



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

SUELEN REGINA DE ARAUJO

**PROSPECÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE  
*Bacillus spp.* NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO  
NA CULTURA DO MILHO**

---

Londrina  
2022

SUELEN REGINA DE ARAUJO

**PROSPECÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Bacillus*  
*spp.* NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO NA  
CULTURA DO MILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Araujo, Suelen Regina.

PROSPECÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Bacillus* spp. NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO NA CULTURA DO MILHO / Suelen Regina Araujo. - Londrina, 2022.  
68 f.

Orientador: Leandro Simões Azeredo Gonçalves.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2022.  
Inclui bibliografia.

1. Bactérias promotoras de crescimento de plantas - Tese. 2. biofertilizantes - Tese. 3. microbiologia do solo - Tese. 4. eficiência do uso de nitrogênio - Tese. I. Simões Azeredo Gonçalves, Leandro. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU 63

SUELEN REGINA DE ARAUJO

**PROSPECÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Bacillus*  
*spp.* NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO NA  
CULTURA DO MILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Leandro Simões Azeredo  
Gonçalves  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dra. \_\_\_\_\_  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de maio de 2022.

## **AGRADECIMENTOS**

Acima de tudo à Deus, pela vida e graças até aqui concedidas.

À Universidade Estadual de Londrina (UEL), ao programa de Pós-graduação em Agronomia e ao Laboratório de Ecofisiologia e Biotecnologia Agrícola (LEBA), pela oportunidade concedida para a realização do trabalho.

Ao Professor Dr. Leandro Simões de Azeredo Gonçalves, pela orientação, pelo exemplo de dedicação, pelos valiosos ensinamentos, incentivos e pela disponibilidade e compreensão ao longo deste trabalho.

Aos amigos do LEBA, Karoline Pontes, Alison Nogueira, Antoni, Renato, Nicholas, Silas, Mayara e Douglas que contribuíram para a realização deste trabalho e, em especial, minha amiga Luana Rainieri Massucato que esteve presente e contribuiu em todas as etapas do trabalho e compartilhou comigo seu conhecimento e amizade.

Aos professores e mestres que, ao longo da minha vida acadêmica, me incentivaram e compartilharam seus conhecimentos, vocês foram fundamentais nessa trajetória.

Aos membros da banca de qualificação: Prof. Dr. Claudemir Zucarelli e Prof. Dr. Leonel Constantino, pela disponibilidade e valiosas contribuições.

Aos membros da banca examinadora por contribuírem na avaliação e correção deste trabalho.

À minha família, mãe, irmãos, avós e tios por todo o apoio, amor, incentivo e compreensão nos momentos de dificuldade. Sem vocês, esta conquista não teria sido alcançada.

Ao meu marido, Romário pela dedicação, compreensão e incentivo.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

ARAUJO, Suelen Regina. **Prospecção e avaliação do potencial de *Bacillus spp.* na fixação biológica de nitrogênio na cultura do milho**. 2022. 70 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

## RESUMO

Bactérias promotoras de crescimento de plantas vêm sendo amplamente estudadas como alternativa para redução do uso de insumos, como fertilizantes e defensivos agrícolas. Estes microrganismos podem incrementar o crescimento e a produtividade da cultura por favorecerem a absorção de nutrientes do solo, sintetizarem hormônios e enzimas, e controlarem microrganismos fitopatogênicos. O grupo de bactérias do gênero *Bacillus* são caracterizadas por propiciar o crescimento de plantas por meio de um ou mais desses mecanismos. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi realizar a prospecção de bactérias do gênero *Bacillus* presentes na rizosfera do milho, caracterizar e selecionar os isolados quanto ao seu potencial como promotor de crescimento vegetal e avaliar sua capacidade na fixação biológica de nitrogênio em condições de campo. A prospecção foi realizada considerando cinco solos de diferentes localidades e o isolamento se procedeu utilizando três meios de culturas, obtendo uma coleção de 397 isolados bacterianos. Os isolados foram classificados de acordo com seu morfotipo em meio de cultura e capacidade de fixação biológica de nitrogênio *in vitro* e 12 foram selecionados e avaliados quanto à sua capacidade de promoção de crescimento em condições de cultivo protegido. Destes, quatro isolados (LEBA-UEL 189, 168, 185 e 162) foram avaliados à campo em 10 tratamentos (isolados e em co-inoculação) + quatro controles (30% da dose de nitrogênio, 30% + inoculação de *Azospirillum*, 50% e 100% da dose de nitrogênio). O experimento foi conduzido em quatro ambientes com delineamento em blocos casualizados e os tratamentos avaliados quanto à altura de plantas e inserção de espiga, produtividade, eficiência de utilização, de absorção e de uso do nitrogênio. Entre os quatro ambientes avaliados, em apenas um foi observado efeito da inoculação para o incremento na produtividade e eficiência no uso de nitrogênio. Os isolados bacterianos estudados neste trabalho apresentam capacidade de fixação biológica de nitrogênio *in vitro* e potencial como promotor de crescimento em condições de ambiente protegido, no entanto, quando levados à campo, não foram observados resultados consistentes, apresentando elevada interação com o ambiente.

**Palavras-chave:** Bactérias promotoras de crescimento de plantas; biofertilizantes; microbiologia do solo; eficiência do uso de nitrogênio.

ARAUJO, Suelen Regina. **Prospection and evaluation of *Bacillus spp.* potential in biological nitrogen fixation in maize crops**. 2022. 70 p. Dissertation (Master's Degree in Agronomy) – State University of Londrina, Londrina, 2022.

## **ABSTRACT**

Plant growth-promoting bacteria have been widely studied as an alternative to reduce inputs use in agriculture, such as fertilizers and pesticides. These microorganisms can increase crop's growth and productivity by favoring nutrients absorption from the soil, synthesizing hormones and enzymes, and in biocontrol of phytopathogenic microorganisms. The *Bacillus* group of bacteria are characterized by promoting plant growth through one or more of these mechanisms. Thus, the objective of this research was to prospect bacteria of the genus *Bacillus* present in corn rhizosphere, characterize and select isolates regarding their potential as a plant growth promoter and to evaluate their capacity in biological nitrogen fixation under field conditions. The prospection was conducted considering five soils from different locations and the isolation was performed using three culture media, obtaining a collection of 397 bacterial isolates. The isolates were classified according to their morphotype in culture medium and in vitro biological nitrogen fixation capacity and 12 were selected and evaluated for their ability to promote plant growth in greenhouse. After that, four isolates (LEBA-UEL 189, 168, 185 and 162) were evaluated in the field in 10 treatments (isolated and in co-inoculation) + 4 controls (30% of nitrogen dose, 30% + *Azospirillum*, 50% and 100% of nitrogen dose). The experiment was carried out in four environments with a randomized block design and the treatments were evaluated for plant height and ear insertion, productivity, efficiency of utilization, uptake and use of nitrogen. Among the four environments evaluated, in only one effect of inoculation was observed to increase productivity and nitrogen use efficiency. The bacterial isolates studied in this work presented the ability for biological nitrogen fixation in vitro and potential as a growth promoter in greenhouse conditions, however, in field management, non-consistent results were observed, proving interaction between inoculum and environment.

**Key-words:** Plant growth promotion bacteria; biofertilizer; soil microbiology; nitrogen use efficiency.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfotipo de crescimento de colônias de *Bacillus* e *Paenibacillus* selecionados no desenvolvimento deste trabalho.

Figura 2. Filograma gerado a partir da sequência do gene ribossomal 16S da cepa LEBA 189 das espécies representativas do grupo. As porcentagens nos ramos mostram a confiabilidade (bootstrap) da análise. A barra de escala (0,07) mostra o número de substituições por sítio. A árvore foi enraizada com o outgroup *B. subtilis*.

Figura 3. Filograma gerado a partir da sequência do gene ribossomal 16S da cepa LEBA 168 das espécies representativas do grupo. As porcentagens nos ramos mostram a confiabilidade (bootstrap) da análise. A barra de escala (0,07) mostra o número de substituições por sítio. A árvore foi enraizada com o outgroup *B. subtilis*.

Figura 4. Filograma gerado a partir da sequência do gene ribossomal 16S da cepa LEBA 185 das espécies representativas do grupo. As porcentagens nos ramos mostram a confiabilidade (bootstrap) da análise. A barra de escala (0,07) mostra o número de substituições por sítio. A árvore foi enraizada com o outgroup *B. subtilis*.

Figura 5. Filograma gerado a partir da sequência do gene ribossomal 16S da cepa LEBA 162 das espécies representativas do grupo. As porcentagens nos ramos mostram a confiabilidade (bootstrap) da análise. A barra de escala (0,07) mostra o número de substituições por sítio. A árvore foi enraizada com o outgroup *B. subtilis*.

Figura 6. Médias de produtividade obtida no ambiente Maringá submetidos à inoculação de isolados de *Bacillus pseudomycooides* e *B. amyloliquefaciens* em condições de baixa dose de nitrogênio e os controle com as doses 30%N, 30%N + inoculação com Rizospirillum®, 50%N e 100%N.

Figura 7. Análise de correlação dos parâmetros avaliados: Altura de planta, altura de espiga, produtividade, eficiência de aquisição de nitrogênio, eficiência de utilização e eficiência de uso de nitrogênio em quatro ambientes de experimentação avaliados em 10 tratamentos em condições de baixa dose de nitrogênio e os controle com as doses 30%N, 30%N + inoculação com *Azospirillum brasilense*, 50%N e 100%N.

Figura 8. Análise de componentes principais (PCA) das características de produtividade (A4), eficiência de aquisição (EAN) (A1, A2, A3) e eficiência no uso do nitrogênio (EUN) (A1, A2, A3, A4) nos respectivos ambientes, avaliados em 10 tratamentos em condições de baixa dose de nitrogênio e os controle com as doses 30%N, 30%N + inoculação com *Azospirillum brasilense*, 50%N e 100%N.

Figura 9. Agrupamento hierárquico das características de produtividade (Maringá), eficiência de aquisição (EAN) (Entre Rios, Guarapuava e Londrina) e eficiência no uso do nitrogênio (EUN) (Entre Rios, Guarapuava, Londrina e Maringá) nos respectivos ambientes, avaliados em 10 tratamentos em condições de baixa dose de nitrogênio e os controles com as doses 30%N, 30%N + inoculação com *Azospirillum brasilense*, 50%N e 100%N.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características químicas e classificação textural de solos utilizados na prospecção de bactérias da rizosfera do milho

Tabela 2. Isolados bacterianos selecionados e avaliados quanto à Fixação Biológica de Nitrogênio em Ambiente protegido.

Tabela 3. Tratamentos selecionados para avaliação do potencial como promotor de crescimento em milho cultivado em campo.

Tabela 4. Características químicas dos solos nos quatro ambientes nos quais foram avaliados o potencial de promoção de crescimento dos isolados bacterianos.

Tabela 5. Número de isolados microbianos obtidos de acordo com cada região amostrada e meio de cultura utilizado.

Tabela 6. Classificação de isolados bacterianos de acordo com a avaliação de capacidade de fixação biológica de nitrogênio em meio NFb.

Tabela 7. Teor de massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR) após 28 dias de inoculação com isolados de *Bacillus sp.* em casa de vegetação.

Tabela 8. Análise de variância (ANOVA) da características produtividade, altura de planta e espiga e eficiências de absorção, utilização e uso do nitrogênio de tratamentos submetidos à inoculação com *B. pseudomycoides* e *B. amyloliquefaciens* avaliados em quatro ambientes.

Tabela 9. Eficiência de aquisição (EAN) e uso (EUN) do nitrogênio nos quatro ambientes de experimentação avaliados em 10 tratamentos em condições de baixa dose de nitrogênio e os controle com as doses 30%N, 30%N + inoculação com *Azospirillum brasilense*, 50%N e 100%N.

## SIGLAS E ABREVIATURAS

A1 – ambiente 1 (Entre Rios)

A2 – ambiente 2 (Guarapuava)

A3 – ambiente 3 (Londrina)

A4 – ambiente 4 (Maringá)

ALTP – Altura de Planta

ALTE – Altura de Espiga

AN – Meio de cultura Ágar Nutriente

BPCV – Bactérias promotoras de crescimento vegetal

EAN – Eficiência de aquisição de nitrogênio

EUtN – eficiência de utilização de nitrogênio

EUN – eficiência de uso de nitrogênio

FBN – Fixação biológica de nitrogênio

GO – Goiás

ISR – indução sistêmica da resistência

LB – Meio de cultura Luriam Bertani

MOS – Matéria orgânica do solo

MS1 – Mato Grosso do Sul (amostra1)

MS2 – Mato Grosso do Sul (amostra 2)

MT – Mato Grosso

NFb – Meio de cultura seletivo para bactérias fixadoras de nitrogênio

NBRIP - Meio de cultura de fosfato do Instituto Nacional de Pesquisa Botânica (*National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium*)

PR - Paraná

MSR – Massa seca de raiz

MSPA – Massa seca de parte aérea

PROD – Produtividade

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>14</b>
2.1 ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DO MILHO.....	14
2.1.1 Fatores que afetam o Crescimento e o Desenvolvimento do Milho.....	15
2.1.2 Disponibilidade de Nutrientes.....	17
2.2 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL.....	19
2.2.1 Fixação Biológica de Nitrogênio.....	21
2.3 O GÊNERO <i>AZOSPIRILLUM</i> .....	23
2.4 O GÊNERO <i>BACILLUS</i> .....	25
2.4.1 <i>Bacillus pseudomycooides</i> .....	27
2.4.2 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	28
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
3.1 PROSPECÇÃO E ISOLAMENTO.....	30
3.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	32
3.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL EM AMBIENTE PROTEGIDO.....	33
3.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	34
3.4.1 Identificação da espécie e Construção das Árvores Filogenéticas.....	35
3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL EM CAMPO.....	36
3.6 ANÁLISE DE DADOS.....	38
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
4.1 PROSPECÇÃO E ISOLAMENTO.....	39
4.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	39
4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO.....	40
4.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	41
4.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL EM CAMPO.....	44
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A produtividade de milho (*Zea mays* L.) no Brasil aumentou significativamente nas últimas décadas, com um crescimento médio anual de 145,1 Kg ha<sup>-1</sup> nos últimos 20 anos (CONAB, 2021). Entre os diferentes fatores que contribuíram para esse incremento na produtividade está a aplicação de tecnologias, reforçando práticas de manejo como o controle de pragas, doenças e plantas daninhas, emprego de híbridos com maior potencial genético e aumento no uso de fertilizantes (CONTINI *et al.*, 2019).

