. **Agronomy Journal**, Madson v.74. 562-564.

MORAIS. T. P.; Adubação Nitrogenada e Inoculação com *Azospirillum brasilense* em Híbridos de Milho. **Teses e Dissertações**. Universidade Federal de Uberlandia, 2012.

NANNIPIERI, P.; GIAGNONI, L.; LANDI, L.; RENELLA, G. Role of Phosphatase Enzymes in Soil. In: Phosphorus in action. **Soil Biology**, V. 100, part 2, 2011. p. 215-243.

NANNIPIERI, P.; PEDRAZZINI, F.; ARCARA, P.G.; PIOVANELLI, C. Changes in amino acids, enzyme activities, and biomass during soil microbial growth. **Soil Science**, v. 127, 1979. p.26-34.

NOVAIS, R.F. & MELLO, J.W.V. Relação solo-planta. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B. & NEVES, J.C.L. **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p.276-374.

NOVAIS, R. F. et al. Interação do nitrogênio com outros nutrientes. **Fertilidade do Solo**, Viçosa, p. 439–833, 2007.

NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa, UFV-DPS, 1999. 399p.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation **Soil Biology & Biochemistry**, v.26, p.1591-1601, 1994.

OLIVEIRA, C.A.;MARRIEL ,I.E.; GOMES,E.A.; LANA, U.G.L.; SCOTTI, M.R.; ALVES,V.M,C. Diversidade bacteriana da rizosfera de genótipos de milho contrastantes na eficiência de uso de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.44. n.1, p1473-1482,2009.

OLIVEIRA, C. A.; GOMES, E. A.; MATTOS, B. B.; TEXEIRA, J. M. A.; CRISTELLI, E. A.; DIAS F. E. S.; BARACHO, A. O.; MARRIEL, I. E.;Utilização de bioinoculantes para o cultivo do milheto (*Pennisetumglaucum*) com fontes naturais de fosfatos . Em: **FertBio**. Maceió, 2012.

PATIL, V. P. **Mineral Phosphate Solubilization and Molecular Diversity of *Azospirillum***.2005. 66f. Dissertação (Mestrado em Agricultura) – University of Agricultural Sciences, Dharwad, 2005.

PAVINATO, P. S.;CORETTA, C. A.; GIROTTO, E.; MOREIRA, I. C. L. Nitrogênio E Potássio Em Milho Irrigado: Análise Técnica E Econômica Da Fertilização.**Ciência Rural**, v.38, n.2, p.358-364, mar-abr, 2008.

PIONNER, Efeitos do Nitrogênio: doses. **Revista Área Polo**, São Paulo, v.5, n. 11, p. 12-6, 1995.

PORTUGAL, J. R.; ARF, O.; PERES, A. R.; FRANCO, A. A.; TARSITANO, M. A. A. Análise econômica da inoculação via foliar com *Azospirillum brasilense* associada a doses de nitrogênio em cobertura na cultura do milho safrinha. In: **Seminário nacional de milho safrinha**, 2013, Estabilidade e produtividade: anais. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 1 CD-ROM.

QUADROS, P. D. Inoculação de *Azospirillum spp.* em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul. 2009. **Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo)** - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

RANGEL.C.F.;ROSA,A.C.S.;SARCINELLI,P.N. Uso de agrotóxicos e suas implicações na exposição ocupacional e contaminação ambiental. **Caderno de Saúde Pública Coletiva**. Rio de Janeiro, v19, n4 p435-4243, 2011.

REIS, D. P.; FONSECA, F. L. M. F.; SANTOS, K. K. S.; OLIVEIRA, C. A.; GUIMARÃES, L. J. M.; MARRIEL. I. E. Ecologia Microbiana da Rizosfera de Plantas de Milho Inoculadas com *Azospirillum sp*: I. Atividade da Arginase e Urease. In: Congresso Nacional De Milho E Sorgo, 30. Simpósio Sobre Lepidóteros Comuns A Milho, Soja E Algodão, 1, 2014, Salvador. **Eficiência nas cadeias produtivas e abastecimento global- Trabalhos e palestras**. [Salvador]: EBDA; [Sete Lagoas]: Embrapa Milho e Sorgo, 2014, 1 CD-ROM.

REIS,V.M.**Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas**. Seropédica. Embrapa-CNPAB,2007. 28p. (Embrapa-CNPABBoletim, 232).

REIS JÚNIOR, F. B.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; MACHADO, A. T. Seleção de genótipos de milho e arroz mais eficientes quanto ao ganho de N através de fixação biológica de N₂. Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia, nov. 1998. 23 p. (**Documento, n. 73**).

REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Review in Plant Sciences**, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 227-247, 2000.

REPKE R.,A.; CRUZ S. J. S.; SILVA C. J.; FIGUEIREDO P. G.; BICUDO S.J. 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.

SAWYER, D. População, Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável no Cerrado. In: HOGAN, D. J. et al. (Orgs.) **Migração e Ambiente no Centro-Oeste**, Campinas: PRONEX/UNICAMP, 2002. P. 149-174.

SILVA, N.M.G.; CESARIO, A.V.; CAVALVANTI, I.R.;
Relevância Do Agronegócio Para Economia Brasileira Atual.
Encontro De Iniciação À Docência, UFPB-PRG, **Anais**, 2007.

SKOULOBRIS , S.; LABIGNE, A.; DE REUSE, H. The AmiE aliphatic amidase and AmiF formamidase of *Helicobacter pylori*: natural evolution of two enzyme paralogues. **Mol.Microbiol.**, v. 40, p. 596–609, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Redwood City. Cummings, 2006. 4. Ed. 608p.

TEIXEIRA, F. F. ET AL. Diversidade no Germoplasma de Milho Coletado na Região Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.1, n.3, p.59-67, 2002.

VALPASSOS, M. A. R.; MALTONI, K.L.; CASSIOLATO, A.M.R.; NAHAS, E. Recovery of soil microbiological properties in a degraded area planted with *Crymbiacitriodora* and *Leucaena*. **Scientia Agricola**, v.61, n.1, 2007.

ZAK, J.C.etal. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biol. Biochem.**v26, p1101-1108,1994.