O aumento na produtividade de grãos de milho está associado ao maior nível tecnológico adotado sobre a cultura, o que gera uma demanda crescente por fertilizantes químicos, uma vez que a maioria dos solos brasileiros são caracterizados pelo seu alto grau de intemperismo e baixa fertilidade (LOPES; GUILHERME, 2007). Assim, a dependência da agricultura por fertilizantes minerais é preocupante, uma vez que estão relacionados a problemas ambientais, como eutrofização de cursos d'água e acidificação do solo, além de representar um importante componente do custo de produção da cultura, representando cerca de 40% do custo de produção total em uma safra (GALVÃO *et al.*, 2014).

O nitrogênio é o nutriente pelo qual a planta apresenta maior demanda, o N está presente nas moléculas de compostos orgânicos, como os aminoácidos e proteínas, atua como ativador de enzimas, síntese de proteína, fotossíntese, respiração, multiplicação e diferenciação celular. Por isso, é o elemento que causa maiores efeitos nas características da planta relacionadas ao crescimento e desenvolvimento, as quais, direta ou indiretamente, afetam a produtividade da cultura (MALAVOLTA, 2006). No entanto, os fertilizantes nitrogenados de uso comum apresentam elevadas perdas na aplicação por lixiviação e volatilização da amônia e, por isso, são aplicados de forma parcelada, na semeadura e, posteriormente, em cobertura no período vegetativo, de forma a reduzir a perda nutriente aplicado ao solo (ZUFFO, 2016).

Para reduzir a dependência de fertilizantes nitrogenados, diminuir as perdas e aumentar a produtividade do milho de forma sustentável, algumas estratégias vêm sendo adotadas: o desenvolvimento de cultivares eficientes no uso do nitrogênio e com a capacidade de fixação biológica de nitrogênio por meio de biotecnologia, como a introgressão de genes como a nitrogenase e, por meio da

associação com microrganismos, como as bactérias promotoras de crescimento (BPCV) favorecendo a colonização radicular das plantas (MONTAÑEZ; SICARDI, 2013; MARTINS *et al.*, 2018; ZEFFA *et al.*, 2019; SHEORAN *et al.*, 2021). O uso destas bactérias vem sendo amplamente estudados a fim de possibilitar a redução do uso de fertilizantes. Além disso, esses microrganismos podem apresentar eficiência no biocontrole de pragas e doenças, diminuindo a necessidade de aplicação de fungicidas e inseticidas no manejo da cultura (PADDA *et al.*, 2017).

As BPCV são microrganismos do solo que, por meio da interação com a rizosfera das plantas, são capazes de aumentar a disponibilidade e absorção de nutrientes, por meio da fixação biológica de nitrogênio e solubilização do fósforo orgânico associado aos componentes do solo. Algumas bactérias podem atuar na síntese e regulação de fitohormônios, como auxina, giberelina, citocinina e etileno e, são efetivas também no controle de fitopatógenos causadores de doenças de plantas por diversos mecanismos de inibição (GLICK, 2020).

A eficiência destes microrganismos como promotores de crescimento em gramíneas foi comprovada em bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, *Cyanobacteria*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Herbaspirillum*, *Lysinibacillus* e *Pseudomonas* (VESSEY, 2003; SANTOS *et al.*, 2020). Na cultura do milho, bactérias do gênero *Azospirillum* são comumente empregadas como inoculante, dado seu potencial em promover o crescimento radicular na planta, podendo resultar em aumento da absorção de nitrogênio e incrementos na produtividade (CÁSSAN; DIAZ-ZORITA, 2016). Os microrganismos do grupo *Bacillus* também apresentam grande potencial como promotores de crescimento para a cultura, reduzindo a perda de nitrogênio do solo em mais de 50%, além de aumentar a eficiência do uso de nitrogênio, o desenvolvimento vegetal e a produtividade de grãos (SUN *et al.*, 2020).

No mercado de biofertilizantes, espécies como *Bacillus thuringiensis*, *B. megatherium*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. velezensis*, entre outras, vêm se tornando constituintes comuns de inoculantes devido à sua elevada capacidade de produção de exopolissacarídeos, regulação de fitohormônios e biocontrole, além de atuar na solubilização e disponibilidade de nutrientes do solo (BORRIS, 2011; GLICK *et al.*, 2020). Estudos relacionados ao conhecimento e aplicação de novas espécies como promotores de crescimento de plantas cultivadas são fundamentais para determinação de manejos mais eficientes na agricultura, mantendo o potencial

produtivo das culturas de forma mais sustentável. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de fixação biológica de nitrogênio por cepas de *Bacillus spp.* prospectadas na rizosfera da cultura e a sua capacidade em incrementar a produtividade na cultura do milho.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta monocotiledônea, pertencente à família Poaceae, originada há cerca de 9.000 anos no México Central. Com base em evidências genômicas e arqueológicas, acredita-se que o milho foi domesticado a partir do teosinto (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) e foi disseminado para as Américas e Europa, onde posteriormente ganhou importância econômica (PIPERNO *et al.*, 2009; KISTLER *et al.*, 2018; CHEN *et al.*, 2020). Devido sua ampla variabilidade genética e capacidade de adaptação a diferentes ambientes, passou a ser produzido em todo o mundo, atualmente sendo cultivado em latitudes desde 58°N até 40°S (FANCELLI, 2015).

O grão possui elevada importância econômica e nutricional, sendo fonte de energia, proteína, gordura e fibras, e apresenta em sua composição aproximadamente 72% de amido, 9,5% proteínas, 9% fibra e 4% de óleo em sua fase de maturação fisiológica. Sua produção é destinada principalmente para fins de alimentação animal e humana, matéria-prima para indústrias alimentícias e biocombustível (REGITANO-D'ARCE; SPOTO; CASTELLUCCI, 2015). Em alguns países em desenvolvimento, principalmente na América Latina, Ásia e África, essa cultura é considerada alimento básico para grande parte da população (SALDIVAR; PEREZ-CARRILLO, 2016). De acordo com a FAO (2022), o milho é o cereal mais produzido no mundo, com produção de aproximadamente 2,019 bilhões de toneladas em 2020/2021. Os três principais países produtores, EUA, China e Brasil, são responsáveis por 34, 22 e 7% da produção mundial, respectivamente.

A cultura também apresenta elevada importância agrônômica no Brasil, por ser um dos mais importantes produtos utilizados na rotação de culturas, principalmente em regiões nas quais a soja é a principal cultura. O plantio do milho em sucessão à safra de soja possibilita menor pressão de pragas e doenças da cultura anterior e, também, proporciona maior aproveitamento dos nutrientes do solo, uma vez que o sistema radicular de gramíneas explora diferentes profundidades em relação à soja, além disso, a cultura do milho apresenta alta produção de massa seca e, conseqüentemente, sua palha garante proteção ao solo durante maior período em

sistemas de plantio direto (MELO FILHO; RICHETTI, 1997).

No Brasil, o milho é cultivado em duas principais safras e, desde 2019, conta com uma terceira safra na região nordeste do país que representa em torno de 2% da produção, mas apresenta crescimento anualmente (CONAB, 2021). A primeira safra, ou safra de verão, tem seu plantio realizado entre os meses de agosto e dezembro, nesse período, os fatores climáticos, como temperatura, luminosidade e pluviosidade, estão em níveis ótimos para o desenvolvimento da planta. A produção da primeira safra, no entanto, vem diminuindo desde 2007, enquanto a produção para a segunda safra, geralmente cultivada em sucessão à soja, tem aumentado e atualmente representa aproximadamente três quartos da produção total de milho do Brasil (CONAB, 2021). Na safra 2019/2020 o país produziu mais de 100 milhões de toneladas do grão em uma área cultivada de aproximadamente 20 milhões de hectares, atingindo produtividade média superior à 5 ton ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2021).

Durante a segunda safra, cuja semeadura se situa de janeiro a março, após a colheita da safra de verão, a cultura está mais exposta aos riscos de estresses climáticos, como períodos prolongados de seca e baixas temperaturas em estádios determinantes da produtividade, além disso, seu potencial produtivo pode ser influenciado também por fortes limitações de radiação solar e temperatura na fase final de seu ciclo (SANGOI *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2018).

### 2.1.1 Fatores que afetam o Crescimento e o Desenvolvimento do Milho

Os fatores que podem influenciar o crescimento, o desenvolvimento e o rendimento da cultura são classificados em bióticos e abióticos. Os fatores bióticos envolvem a ocorrência de pragas e doenças, que podem causar alterações nos processos fisiológicos das plantas (MAGALHÃES; DURÃES, 2006). A ocorrência desses fatores está associada às condições climáticas (umidade e temperatura do ar) e região de cultivo, e, os reflexos na produção dependem da época de ocorrência e severidade da doença e/ou infestação (WORDELL *et al.*, 2016).

O período crítico da cultura para ocorrência de estresse de origem biótica acontece na fase de plântula, quando o estande de plantas está sendo estabelecido, e entre as fases de pendoamento, quando a planta apresenta maior índice de área foliar, até a fase de grão pastoso. Durante esse período, é importante

que as folhas estejam saudáveis para produzir fotoassimilados e realizar a translocação para enchimento dos grãos. Menor área foliar e, conseqüentemente, menor acúmulo de fotoassimilados implicam em menor produtividade das lavouras (WORDELL *et al.*, 2016).

Os fatores abióticos, relacionados ao clima e solo (disponibilidade de água e nutrientes, temperatura do ar, umidade relativa do ar e irradiação solar), são os mais limitantes e estão diretamente ligados a redução da produtividade da cultura. É necessário que estes atinjam níveis ótimos para cada fase de desenvolvimento da planta para que essa expresse seu potencial genético máximo (SOUZA; BARBOSA, 2015; TEIXEIRA *et al.*, 2020).

Geralmente, em condições adversas, a cultura do milho nunca está exposta somente a um fator de estresse, mas sim a uma combinação de fatores que desencadeiam diferentes níveis de estresse. O déficit hídrico, por exemplo, induz o estresse na planta, porém, quando associado à elevada temperatura do ar, alta irradiação e baixa umidade, o estresse se torna mais intenso e severo (SOUZA; BARBOSA, 2015).

O déficit hídrico é considerado o fator mais prejudicial no desenvolvimento da cultura, afetando desde o estabelecimento da plântula até o enchimento de grãos. No período vegetativo, em condições de seca, o fechamento estomático retarda a fotossíntese e diminui a produção de fotoassimilados, já na fase reprodutiva do milho, a seca e, conseqüentemente, a baixa translocação de fotoassimilados para os tecidos reprodutivos afeta negativamente o desenvolvimento do pólen e do tubo polínico, polinização, embrião, endosperma e desenvolvimento do grão (WILKINSON e DAVIES, 2010; TAIZ e ZEIGER, 2012; ROSA *et al.*, 2020).

A baixa disponibilidade de água no solo também afeta diretamente a absorção de nutrientes, que, quando prejudicada, pode afetar uma série de mecanismos fisiológicos, levando a menores índices de área foliar, abortamento de flores e grãos e, em casos severos, morte de plantas (BERGAMASCHI; MATZENAUER, 2014). Existe uma janela de concentração de nutrientes onde o crescimento das plantas é ótimo, quando concentrações abaixo dessa faixa ótima são disponibilizadas para a absorção, ocorre o déficit e o crescimento das plantas é reduzido (KALAJI *et al.*, 2014).

Fatores associados às características físico-químicas do solo, como a salinidade, também possuem grande influência no desenvolvimento da cultura

e produtividade de grãos (FAROOQ *et al.*, 2015). O milho é moderadamente suscetível à níveis salinos elevados no solo, maior acreção de Na<sup>+</sup> nas folhas, podendo retardar o crescimento e causar murchas nas plantas, além disso, o estresse salino também induz danos oxidativos às células vegetais com superprodução de espécies reativas de oxigênio nas plantas, além de interferir na absorção de nutrientes, como o potássio, nitrogênio, cálcio e magnésio. (AZEVEDO NETO *et al.*, 2006; FAROOQ *et al.*, 2015).

Em condições de estresse, o milho produz diferentes compostos que induzem a capacidade de resiliência da planta, como a síntese de proteínas relacionadas à defesa, sinalização hormonal, flavonóides e componentes da parede celular, como a lignina, além de outros metabólitos (VAUGHAN *et al.*, 2018). O mecanismo de percepção do estresse pela planta e indução da resistência é uma característica de interesse pelos pesquisadores, uma vez que pode resultar em menores perdas de produção em ambientes desfavoráveis ao desenvolvimento. Alguns estudos mostram que bactérias promotoras de crescimento vegetal podem atuar diretamente na sinalização e indução da resistência sistêmica da planta em condições adversas ao desenvolvimento (CHOUDHARY *et al.*, 2016; KIMOTHO *et al.*, 2019).

### 2.1.2 Disponibilidade de Nutrientes

A disponibilidade de nutrientes no solo é essencial para a cultura alcançar adequado desempenho produtivo. A deficiência de nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento vegetal pode comprometer o desenvolvimento normal de plantas e acarretar perdas na produtividade (MALAVOLTA, 2006). Coelho (2006) observou que a extração de nitrogênio, potássio, cálcio, magnésio e fósforo aumenta proporcionalmente ao aumento na produtividade, sendo também os nutrientes exigidos em maior quantidade pela cultura do milho, respectivamente.

O nitrogênio e o fósforo são os nutrientes que mais comumente limitam a produção vegetal, por geralmente estarem no solo em baixas concentrações e/ou em formas indisponíveis para a absorção pelas plantas (MALAVOLTA, 2006). O N e P representam também os elementos mais redistribuídos pela planta, sendo que quase todo o nitrogênio e fosforo absorvidos são exportados pelos grãos, cerca de 75 e 85%, respectivamente (COELHO, 2006; LIMA *et al.*, 2007).

O fósforo, apesar de exigido em menores quantidades quando

comparado ao nitrogênio e potássio, é aplicado em doses elevadas no solo, esse fator está relacionado a alta taxa de adsorção e precipitação no solo, o que leva a perdas maiores que qualquer outro nutriente, sendo rapidamente convertido a formas menos disponíveis, reduzindo assim, a eficiência da adubação e o aproveitamento pela planta (COELHO, 2006; LOURENZI *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2016).

O nitrogênio, por sua vez, representa o nutriente mais exigido pela cultura, no entanto, apresenta baixa disponibilidade no solo, uma vez que 98% do N do solo está em sua forma orgânica e apenas 2% se encontram em formas inorgânicas de amônio e nitrato (MALAVOLTA, 2006). O elemento se torna disponível para absorção vegetal quando a ligação N-N é quebrada e é ligado com outros elementos para formar compostos como amônio (NH<sub>4</sub>) e nitrato (NO<sub>3</sub>). O processo de redução do nitrogênio atmosférico e formação de compostos orgânicos ou inorgânicos é denominado fixação de nitrogênio (MALAVOLTA, 2006; TARTOWSKI; HOWARTH, 2013).

A necessidade de nitrogênio pelo milho apresenta variações de acordo com o estágio fenológico no qual a cultura se encontra, requerendo alta disponibilidade do nutriente disponível no solo entre os estádios V4 e V8, quando ocorre a determinação da produtividade potencial da planta (DEPARIS, 2006). Sendo assim, usualmente recomenda-se que a aplicação de fertilizantes nitrogenados no milho seja realizada em cobertura e de forma parcelada, podendo chegar a doses superiores à 150 kg ha<sup>-1</sup> (GROSS; PINHO; BRITO, 2006; FARINELLI; LEMOS, 2010; OKUMURA, 2011; DEMARI *et al.*, 2016).

A aplicação de fertilizantes durante o ciclo da cultura apresenta participação significativa nos custos de produção, Artuzo *et al.* (2018), analisando os componentes dos custos de produção, demonstraram que a adubação representa 40% da despesa total de uma safra. Além disso, nos últimos anos, fertilizantes minerais apresentaram aumento superior a 100% no valor de compra devido ao aumento nos custos de produção e importação, o que evidencia a necessidade de se buscar formas mais eficientes de aplicação e aproveitamento dos nutrientes disponíveis no solo (CEPEA, 2021).

O desenvolvimento de cultivares mais eficientes no uso do nitrogênio e a utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal são consideradas importantes estratégias para a diminuição da necessidade e uso de adubos mineiras, podendo favorecer o desenvolvimento do milho em condições limitantes (ZUFFO,

2016). BPCV atuam suprindo a demanda da planta por nutrientes e água, favorecendo o desenvolvimento radicular e parte aérea e, no aumento da tolerância das plantas contra estresses bióticos, como agentes de biocontrole, e abióticos, através da regulação de fitohormônios (SINGH; MALIK; SINGH, 2013).

## 2.2 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL

Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), são microrganismos que apresentam capacidade de influenciar positivamente o crescimento vegetativo de plantas por meio de mecanismos indiretos, atuando como agente de biocontrole na inibição de danos causados por microrganismos patogênicos, ou diretos, por interação com a rizosfera, facilitando a aquisição de nutrientes ou na regulação dos níveis de hormônios vegetais (GLICK, 2012; SANTOYO *et al.*, 2016).

BPCVs podem apresentar diferentes interações com as raízes e são classificadas nos seguintes grupos: bactérias endofíticas, encontradas na região intercelular do tecido radicular, entre as células corticais; bactérias simbióticas, que colonizam as células vegetais e produz estruturas nodulares especializadas; bactérias associadas, que permanecem na superfície radicular e, por fim, bactérias de vida livre, que permanecem na rizosfera sem estabelecer conexão direta com a raiz, mas utiliza metabólitos excretados pelas raízes como fonte de C e N (GRAY; SMITH, 2005; SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015).

As BPCV encontradas na rizosfera podem apresentar um ou mais mecanismos que possibilita mudanças químicas no solo que favorecem e aumentam a eficiência da absorção pelas plantas. As principais abordagens sobre BPCV encontradas na literatura envolvem a capacidade antagonista às pragas e patógenos, promoção da nutrição e crescimento pela disponibilização de nutrientes do solo e estímulo dos mecanismos de defesas da planta (VAN LOON, 2007).

O número de bactérias encontradas no solo pode apresentar variações de acordo com as condições de temperatura, umidade, presença de sais e outros elementos, assim como o teor de matéria orgânica e presença de plantas no solo. Aliado a estes fatores, a condição mais determinante para a variabilidade microbiológica de um solo é o pH, podendo diminuir a diversidade em até 60% em solos mais ácidos (FIERER; JACKSON, 2005). Em condições ideais, podem ser

encontradas cerca de  $10^8$  a  $10^9$  células por grama de solo. No entanto, em solos sob condições de estresse, o número de bactérias pode reduzir significativamente, atingindo a  $10^4$  células por grama de solo (GLICK, 2012).

Lauber (2009) constatou a influência das características do solo sobre a presença de bactérias na rizosfera, estudando a diversidade microbiológica de 88 amostras de solos observou elevada variabilidade correlacionada ao pH, verificando maior diversidade de colônias em solos com pH próximo ao neutro e menores taxas em solos com pH superior a 8 ou menores que 4,5. O teor de matéria orgânica do solo também pode apresentar grande influência na microbiota do solo, tendo menor concentração de bactérias em solos com menores quantidades de matéria orgânica, uma vez que o carbono orgânico é a principal fonte de C para microrganismos do solo (ARAUJO; PEDROSO, 2013).

A presença de nutrientes no solo também influencia a diversidade de bactérias, Zeng *et al.* (2016) estudaram a diversidade microbiana em solos com elevadas doses de fertilizantes nitrogenados e observaram decréscimo na atividade microbiana na camada superficial (0-10 cm). No entanto, a adição de N favoreceu algumas espécies microbianas, como as *Actinobacteria* e *Betaproteobacteria*, por outro lado, *Acidobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, e *Chloroflexi* apresentaram queda de populações. Isso ocorre porque alguns grupos apresentam uma taxa de crescimento acelerada, tendo vantagem em ambientes com abundância de nutrientes. A adição de fertilizantes nitrogenados no solo também pode ocasionar na acidificação do solo e influenciar a diversidade microbiana (ZENG *et al.*, 2016).

Os principais filos de bactérias encontrados no solo, comuns em quase todos os ambientes, são: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, sendo descritos em mais de 75% dos resultados de 16s rRNA em estudos de comunidades microbianas no solo (HUGENHOLTZ; GOEBEL; PACE, 1998; AFZAL *et al.*, 2019). Grupos como *Acidobacteria*, *Planctomicetos* e *Verrucomicrobia*, apesar de abundantes, são pouco representados por microrganismos isolados do solo (LAUBER, 2009).

A maior parte das interações microbianas presentes no solo se concentram principalmente ao redor das raízes das plantas, na rizosfera, onde estão presentes os compostos exsudados pelas raízes como açúcares, polissacarídeos, aminoácidos, ácidos orgânicos e metabolitos secundários que funcionam como atração de microrganismos, que podem ser benéficos, maléficos ou neutros para as

plantas (BADRI; VIVANCO, 2009; BADRI *et al.*, 2009).

A composição de exsudatos também apresenta variações e pode atuar na regulação de microrganismos do solo. Alterações podem ser observadas em razão da cultura, da exposição da planta ao estresse, o estágio de desenvolvimento da cultura e, também, pode ser influenciada por diferenças na arquitetura da raiz, e na composição de comunidades bacterianas (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010; HAICHAR *et al.*, 2008).

Peiffer *et al.*, (2013), compararam o microbioma na rizosfera de 27 linhagens de milho cultivadas em cinco ambientes e em amostras de solos sem a presença de plantas cultivadas. Os autores observaram maior diversidade microbiológica em solos da rizosfera de milho, foi constatada também divergências entre os grupos de bactérias encontradas na rizosfera e em amostras de solo puro, predominando, em solos puros, os grupos *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia* e *Planctomycetos*, enquanto na rizosfera os grupos de maior presença foram *Burkholderiae*, *Oceanospirillales* e *Proteobacterias*.

Teixeira *et al.* (2010), estudando diversidade bacteriana na rizosfera observaram predominância de organismos pertencentes aos filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Firmicutes*. Verma *et al.* (2014), observaram resultados semelhantes estudando a diversidade de bactérias na rizosfera do trigo, no isolamento de 222 bactérias se sobressaíram os filos *Proteobacterias*, *Firmicutes* e *Actinobacteria*, pertencente a 12 gêneros: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Duganella*, *Exiguobacterium*, *Kocuria*, *Lysinibacillus*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Stenotrophomonas*. Colônias dos gêneros *Bacillus* também apresentam participação significativa na diversidade microbiana e na interação com plantas cultivadas (PRIEST, 1993). Algumas espécies do gênero são conhecidas por promover o crescimento de plantas cultivadas, como o milho e outras gramíneas, por meio de mecanismos como capacidade de fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato orgânico do solo, síntese de fitohormônios e propriedades antagônicas a microrganismos fitopatogênicos (SANSINENEA, 2019; TIWARI *et al.*, 2019).

### 2.2.1 Fixação Biológica de Nitrogênio

O nitrogênio é o elemento mais limitante para o crescimento de plantas, pois é parte da composição de proteínas e enzimas, clorofila e demandado

em inúmeros constituintes da estrutura e metabolismo de plantas. Apesar de abundante na atmosfera, sua forma atmosférica ( $N_2$ ) não é assimilada pela maioria dos organismos. Além disso, seu efeito residual no solo é baixo, sofrendo perdas por processos de volatilização, lixiviação e desnitrificação, ficando indisponível para absorção (REIS *et al.*, 2018).

A maior parte do nitrogênio atmosférico é fixado por bactérias do solo, processo que é conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN). A FBN pode ser realizada por duas principais classes de bactérias: simbióticas e de vida livre. Bactérias simbióticas são integrantes do gênero *Rhizobium* e estabelecem associação com plantas leguminosas, geralmente formando nódulos radiculares (GRANHALL, 1981; DAVIES-BARNARD; FRIEDLINGSTEIN, 2020).

As bactérias de vida livre colonizam preferencialmente a rizosfera de plantas de gramíneas, onde os exsudados das raízes são utilizados como fonte de carbono e funcionam como atrativo para estes microrganismos (DÖBEREINER; ALVAHYDO, 1959; MARIN *et al.*, 1999). Bactérias de vida livre que fazem a fixação biológica de nitrogênio pertencem a uma ampla variedade de grupos bacterianos, entre os gêneros mais relevantes estão *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Frankia*, *Herbaspirillum*, *Bacillus* e *Paenibacillus* (REIS *et al.*, 2018; VESSEY, 2003).

A FBN em bactérias é realizada pela enzima nitrogenase, que catalisa a redução biológica do  $N_2$  em amônia e é formado por duas subunidades: a ferro proteína, que funciona como um doador de elétrons dependente de ATP para a proteína ferro-molibdênio (MoFe), que contém o local catalítico da enzima. Ambas as proteínas componentes da nitrogenase são extremamente sensíveis ao oxigênio e, na maioria dos diazotróficos, estratégias fisiológicas são usadas para fornecer proteção ao oxigênio, como: evitação de oxigênio através do crescimento anaeróbico, consumo de oxigênio em excesso pela respiração aumentada, barreiras de difusão de oxigênio ou compartimentação espacial ou temporal da enzima (DIXON; KAHN, 2004; REIS *et al.*, 2018).

Os primeiros genes envolvidos na fixação biológica do nitrogênio foram identificados e estudados utilizando-se a bactéria *Klebsiella pneumoniae*, sendo identificados cerca de 20 genes, denominados genes *nif*. As proteínas estruturais da nitrogenase são codificadas por três genes, *nifD* e *nifK* para as subunidades da proteína MoFe e *nifH* para a proteína ferro. A sequência estrutural do gene *nif* são

conservadas entre diversos organismos fixadores de nitrogênio, incluindo bactérias metanogênicas (TRIPLETT, 1990; VINHAL-FREITAS; RODRIGUES, 2010).

A fixação biológica de nitrogênio é um processo de alto custo em termos de energia, a nitrogenase hidrolisa 16 adenosina-trifosfato (ATP) e transfere 8 elétrons por molécula de N<sub>2</sub> fixado (REIS *et al.*, 2018). Espécies bacterianas capazes de executar esse processo o fazem para atender suas necessidades fisiológicas e, com isso, pouco nitrogênio permanece disponível para o uso da planta (SOLANO *et al.*, 2008).

A capacidade da FBN em contribuir com a fixação de nitrogênio para o crescimento das plantas de milho foi demonstrada por Baral e Adikhari; Peng *et al.* (2013), utilizando isolados do gênero *Azotobacter*, que contribuiu com o incremento de peso, altura, índice de área foliar e produção de grãos. Kuan *et al.* (2016), observaram maiores resultados de FBN utilizando isolados de *Bacillus pumilus*.

### 2.3 O GÊNERO *AZOSPIRILLUM*

Dentre os gêneros de bactérias que promovem crescimento de plantas, espécies de *Azospirillum* tem grande destaque na utilização em cereais, promovendo maior desenvolvimento radicular e incremento na disponibilidade de nitrogênio para as plantas (CASSÁN *et al.*, 2020). Duas principais características são utilizadas para definir esse gênero: sua habilidade na fixação do nitrogênio atmosférico e a produção de fitohormônios como auxina, citocinina e giberelina (DAY; DÖBEREINER, 1976; TIEN *et al.*, 1979; CASSAN *et al.*, 2020). Bashan e de-Bashan (2010) propuseram o modo de ação do *Azospirillum* através da “Hipótese de mecanismos múltiplos”, que afirma que nenhum mecanismo único está envolvido na promoção do crescimento das plantas; em vez disso, em cada caso de inoculação, uma combinação de alguns ou muitos mecanismos é responsável pelo efeito benéfico.

Os benefícios observados nas plantas pela inoculação com o *Azospirillum* estão relacionados principalmente ao arranque inicial da cultura, a colonização bacteriana e sua capacidade de produção de fitohormônios proporciona maior desenvolvimento de raízes, alterando a morfologia pelo maior número de raízes laterais e pelos radiculares (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). Cássan *et al.*

(2020) afirmam que o aumento da área superficial de solo explorado e da biomassa radicular aumenta também o suprimento de exsudatos para a rizosfera, promovendo a associação de bactérias da rizosfera com a planta e, assim, as bactérias que colonizam as raízes nesse processo são capazes de fornecer à planta quantidades significativas de  $\text{NH}_4^+$  via FBN.

A maior absorção de nitrogênio nos estádios iniciais das plantas inoculadas com *Azospirillum* aumenta significativamente o teor de nitrogênio total na planta e nos grãos, além de diminuir o requerimento de aplicação de adubos nitrogenados, tornando a planta mais eficiente na absorção e redistribuição do nutriente (ZEFFA *et al.*, 2019). Esse resultado já foi observado em diversas culturas como milho, trigo, cana de açúcar, arroz e pastagens (MOUTIA *et al.*, 2010; KHORSHIDI *et al.*, 2011; GALINDO *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2021) e proporcionou incrementos na produtividade de até 30% para o milho e 18% para trigo (HUNGRIA *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.* 2013).

Zeffa *et al.* (2018) analisaram 14 trabalhos avaliando a eficiência da inoculação de *Azospirillum* no incremento da produtividade de milho e observaram um acréscimo médio de 600 kg há<sup>-1</sup> em tratamentos inoculados com o microrganismo. Os autores constataram que diferentes níveis de adubação nitrogenada também podem influenciar na resposta de produtividade de grãos em milho inoculado, encontrando um comportamento linear decrescente entre a inoculação com *Azospirillum* e a adição de fertilizantes nitrogenados, ou seja, a adição de nitrogênio em cobertura diminui a eficiência do inóculo, reduzindo o ganho potencial de produtividade.

A coinoculação de *Azospirillum* com *Rhizobium* também apresenta benefícios na promoção de crescimento de plantas leguminosas de elevada importância econômica como a soja, amendoim e feijão (REMANS *et al.*, 2008; VICARIO *et al.*, 2016). A co-inoculação de *Rhizobium* e bactérias produtoras de fitohormônio em leguminosas pode contribuir para uma maior nodulação, isso porque auxinas também podem estimular a exsudação de flavonóides, indutores de nodulação, favorecendo o processo de nodulação (STAR *et al.*, 2012; CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016). Também pode ser observado aumento na área superficial de raízes, comprimento e maior número de pelos radiculares, permitindo assim maior superfície de contato com microrganismos nodulantes (RONDINA *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2021)

Estudos mostram que o desempenho do *Azospirillum* sp. é fortemente influenciado em diferentes condições de manejo e clima, apresentando variações significativas nos resultados em experimentos *in vitro* e *in vivo* (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016; CASSÁN *et al.*, 2020). Diaz-Zorita *et al.* (2015) explica a variabilidade de resultados devido à complexa interação entre os diferentes modos de ação do *Azospirillum* sp. nas plantas e com os microrganismos já presentes no solo, e pela multiplicidade de condições de estresse abiótico a serem amenizados na presença dos microrganismos.

Cassán e Diaz-Zorita (2016) afirmam que condições estressantes para a cultura, como secas de curta duração, principalmente durante os estágios iniciais de crescimento das culturas inoculadas, entre outras, afetam gravemente o sucesso da inoculação. Dessa forma, estudos com BPCP em condições *in vivo* em diferentes ambientes climatológicos são de fundamental importância para verificar a estabilidade e eficiência de bactérias rizosféricas em culturas agrícolas. Além disso, o conhecimento de um maior número de espécies eficientes na promoção de crescimento vegetal se mostra uma alternativa ao mercado de inoculantes e biofertilizantes de forma a aumentar a eficiência da planta e diminuir a dependência dos fertilizantes minerais.

#### 2.4 O GÊNERO *BACILLUS*

Entre as bactérias encontradas na rizosfera, o gênero *Bacillus* é um dos mais abundantes e, por apresentar formação de endósporos, o grupo está em todo o mundo e sobrevive em diferentes condições ambientais e variações atmosféricas incluindo temperatura extrema, umidade, solo metálico e salino (TIWARI *et al.*, 2019). O grupo *Bacillus*, da família Bacillaceae, foi classificado por Ehrenberg (1835) ao identificar bactérias que apresentavam endósporos em forma de bastonete. Devido sua ampla variabilidade fenotípica e genotípica, desde sua identificação, foi desmembrado em novos gêneros como *Alicyclobacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Lysinibacillus*, *Viridiibacillus*, *Virgibacillus*, *Geobacillus*, *Amphibacillus*, *Halobacillus*, *Oceanobacillus* e *Salibacillus* (TAKAMI, 2011; XU; COTE, 2003; TIWARI *et al.*, 2019).

Bactérias do gênero *Bacillus* são frequentemente considerados como fábricas microbianas por produzir uma vasta gama de moléculas biologicamente ativas (STEIN, 2005; SANSINENEA, 2019). Na agricultura, a síntese desses

compostos confere às espécies do gênero elevada eficiência na promoção de crescimento vegetal. Os mecanismos de promoção de crescimento pelos *Bacillus* envolvem a solubilização de nutrientes, como fosforo e potássio, fixação de nitrogênio, produção de sideróforos, produção de fitohormônios, modulação dos níveis de hormônios sintetizados pela planta e pode atuar na inibição de crescimento de fungos, agindo na defesa da planta aos fitopatógenos (RADDADI *et al.*, 2008; BORRIS, 2015; BLAKE *et al.*, 2021).

Assim como bactérias do gênero *Azospirillum*, algumas espécies de *Bacillus* demonstraram promover uma melhor arquitetura de raiz nos estádios iniciais da planta. No milho, por exemplo, alguns estudos demonstram o aumento de volume e ramificações das raízes que possibilitam uma maior área superficial de contato com o solo e, conseqüentemente, maior absorção de água e nutrientes (VACHERON *et al.*, 2013; CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016; SOUSA *et al.*, 2021).

A aplicação de isolados bacterianos de *Bacillus* como inoculantes em culturas como feijão, tomate, milho e milho vem se mostrando ser eficiente para promover o crescimento e aumentar a absorção de nutrientes pelas plantas (ELKOKA *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2018; HE *et al.*, 2019; ALI *et al.*, 2021; MASOOD *et al.*, 2020). Estudos relatam a presença do gene *nif* responsável pela expressão da enzima nitrogenase, em espécies de *Bacillus*, como *B. circulans*, *B. oceanisediminis*, *B. subterraneus*, *B. safencis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. aerophilus*, *B. flexus* e *B. subtilis* (YOUSUF *et al.*, 2017).

Quando em interação com outros microrganismos, os efeitos de *Bacillus* como promotor de crescimento são de elevada eficiência. Em leguminosas, quando co-inoculado com *Rhizobium*, pode aumentar o número e tamanho de nódulos, assim como a biomassa da planta, absorção de nitrogênio e produtividade (BAI *et al.*, 2003; SCHWARTZ *et al.*, 2013).

Algumas espécies de *Bacillus* também apresentam potencial de aumentar a tolerância das plantas à estresses abióticos, como déficit hídrico e salinidade (BOKHARI *et al.*, 2019). Shobana *et al.* (2020), observaram que o inóculo de duas espécies do gênero (*Bacillus altitudinis* e *Bacillus mathylotheticys*) aumentou a tolerância de arroz ao déficit hídrico, elevando os teores de massa seca da planta. A inoculação com *Bacillus* em combinação com outras BPCV também proporciona à planta maior tolerância às condições adversas. Armada *et al.* (2016) estudaram o efeito da interação de *Bacillus thuringiensis* com fungos micorrízicos arbusculares na

promoção do crescimento de lavanda em condições de estresse hídrico e observaram que a bactéria favoreceu a colonização das raízes pelos fungos micorrízicos diminuindo os efeitos da seca sobre a planta.

A produção de biofertilizantes a base de *Bacillus* se torna interessante uma vez que o microrganismo apresenta alta tolerância à estresses abióticos quando comparado à outras BPCV, devido a sua habilidade de formar esporos (endósporos), além de produzir metabólitos que proporciona também a indução da resistência da planta ao ataque de pragas e aumenta a absorção de nutrientes do solo (BOKHARI *et al.*, 2019).

#### 2.4.1 *Bacillus pseudomycooides*

A espécie *Bacillus pseudomycooides* foi descrita pela primeira vez por Nakamura (1998), por meio da divisão da espécie *B. mycooides*. Semelhante às espécies *B. mycooides* e *B. cereus*, essas são gram-positivas, formadoras de endósporo, anaeróbica facultativa, com respostas positivas para a produção de acetilmetilcarbinol, atividade de lecitinase, utilização de citrato, degradação da tirosina e redução do nitrato a nitrito.

O nome *Bacillus pseudomycooides* se refere a sua morfologia, onde *mycooides* quer dizer “tipo fungo” e *pseudo* “falso”, representando ser um falso *mycooides* e se referindo a sua morfologia que apresenta filamentos durante o crescimento da colônia, similar ao crescimento fúngico (NAKAMURA, 1988).

As bactérias da espécie *B. pseudomycooides* são estudadas para diversas finalidades e, devido a produção de metabólitos, apresentam eficiência tanto para processos industriais como para a área agrícola. Pramanik *et al.* (2021) observaram em *B. pseudomycooides* eficiência na produção de celulase utilizando como fonte de carbono e nitrogênio o bagaço de cana-de-açúcar e extrato de levedura, respectivamente. Kumar *et al.* (2019) observaram em isolados de *B. pseudomycooides* capacidade de descoloração e degradação de corantes azo presentes em efluentes, evidenciando a capacidade do microrganismo como um método eficiente na remoção de corantes sintéticos de efluentes. Alguns estudos mostram que a espécie apresenta atividade antimicrobiana para bactérias gram-positivas (BASI-CHIPALU *et al.*, 2015).

Na agricultura, *B. pseudomycooides* apresenta potencial antifúngico,

atuando na inibição do crescimento de colônias de fitopatógenos como: *Fusarium graminearum*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis*, *Rhizoctonia solani* e *Thichoderma viride* (EL-SAADONY *et al.*, 2019; KNEZEVIC *et al.*, 2021). Além disso, a espécie também apresenta produção de fitohormônios, como o ácido indol acético, sideróforos e exopolissacarídeos. (SOLMAZ *et al.*, 2018; KNEZEVIC *et al.*, 2021). Pramanik *et al* (2019), observaram também em *B. pseudomycooides* ação na disponibilização de nutrientes presentes no solo. As bactérias mostram efeito na solubilização de potássio, liberando o K<sup>+</sup> ligado aos coloides do solo e aumentando a disponibilidade e absorção do nutriente pela planta, o que demonstra o potencial da espécie como biofertilizante.

#### 2.4.2 *Bacillus amyloliquefaciens*

*Bacillus amyloliquefaciens* (FUKUMOTO, 1943) é uma bactéria Gram positiva, móvel, formadora de esporos, em forma de bastonete, presente no solo ou endofítica em plantas hospedeiras, sua classificação se dá por sua capacidade de produzir (faciens) uma  $\alpha$ -amilase (amilo) liquefante (lique). É relacionada à espécie *Bacillus subtilis*, e foi por muito tempo classificada como *Bacillus subtilis* subsp. *amyloliquefaciens*. Após a reclassificação, foi dividida em duas subespécies: *B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum*, e *B. amyloliquefaciens* ssp. *amyloliquefaciens* (BORRISS *et al.* 2011; SOARES *et al.*, 2016; NGALIMAT *et al.*, 2021).

Na agricultura, a espécie é conhecida por sua alta produção de compostos antimicrobianos utilizado na supressão de patógenos. Sua eficiência no biocontrole já foi relatada em patógenos das culturas do arroz, milho, tomate, pepino, algodão, tabaco e alface (GUEL *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2009; TIWARI *et al.*, 2017; CUI *et al.*, 2019). De acordo com Borriss (2011) a cepa de *B. amyloliquefaciens* FZB42, utilizado comercialmente como biofertilizante e agente de biocontrole na agricultura, apresenta quase 10% do genoma dedicado à síntese de metabólitos antimicrobianos e seu principal modo de ação é por meio da colonização sistêmica em plantas e o promoção do biocontrole pela indução sistêmica da resistência (ISR).

Seu elevado potencial antimicrobiano associa-se ainda à sua capacidade de colonização da rizosfera e plantas, Reva *et al.* (2004) comparou o potencial colonizador de duas cepas de *B. amyloliquefaciens* e observou em uma

delas a formação de uma camada espessa na superfície da semente com a produção de estruturas que pareciam ancorar a bactéria à superfície da raiz. Essa capacidade efetiva de colonização da planta por *B. amyloliquefaciens* foi associada a um alto nível de proteção contra fitopatógenos.

Resultados positivos na promoção do crescimento de plantas também foram observados para *B. amyloliquefaciens* Soares *et al.* (2015) e Abdallah *et al.* (2018) observaram em cepas de *B. amyloliquefaciens* produção de ácido indolacético (IAA), secreção de enzimas hidrolíticas, solubilização de fosfato, antibiose contra patógenos e capacidade de fixação de nitrogênio, além da capacidade de incrementar o crescimento vegetal e alta competitividade na rizosfera de plantas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 PROSPECÇÃO E ISOLAMENTO

O experimento foi realizado na Universidade Estadual de Londrina (UEL), localizada no município de Londrina, Estado do Paraná, em condições de casa de vegetação Van der Hoeven®. Para a prospecção de bactérias da rizosfera, foram utilizados solos de uso agrícola provenientes de cinco diferentes localidades, sendo estas: Rio Verde – GO, Dourados – MS (1), Maracaju – MS (2), Campo Verde – MT e Londrina – PR. Os solos foram coletados da camada superficial (0-20 cm) e apresentavam as seguintes características físicas e químicas (Tabela 1).

Tabela 1. Características químicas e classificação textural de solos utilizados na prospecção de bactérias da rizosfera do milho.

Local	Classificação	Argila (%)	pH CaCl <sub>2</sub>	P mg/dm <sup>3</sup>	cmolc/dm <sup>3</sup>					M.O.	V%	
					K	Ca	Mg	Al+H	Al			CTC
GO	Média	25	5,8	20,3	0,12	4,6	1,6	2,71	0	9,0	29	70,0
MS1	Argiloso	56	5,2	12,1	0,49	10,8	2,0	2,88	0	16,2	32,9	82,2
MS2	Argiloso	56	5,7	7,0	0,40	13,3	3,2	2,69	0	19,6	20,6	86,3
MT	Arenoso	9	5,6	4,5	0,02	1,8	0,9	2,88	0	5,5	13,9	48
PR	Muito Argilosa	68	5,2	10,5	0,96	5,6	1,0	3,10	0	10,7	39	71

Foram utilizados vasos plásticos contendo 900 mL das amostras de solo puro, com cinco repetições por amostra, em delineamento inteiramente casualizado, nos quais foram semeadas três sementes por vaso do híbrido DKB 230. Dez dias após a semeadura, foi realizado o desbaste das plantas, selecionando apenas uma planta por vaso.

As plantas foram retiradas da casa de vegetação 45 dias após a semeadura, sendo realizado corte e a lavagem superficial das raízes, preservando-se o solo da rizosfera, formando uma amostra para cada tratamento, da qual foi realizado o isolamento.

Para o isolamento bacteriano, as raízes de cada tratamento foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 1 cm, selecionando principalmente raízes periféricas, e posteriormente pesado 1g de raízes e macerado sob condições

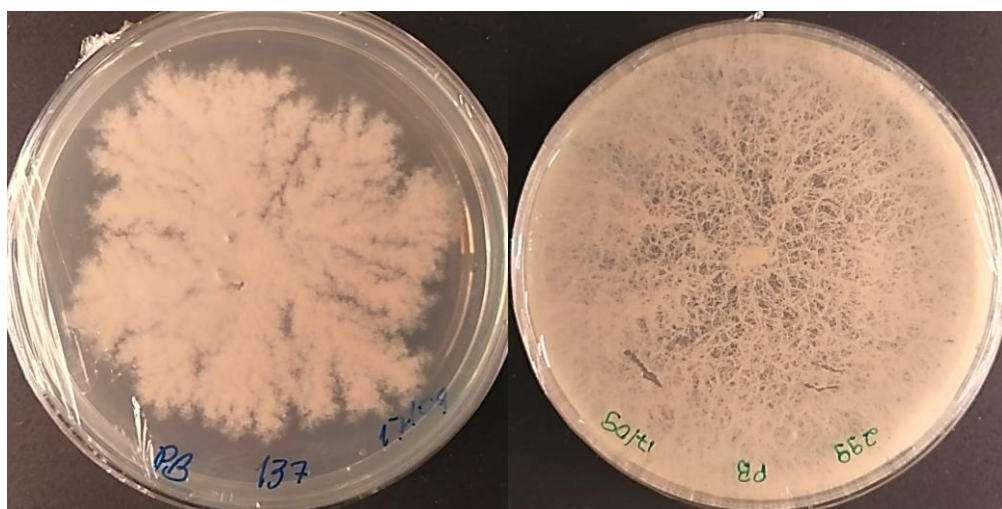
assépticas na presença de 9 mL de solução salina esterilizada até a obtenção de um homogenato. Os homogenatos assim obtidos constituíram a diluição  $10^{-1}$  (m/v) do sistema radicular das amostras, sendo diluído de forma seriada (v/v) pela transferência de 1,0 mL do homogenato para tubos de ensaios contendo 9 mL de solução salina esterilizada (diluição  $10^{-2}$ ), e consecutivamente até a obtenção da diluição  $10^{-6}$  de cada tratamento. As diluições de  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-6}$  foram utilizadas para o isolamento dos microrganismos.

As diluições a serem plaqueadas em meio de cultivo foram aquecidas a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos a fim de eliminar colônias de bactérias gram negativas. Posteriormente, 100  $\mu\text{L}$  das diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-6}$  foram depositados, em triplicata, em placas de petri contendo meio de cultura sólido.

Os meios de cultivos utilizados foram Ágar Nutriente - AN (1 g de extrato de carne, 2g de extrato de levedura, 5 g de peptona, 5 g de NaCl e 15 g de ágar) Luria-Bertani - LB (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl e 15 g de ágar) e NBRIP - *National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium* (10 g de glicose; 0,25 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 5 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,2 g de KCl; 0,1 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5 g de  $\text{CaHPO}_4$  e 15 g de ágar). Após a inoculação, as placas foram mantidas a  $28^{\circ}\text{C}$  por um período de 24 horas para crescimento das estirpes. Posteriormente, as colônias foram selecionadas e riscadas em placa contendo os correspondentes meios de culturas solidificados para verificação da pureza da colônia. Este processo, denominado purificação, foi repetido até a obtenção de placas com apenas um morfotipo de colônia. Após purificação, os isolados foram crescidos em meio LB líquido por 24 h a 180 rpm e  $30^{\circ}\text{C}$ , diluídos em glicerol 50% (v/v) e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Da coleção obtida, foram selecionados 89 isolados com base na morfologia da colônia. Neste estudo, buscou-se trabalhar com isolados bacterianos que apresentassem formação de colônias no formato de vórtex, característica de *Bacillus pseudomycooides* e *Paenibacillus* (Figura 1).

Figura 1. Morfotipo de crescimento de colônias de espécies de *Bacillus pseudomycooides* e *Paenibacillus* selecionados no desenvolvimento deste trabalho.



Fonte: o autor

### 3.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

Para identificação dos isolados com potencial de fixação biológica de nitrogênio (FBN) foi utilizado meio de cultura semissólido livre de nitrogênio (NFb), contendo por litro 10 g de ácido málico, 20 g de glicose, 0,8 g de  $K_2HPO_4$ , 0,2 g de  $KH_2PO_4$ , 0,5 g de  $MgSO_4$ , 0,1 g de  $FeCl_3$ , 0,02 g de  $NaMoO_4$ , 0,02 g de  $CaCl_2$ , 0,1 g de extrato de levedura, 1 g de ágar e azul de bromotimol. O pH do meio foi ajustado a 7,0. Os isolados foram previamente crescidos em meio LB líquido a 28°C por 24 horas. Em seguida, foi transferido 50  $\mu$ L da suspensão bacteriana para frascos de penicilina contendo 5mL do meio NFb, utilizando três repetições. Após incubação a 28 °C durante sete dias foi avaliada a capacidade de fixação de nitrogênio, mediante a observação do crescimento das bactérias abaixo da superfície do meio de forma qualitativa.

Os 89 isolados foram classificados quanto ao seu potencial de FBN em meio NFb de acordo com o período do crescimento observado em meio de cultura, sendo que isolados que apresentaram crescimento dentro de 48 horas foram classificados como ++ e isolados que apresentaram crescimento 7 dias após a inoculação foram classificados como +.

### 3.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL EM AMBIENTE PROTEGIDO

Com base na caracterização morfológica e análise bioquímica dos isolados, foram selecionados aqueles com maior potencial de FBN e, conseqüentemente, promoção de crescimento de plantas e, estes foram inoculados e submetidos a experimento em casa de vegetação para comparação entre os isolados bacterianos selecionados (Tabela 2).

Tabela 2. Isolados bacterianos selecionados e avaliados quanto à Fixação Biológica de Nitrogênio em Ambiente protegido.

Tratamento	Isolados
1	LEBA 189
2	LEBA 168
3	LEBA 185
4	LEBA 162
5	LEBA 174
6	LEBA 157
7	LEBA 166
8	LEBA 113
9	LEBA 150
10	LEBA 188
11	LEBA 125
12	LEBA 187
13	<i>Rizospirillum</i> <sup>®</sup>
14	10% N
15	50% N
16	100% N

Os inóculos foram preparados no laboratório de Ecofisiologia e biotecnologia agrícola na Universidade Estadual de Londrina (LEBA – UEL). Os isolados foram ativados em placa de petri contendo meio de cultura LB e incubada em câmara B.O.D (SS Scientific) por 24 horas a 28 °C. Posteriormente foi estriada em três placas contendo o mesmo meio de cultura, que foram incubadas novamente sob as mesmas condições por 24 horas.

A biomassa bacteriana formada na superfície das placas foi raspada e suspendida em solução salina (0,85% cloreto de sódio). Essa suspensão foi diluída em série, utilizando-se tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina e 1 mL do inóculo. Posteriormente, 100 µL das diluições -5, -6 e -7 foram plaqueados em meio

de cultura LB para determinação de unidades formadoras de colônia (ufc/mL). A suspensão do inóculo dos isolados foi ajustada para  $2 \times 10^8$  ufc/mL. As sementes foram inoculadas seguindo a dose 100 mL/60.000 sementes e cada isolado constituiu em um tratamento e 4 controles, sendo os controles: doses proporcionais de nitrogênio equivalentes à 100%, 50% e 10% N e controle inoculado com o produto comercial *Rizospirillum*<sup>®</sup>, que contém cepas de *Azospirillum brasilense* (Ab-v5 e Ab-v6). Os tratamentos inoculados com os isolados bacterianos e controle *Rizospirillum*<sup>®</sup> receberam as doses proporcionais ao controle com 10% da dose total de nitrogênio aplicado durante todo o experimento.

Para o experimento conduzido em casa de vegetação, o híbrido utilizado foi o 30F53 VYHR, material precoce, com florescimento em 848 GDU e maturidade fisiológica em 1598 GDU e população média recomendada de 70 mil plantas ha<sup>-1</sup>. Foi semeado em vasos plásticos de 700 mL com areia previamente esterilizada. Os vasos foram irrigados diariamente, e fertirrigados a cada 3 dias com 100 mL por vaso de solução nutritiva Hoagland e Arnon (1950) modificada por Chun *et al.* (2005), contendo em 100% N (2.0 mmol L<sup>-1</sup> Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 0.75 mmol L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.65 mmol L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>; 0.1 mmol L<sup>-1</sup> KCl; 0.25 mmol L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;  $1 \times 10^{-3}$  mmol L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>;  $1 \times 10^{-3}$  mmol L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>;  $1 \times 10^{-4}$  mmol L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>;  $1 \times 10^{-3}$  mmol L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>;  $5 \times 10^{-6}$  mmol L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> e 0.1 mmol L<sup>-1</sup> Fe-EDTA em pH 6.0). Na solução 50% N e 10% N foram utilizados, respectivamente, 1,0 mmol L<sup>-1</sup> e 0,2 mmol L<sup>-1</sup> de Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, a concentração de N foi de 5 e 10 vezes menor do que em 100% N, e Ca<sup>2+</sup> foi compensado pela adição de CaCl<sub>2</sub>. Os outros nutrientes foram adicionados na mesma concentração que na condição 100% N.

A avaliação foi realizada 28 dias após a semeadura estimando a massa seca da parte aérea e massa seca de raiz. Os isolados com melhor desempenho em casa de vegetação seguiram para avaliação em campo para a validação dos resultados e confirmação do potencial de promoção de crescimento vegetal em culturas cultivadas.

### 3.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

A identificação dos isolados LEBA 162, LEBA 168, LEBA 185 e LEBA 189 foi realizada a partir do sequenciamento do gene ribossomal 16S. Para tanto, foi extraído o DNA genômico do isolado utilizando o kit de extração PureLink™

Microbiome DNA Purification kit (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). A integridade do DNA foi verificada por meio de gel de agarose a 1% e o DNA quantificado por espectrofotometria no NanoDrop 2000/2000c (ThermoFisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA).

Para amplificação da região do gene DNAr 16S foi utilizado o primer específico com a seguinte sequência: Fd1 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3' e Rd 5'TACGGYTACCTTGTACGACTT3', descrito por Weisburg et al (1991). A reação de amplificação foi performada utilizando 10ng de DNA, 7,5uL de GoTaq® Green Master Mix (Promega, Winchester, USA), 10 µM de primer forward e reverse e 10% de DMSO (dimetilsufóxido) e água ultrapura para completar o volume final de 25uL. Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo utilizando como controle um marcador (ladder) de peso molecular conhecido (1kb, Ludwig Biotechnology, Rio Grande do Sul-BR), para confirmar tamanho esperado do fragmento. Em seguida a amostra foi purificada com acetato de amônio 7,5M.

A reação de sequenciamento foi realizada em um volume de 10 µL contendo 2,33 µL de tampão (5x), 10 µM de forward primer, 1,0 µL de bigdye (BigDye® terminator cycle sequencing ready reaction kit; Perkin-Elmer Applied Biosystems, Calif. rnia-USA), 1 µL do produto de amplificação purificado e água ultrapura até 10 µL. A reação foi repetida e realizada separadamente para o primer reverso. As condições usadas para a reação de sequenciamento seguiram o padrão de amplificação recomendado pela fabricante do sequenciador, Applied Biosystem. A precipitação dos produtos amplificado ocorreu pela adição de 2,5 µL de EDTA (125 mM) e 30 µL de etanol a 100%. Em seguida as amostras foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente, precipitadas por centrifugação a 3000 ×g por 30 min (4°C), lavadas com 30 µL de etanol (70%) e secas a 95°C por 30 segundos. Para o sequenciamento as amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida Hi-Di, desnaturadas a 95°C por três minutos, imediatamente incubadas em gelo e submetidas à eletroforese capilar no sistema automatizado 3500 xL (Applied Biosystems, Califórnia-USA).

#### 3.4.1 Identificação da espécie e Construção das Árvores Filogenéticas

A identificação foi realizada utilizando a ferramenta online BLASTn

seguindo os parâmetros padrões. Para a alocação filogenética das cepas e confirmação das respectivas espécies foi construída uma árvore filogenética para cada cepa com sequências de oito isolados compiladas do banco de dados GenBank. As espécies utilizadas para a construção correspondem as espécies representativas do grupo *B. cereus* o qual o isolado pertence. As espécies e o número do acesso podem ser visualizados nas Figuras 2 a 5. Também foi utilizado um acesso da espécie *Bacillus subtilis* como outgroup para enraizamento da árvore. A chamada de bases e a montagem da sequência contigs das cepas foram realizadas por meio do softwares BioEdit v.7.2 (HALL *et al.* 2011). O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o algoritmo MUSCLE e ajustado manualmente. A árvore filogenética foi construída baseada no método Neighbor-joining proposto por Saitou e Nei (1987). A distância evolutiva foi computada utilizando o Maximum Composite Likelihood method (TAMURA *et al.*, 2004). A proporção dos sítios de substituição de base foi considerada em pelo menos 1 base e presente em pelo menos 1 sequência. Todas as análises evolutivas foram conduzidas no software MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018; STECHER *et al.*, 2020)

### 3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL EM CAMPO

Foram selecionados quatro isolados que apresentaram maior efeito sobre o crescimento vegetal no experimento realizado em ambiente protegido. O delineamento realizado foi de blocos inteiramente casualizados, consistindo em 14 tratamentos e quatro repetições (Tabela 3), na qual cada parcela foi formada por 5 linhas de 5 metros, totalizando 11m<sup>2</sup>. Os isolados foram inoculados e avaliados individualmente e em pares e os controles: Rizospirillum<sup>®</sup>, Controle sem inoculação com adubação de 30%N, 50% N e 100% N.

Tabela 3. Tratamentos selecionados para avaliação do potencial como promotor de crescimento em milho cultivado em campo.

TRATAMENTOS	ISOLADOS
1	LEBA 189
2	LEBA 168
3	LEBA 185
4	LEBA 162
5	LEBA 189 x LEBA 168
6	LEBA 189 x LEBA 185
7	LEBA 189 x LEBA 162
8	LEBA 168 x LEBA 185
9	LEBA 168 x LEBA 162
10	LEBA 185 x LEBA 162
11	<i>Rizospirillum</i> ®
12	Controle 30% N
13	Controle 50% N
14	Controle 100% N

O experimento foi realizado na primeira safra de milho do ano agrícola 2020/2021, utilizando o mesmo híbrido (30F53 VYHR) avaliado em condições de ambiente protegido. Os ensaios experimentais foram conduzidos em quatro municípios do estado do Paraná: Entre Rios, Guarapuava, Londrina e Maringá, cujas características químicas estão apresentadas na Tabela 4. Em todos os tratamentos foram aplicados 21 Kg ha<sup>-1</sup> de N na semeadura utilizando o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. A adubação de cobertura foi realizada no estádio V4, onde a dose total consistiu em 135 Kg ha<sup>-1</sup> de N na forma de ureia. Os tratamentos inoculados com isolados bacterianos e o controle com *Rizospirillum*® e 30% N receberam dose proporcional a 30% da cobertura e, os controles de 50 e 100% N receberam metade e a dose inteira, respectivamente.

Tabela 4. Características químicas dos solos nos quatro ambientes nos quais foram

Município	pH CaCl <sub>2</sub>	P mg/dm <sup>3</sup>	cmolc/dm <sup>3</sup>						M.O.	V%
			K	Ca	Mg	Al+H	Al	CTC		
Entre Rios	4,7	20,0	0,62	4,8	1,7	4,33	0,2	11,4	28,8	62,0
Guarapuava	4,5	7,0	0,32	2,1	0,6	5,49	0,9	8,5	41,5	35,5
Londrina	5,2	22,6	0,76	5,4	1,6	3,26	0,1	11,0	27,5	70,4
Maringá	5,2	10,7	0,49	2,9	1,3	3,17	0,0	7,9	17,9	59,8

avaliados o potencial de promoção de crescimento dos isolados bacterianos.

Foram avaliadas as três linhas centrais de cada parcela, desconsiderando as laterais e os tratamentos foram classificados quanto ao estande de plantas, altura de plantas, altura da inserção da primeira espiga e produtividade de grãos. O teor de nitrogênio na parte aérea da planta e grãos foi analisado pelo método de Kjehdal (LANG, 1958) e foram estimados também a eficiência de uso do nitrogênio, que é a relação produtividade de grãos/dose de N aplicada ao solo, e seus componentes: produtividade de grãos/quantidade de N na planta (eficiência de utilização), N total na planta/quantidade de N aplicada ao solo (eficiência de absorção) segundo metodologia descrita por Moll *et al.* (1982), de acordo com a seguinte fórmula:

$$EUN = \left( \frac{NTPA}{ND} \right) \times \left( \frac{MSPA}{NTPA} \right) \quad \text{Ou} \quad EUN = (EA) \times (EU)$$

Em que:

EUN é a eficiência do uso do nitrogênio;

NTPA é o nitrogênio total da parte aérea;

ND é a quantidade total nitrogênio disponibilizada; e

MSPA representa a massa seca da parte aérea.

### 3.6 ANÁLISE DE DADOS

Os dados de casa de vegetação e campo foram submetidos a análise de variância e, posteriormente ao teste de agrupamento de médias Scott-Knott (1974) a 5% de significância. Para os dados de campo, foram realizados a análise de correlação Pearson, componentes principais (PCA) e agrupamento hierárquico Ward (WARD, 1963) por meio da distância euclidiana com média padronizada.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R (<http://www.r-project.org>) por meio dos pacotes FactoMineR (LE *et al.*, 2008), heatmaply (GALILI *et al.*, 2018) e ggplot2 (WICKHAM, 2016).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PROSPECÇÃO E ISOLAMENTO

Na prospecção foram isoladas 397 cepas bacterianas na rizosfera entre os três meios de cultura e quatro locais avaliados. Destes, 112 foram do solo de Rio Verde – GO, 78 de Dourados – MS, 84 de Maracaju – MS, 44 de Campo Verde – MT e 70 de Londrina – PR. O meio de cultura Ágar Nutriente foi o mais eficiente para o crescimento das bactérias presentes na diluição seriada da rizosfera, sendo que 206 cepas foram isoladas do meio AN, 172 do meio LB e apenas nove no meio de cultura NBRIP (Tabela 5). Todas as colônias isoladas foram testadas em meio de cultura MYP seletivo para bactérias do grupo *Cereus*, dos 397 isolados, 115 mostraram reação positiva, caracterizando bactérias da espécie *Bacillus cereus* e foram descartadas das avaliações posteriores.

Da coleção obtida, foram selecionados 89 isolados com base na morfologia da colônia, selecionando cepas com características de *Bacillus pseudomycooides* e *Paenibacillus*, de forma a explorar a diversidade de espécies ainda não estudadas dentro do gênero *Bacillus*.

Tabela 5. Número de isolados microbianos obtidos de acordo com cada região amostrada e meio de cultura utilizado.

Meio de cultura	Local				
	GO	MS1	MS2	MT	PR
AN	64	46	41	24	31
LB	46	29	43	19	35
NBRIP	2	3	0	0	4

GO: Rio verde – Go; MS1: Dourados – MS; MS2: Maracaju – MS; MT: Campo Verde – MT; PR: Londrina – PR. AN: Ágar-nutriente; LB: Luria Bertani agar; NBRIP: *National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium*.

### 4.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

Para a caracterização de bactérias fixadoras de nitrogênio em meio NFb de forma qualitativa, foram identificados 56 isolados com potencial de fixação

biológica de nitrogênio. Os isolados foram classificados quanto ao seu potencial de FBN em meio NFb de acordo com o período do crescimento observado em meio de cultura, sendo que isolados que apresentaram crescimento dentro de 48 horas foram classificados como ++ e isolados que apresentaram crescimento 7 dias após a inoculação foram classificados como + (Tabela 6).

Tabela 6. Classificação de isolados bacterianos de acordo com a avaliação de capacidade de fixação biológica de nitrogênio em meio NFb.

ISOLADOS BACTERIANOS					
LEBA 104	+	LEBA 134	+	LEBA 165	+
LEBA 105	++	LEBA 137	+	LEBA 166	++
LEBA 106	++	LEBA 138	++	LEBA 168	++
LEBA 107	++	LEBA 140	+	LEBA 172	+
LEBA 108	+	LEBA 142	+	LEBA 173	++
LEBA 109	+	LEBA 143	+	LEBA 174	++
LEBA 110	++	LEBA 145	+	LEBA 175	+
LEBA 112	+	LEBA 147	+	LEBA 176	++
LEBA 113	++	LEBA 148	+	LEBA 179	++
LEBA 114	+	LEBA 149	+	LEBA 180	+
LEBA 115	+	LEBA 150	++	LEBA 181	+
LEBA 117	+	LEBA 151	+	LEBA 183	+
LEBA 118	++	LEBA 152	+	LEBA 184	++
LEBA 122	+	LEBA 154	+	LEBA 185	++
LEBA 123	++	LEBA 156	+	LEBA 186	+
LEBA 125	++	LEBA 157	++	LEBA 187	++
LEBA 127	+	LEBA 160	+	LEBA 188	++
LEBA 128	+	LEBA 161	++	LEBA 189	++
LEBA 132	+	LEBA 162	++		

+: crescimento dentro de 48 horas após a inoculação;

++: crescimento 7 dias após a inoculação.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO

Dentre os isolados com potencial de fixação de nitrogênio, foram selecionados 12 para avaliação do potencial de crescimento vegetal conduzido em ambiente protegido. Com base na análise de variância, foi observado efeito significativo para fonte de variação tratamentos para as características massa seca de raiz e de parte aérea (MSR e MSPA, respectivamente). Os tratamentos com

inóculos de LEBA 189, 168, 185 e 162 diferiram os significativamente dos demais em relação a MSR (Tabela 7). Os tratamentos foram superiores também aos controles inoculado com Rizospirillum®, e com adubação de 10%N e 50%N.

Para massa seca da parte aérea, o maior valor obtido foi verificado para dose 100%N, seguido pela dose 50%N. Não foi observado diferenciação dos isolados em relação ao tratamento controle (10%N), exceto para os isolados LEBA 174 e LEBA 125, no qual, apresentaram os menores valores em relação aos demais tratamentos.

Tabela 7. Teor de massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR) após 28 dias de inoculação com isolados de *Bacillus spp.* em casa de vegetação.

Tratamentos	Características	
	MSR	MSPA
LEBA-UEL 189	1,7175 a	0,7681 c
LEBA-UEL 168	1,9924 a	0,7866 c
LEBA-UEL 185	1,7719 a	0,7345 c
LEBA-UEL 162	1,8831 a	0,7065 c
LEBA-UEL 174	1,3903 b	0,6197 d
LEBA-UEL 157	1,0197 b	0,7470 c
LEBA-UEL 166	1,0399 b	0,7677 c
LEBA-UEL 113	1,3265 b	0,6847 c
LEBA-UEL 150	1,2930 b	0,8292 c
LEBA-UEL 188	1,0133 b	0,7467 c
LEBA-UEL 125	1,1309 b	0,5645 d
LEBA-UEL 187	1,0795 b	0,7165 c
Rizospirillum®	1,4595 b	0,6926 c
10% N	1,4111 b	0,7183 c
50% N	1,2308 b	0,9131 b
100% N	1,5920 a	1,1437 a

Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferiram significativamente pelo teste de Scott-Knott (5%)

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Os resultados da identificação molecular obtidos com base na sequência do gene 16S, somados a análise filogenética da região gênica permitiu a identificação das espécies das cepas LEBA 162, LEBA 168, LEBA 185 como *Bacillus pseudomycooides*. Por sua vez, a cepa LEBA 189 foi alinhada com a espécie *Bacillus amyloliquefaciens*. Porém, é importante ressaltar que o gene ribossomal 16S pode permitir apenas a identificação do isolado como pertencente ao grupo *B. cereus* e *B.*

*subtilis*, mas não pode afirmar com acurácia a correta espécie justamente pela sua baixa variação dentro do grupo.

Esta identificação foi realizada utilizando a ferramenta online BLASTn seguindo os parâmetros padrões. A filogenia obtida com base no conjunto de dados concatenados da região juntamente com dados representativos do grupo confirmou a análise preliminar. Foi construída uma árvore filogenética utilizando sequências compiladas de oito acessos do GenBank de espécies representativas do complexo *B. cereus* e uma espécie como *outgroup* (*Bacillus subtilis*) para cada uma das cepas analisadas (Figuras 2 a 5).

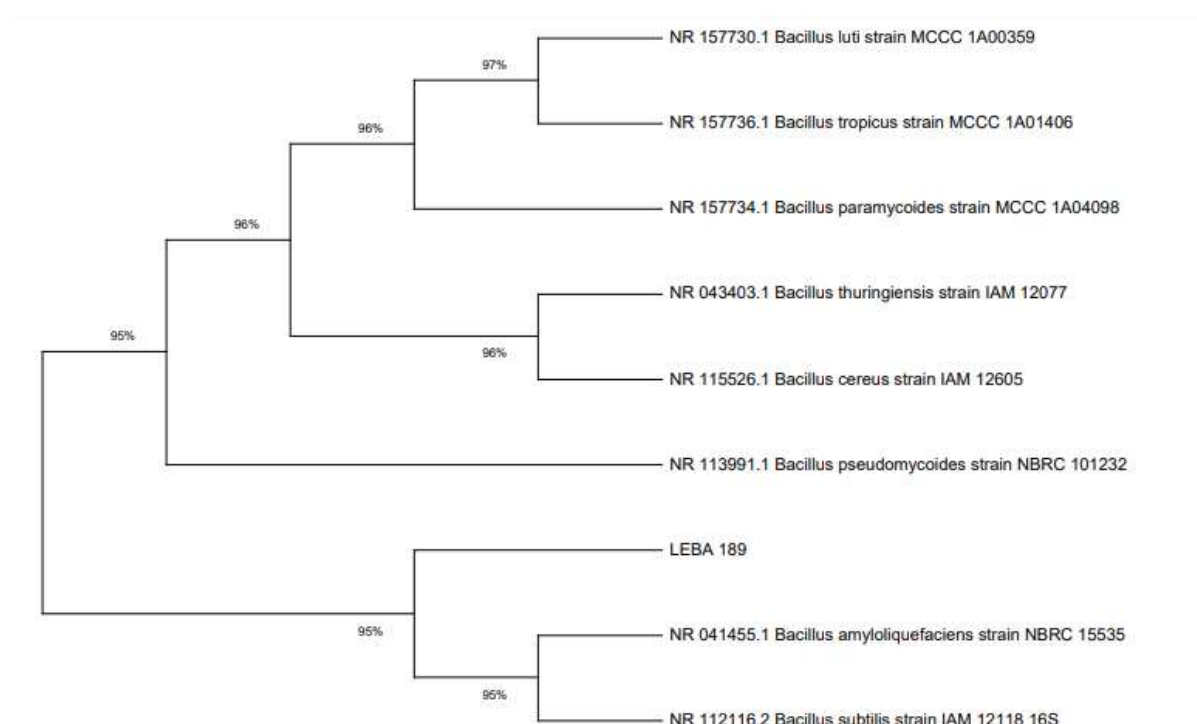


Figura 2. Filograma gerado a partir da sequência do gene ribossomal 16S da cepa LEBA 189 das espécies representativas do grupo. As porcentagens nos ramos mostram a confiabilidade (bootstrap) da análise. A barra de escala (0,07) mostra o número de substituições por sítio. A árvore foi enraizada com o outgroup *B. subtilis*.

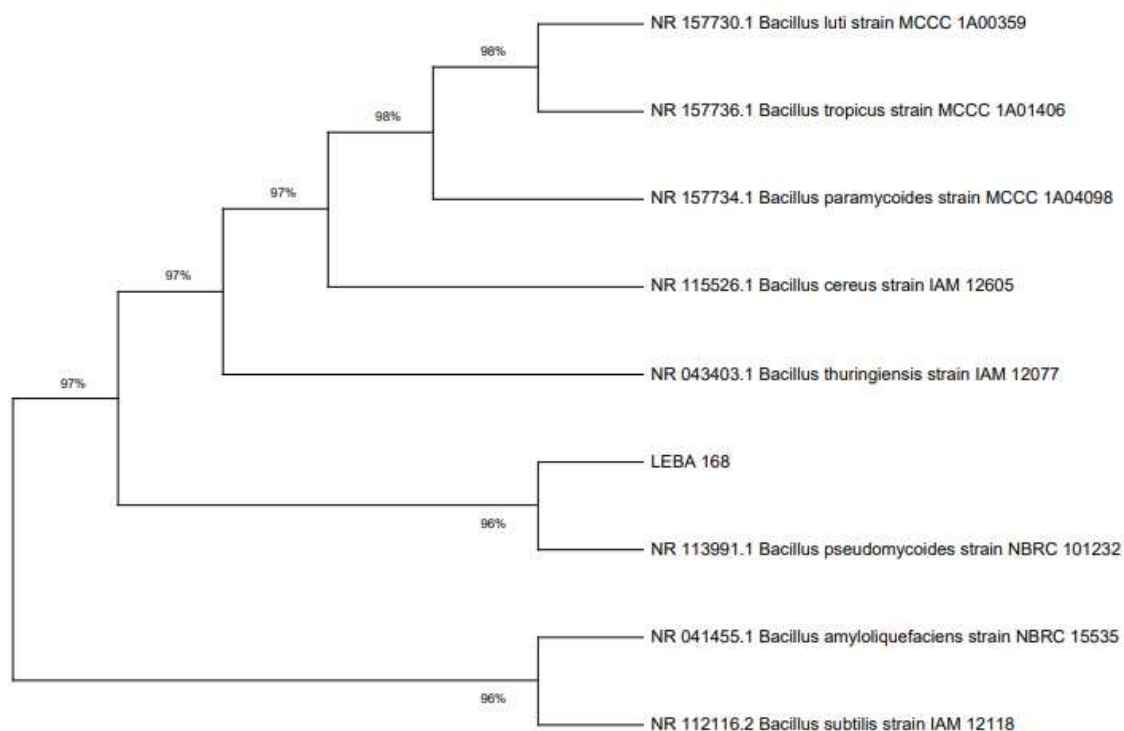


Figura 3. Filograma gerado a partir da sequência do gene ribossomal 16S da cepa LEBA 168 das espécies representativas do grupo. As porcentagens nos ramos mostram a confiabilidade (bootstrap) da análise. A barra de escala (0,07) mostra o número de substituições por sítio. A árvore foi enraizada com o outgroup *B. subtilis*.

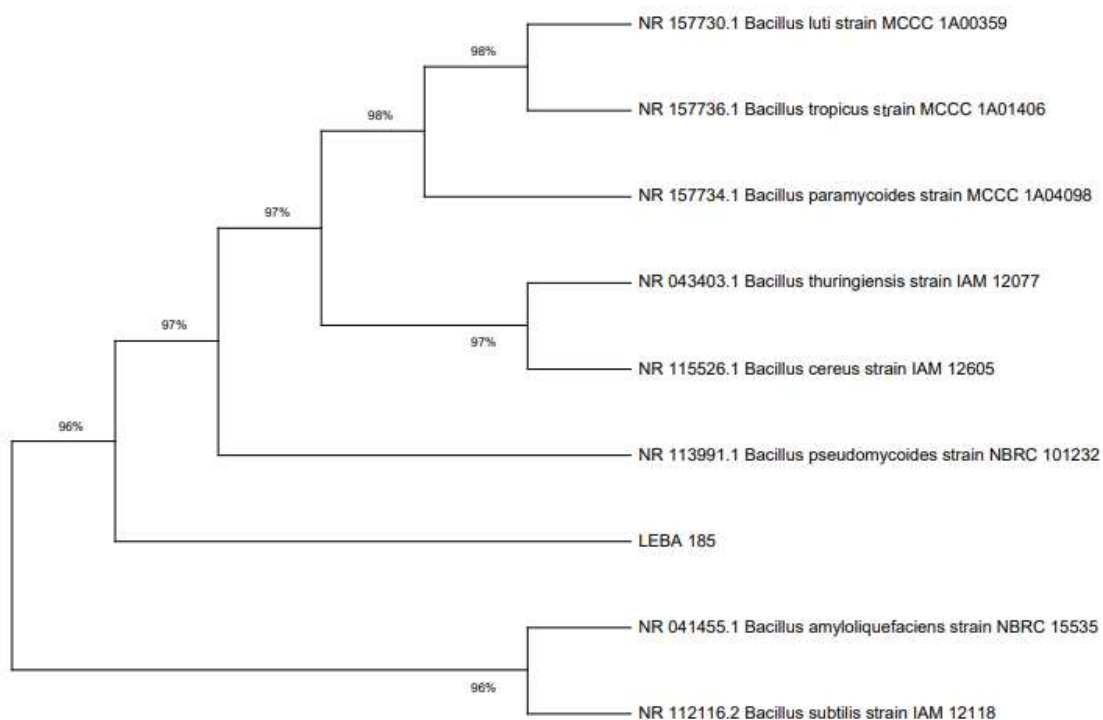


Figura 4. Filograma gerado a partir da sequência do gene ribossomal 16S da cepa LEBA 185 das espécies representativas do grupo. As porcentagens nos ramos mostram a confiabilidade (bootstrap) da análise. A barra de escala (0,07) mostra o

número de substituições por sítio. A árvore foi enraizada com o outgroup *B. subtilis*.

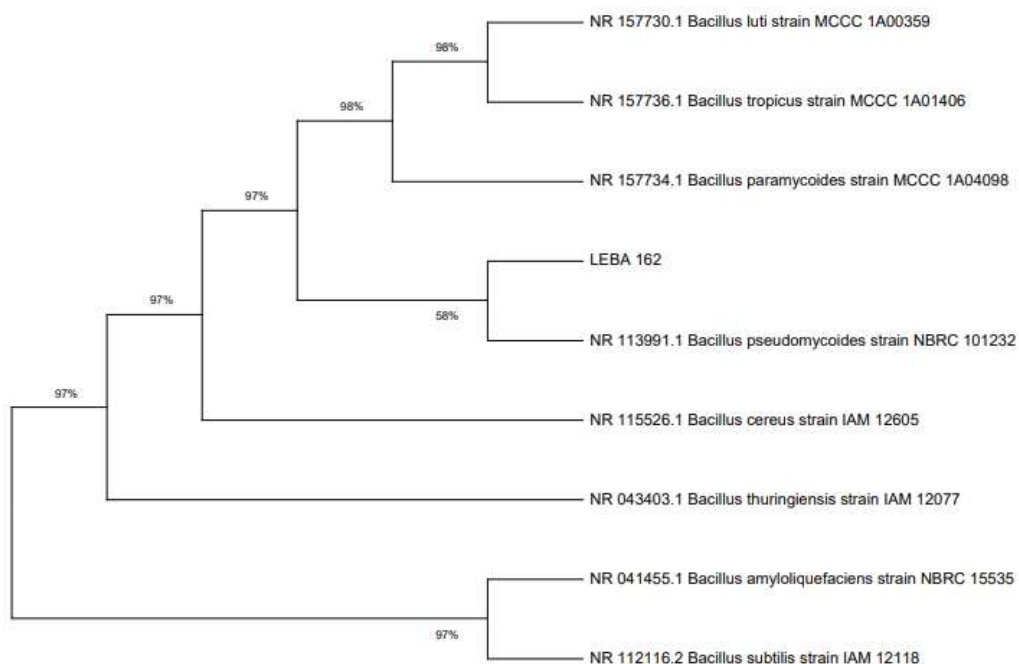


Figura 5. Filograma gerado a partir da sequência do gene ribossomal 16S da cepa LEBA 162 das espécies representativas do grupo. As porcentagens nos ramos mostram a confiabilidade (bootstrap) da análise. A barra de escala (0,07) mostra o número de substituições por sítio. A árvore foi enraizada com o outgroup *B. subtilis*.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL EM CAMPO

De acordo com a análise de variância, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para as variáveis de produtividade, altura de planta, altura de espiga, e eficiência de utilização do nitrogênio (Tabela 8). No entanto, o efeito de um tratamento sobre os demais pode ser encoberto, sendo necessário o desdobramento dos fatores para cada ambiente de experimentação.

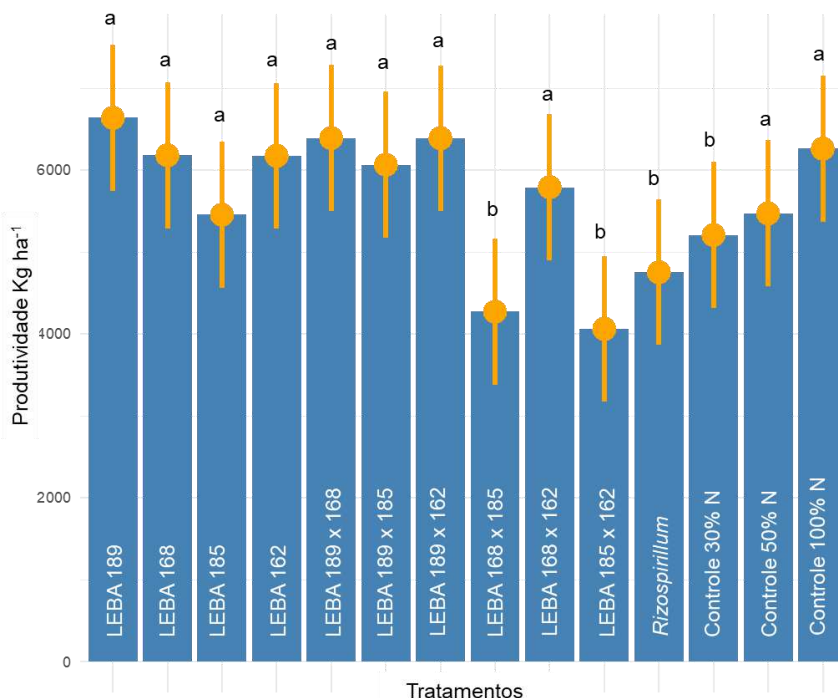
Tabela 8. Análise de variância (ANOVA) das características produtividade, altura de planta e espiga e eficiências de absorção, utilização e uso do nitrogênio de tratamentos submetidos à inoculação com *B. pseudomycooides* e *B. amyloliquefaciens* avaliados em quatro ambientes.

FV	GL	QM					
		PROD	ALTP	ALTE	EAN	EUtN	EUN
BLOCOS/AMB	12	1380963.16	0.0262	0.01583	1057.073	3.27803	12389.658
BLOCOS	3	203111.0407	0.0245	0.01147	329.030	2.04715	7981.052
BLOCOS X AMB	9	1773580.534	0.0268	0.01799	1299.754	3.68832	13859.193
TRAT	13	903047.8825 ns	0.017 ns	0.00812 ns	3808.925**	2.1769 ns	56041.099**
AMBIENTE	3	343765258.6355**	6.591**	2.84531**	25941.406**	25.8874**	262795.601**
TRAT X AMB	39	1441750.7175**	0.016 ns	0.00791 ns	481.811 ns	1.54709 ns	6536.730*
TRAT/AMB	52	1307075.0087*	0.0165	0.00813	1313.589*	1.70454	18912.822*
TRAT/AMB 1	13	1322618.3530	1.4855	0.00551	1323.435*	0.85945	15809.523*
TRAT/AMB 2	13	759766.0115	1.1267	0.01035	891.976*	2.21477	12719.994*
TRAT/AMB 3	13	472875.2365	0.4737	0.00664	2508.034*	0.75486	32790.007*
TRAT/AMB 4	13	2673040.4339*	0.0208	0.00998	530.911	2.9891*	14331.819*
RESÍDUO	156	793481.241	0.0147	0.00608	495.338	1.5377	4337.118
TOTAL	223	-	-	-	-	-	-
MÉDIA	-	7.225.120	2.292	1.384	65.924	4.150	253.112
CV	-	12.328	5.29%	5.63	33.759996	29.879637	26.018810

\*: significativo em nível de 5% de probabilidade em modelo Scott-Knott.

Pelo desdobramento dos tratamentos frente as variações dos ambientes, foi observado que o ambiente Maringá foi significativo (Figura 6). Para a análise da eficiência de absorção de nitrogênio (EAN), foram observados efeitos dos tratamentos para os ambientes Entre Rios, Guarapuava e Londrina. A análise da eficiência de uso de nitrogênio (EUN) se mostrou significativa para todos os ambientes.

Figura 6. Médias de produtividade obtida no ambiente Maringá submetidos à inoculação de isolados de *Bacillus pseudomycooides* e *B. amyloliquefaciens* em condições de baixa dose de nitrogênio e os controle com as doses 30%N, 30%N + inoculação com Rizospirillum®, 50%N e 100%N.



\*Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferiram significativamente pelo teste de Scott-Knott (5%).

No ambiente de Maringá os tratamentos LEBA 189, 168, 185, 162, 189x168, 189x185 189x162 e 168x162 obtiveram as maiores produtividades e diferiram do controle 30%N. Esses tratamentos obtiveram um incremento médio de 20% em relação a produtividade do controle 30%N.

Em relação à eficiência de absorção de nitrogênio, essa foi significativa em Entre Rios e Londrina apenas para os controles de 50 e 100%. Em Guarapuava o tratamento 1 (LEBA 189), apresentou menor eficiência comparado aos demais (Tabela 9). Para a eficiência da utilização de nitrogênio, os controles com doses de 50 e 100% de nitrogênio diferiram de todos os tratamentos inoculados, levando em consideração a maior adubação quando comparados aos demais. Apenas em Maringá houve diferença significativa de EUN dos tratamentos inoculados comparado ao controle com a mesma dose (30%). No município de Entre Rios, os isolados LEBA 185, 162 e a combinação 168x185 apresentaram menor EUN, assim como o tratamento controle com a cepa comercial Rizospirillum®.

Tabela 9. Eficiência de aquisição (EAN) e uso (EUN) do nitrogênio nos quatro ambientes de experimentação avaliados em 10 tratamentos em condições de baixa dose de nitrogênio e os controle com as doses 30%N, 30%N + inoculação com *Azospirillum brasilense*, 50%N e 100%N.

ISOLADOS	EAN (mg mg <sup>-1</sup> )			EUN (mg mg <sup>-1</sup> )			
	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A4
LEBA 189	75.813 a	36.267 b	100.726 a	278.182 a	171.867 a	451.440 a	284.956 a
LEBA 168	97.583 a	56.998 a	116.436 a	331.339 a	220.585 a	390.946 a	274.622 a
LEBA 185	76.372 a	52.858 a	109.934 a	232.042 b	195.228 a	413.786 a	267.284 a
LEBA 162	73.129 a	47.743 a	83.868 a	214.903 b	198.449 a	376.406 a	246.959 a
189x168	61.020 a	60.121a	110.294 a	260.380 a	201.319 a	380.384 a	281.161 a
189x185	82.177 a	64.638 a	97.832 a	296.434 a	219.679 a	325.125 a	260.562 a
189x162	90.974 a	69.834 a	104.086 a	304.003 a	213.429 a	345.800 a	210.951 a
168x185	72.666 a	51.089 a	89.449 a	229.017 b	265.306 a	315.561 a	225.743 a
168x162	76.889 a	57.356 a	122.698 a	285.644 a	170.850 a	413.420 a	159.945 b
185x162	78.995 a	68.693 a	83.641 a	312.311 a	171.129 a	367.466 a	253.315 a
<i>Rizospirillum</i>	61.193 a	72.336 a	110.063 a	219.320 b	277.224 a	417.672 a	233.927 a
Cont 30% N	67.515 a	58.981a	100.310 a	265.603 a	191.961 a	369.364 a	191.495 b
Cont 50% N	50.826 b	34.994 b	61.672 b	185.267 b	118.122 b	213.923 b	149.190 b
Cont 100% N	23.040 b	19.690 b	26.401 c	87.926 c	51.257 b	106.485 c	77.604 b

A1: Entre Rios; A2: Guarapuava; A3: Londrina; A4: Maringá. \*Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferiram significativamente pelo teste de Scott-Knott (5%).

De acordo com o gráfico de correlação, produtividade apresentou uma correlação moderada a elevada com os demais parâmetros avaliados (>0.6), exceto para EUN. As eficiências de aquisição e uso do nitrogênio apresentam também elevada correlação entre si (0.89), uma vez que EUN é diretamente dependente da EAN (Figura 7). A eficiência de utilização de nitrogênio (EUN) apresentou correlação negativa com todas as variáveis analisadas, ou seja, EUN é inversamente proporcional a EAN e EUN e os parâmetros de produtividade, altura de planta e espiga.

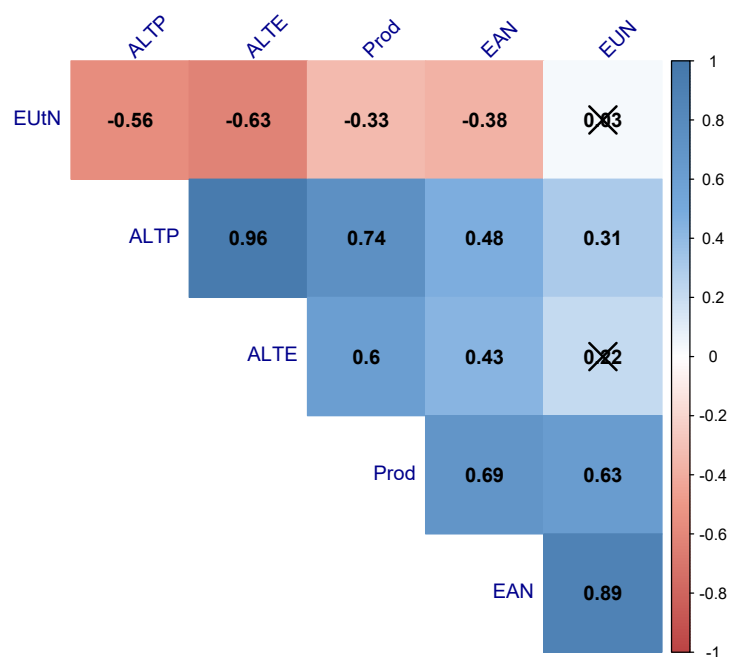
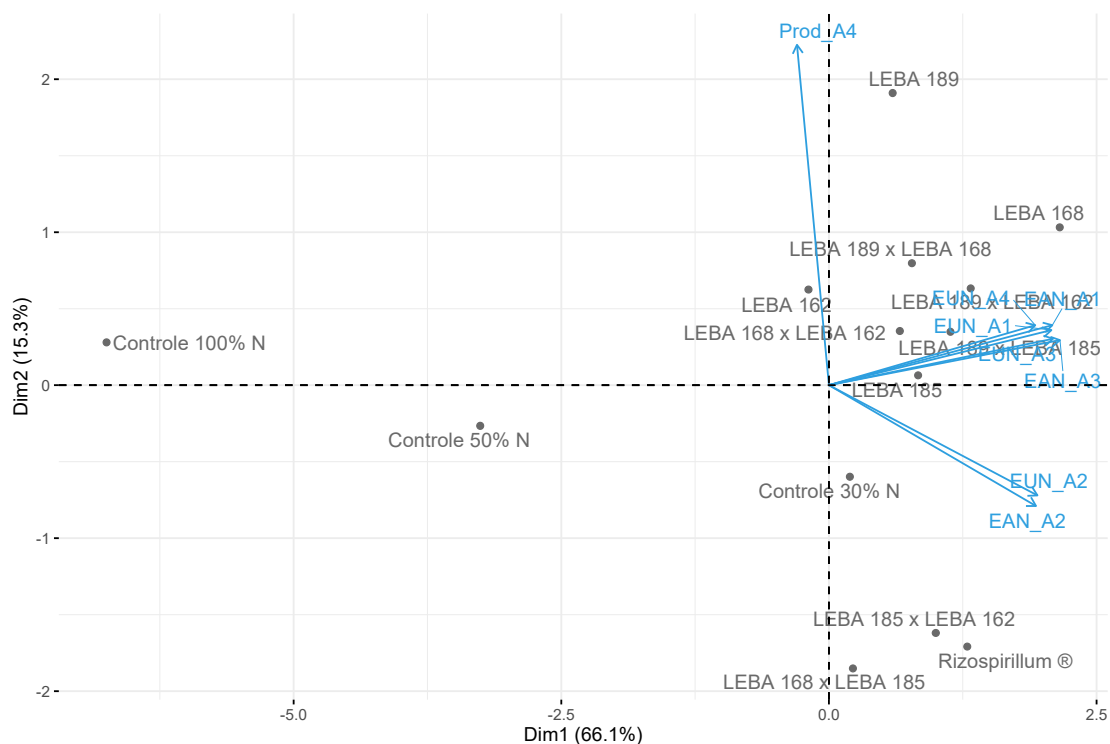


Figura 7. Análise de correlação dos parâmetros avaliados: Altura de planta, altura de espiga, produtividade, eficiência de aquisição de nitrogênio, eficiência de utilização e eficiência de uso de nitrogênio em quatro ambientes de experimentação avaliados em 10 tratamentos em condições de baixa dose de nitrogênio e os controle com as doses 30%N, 30%N + inoculação com *Azospirillum brasilense*, 50%N e 100%N.

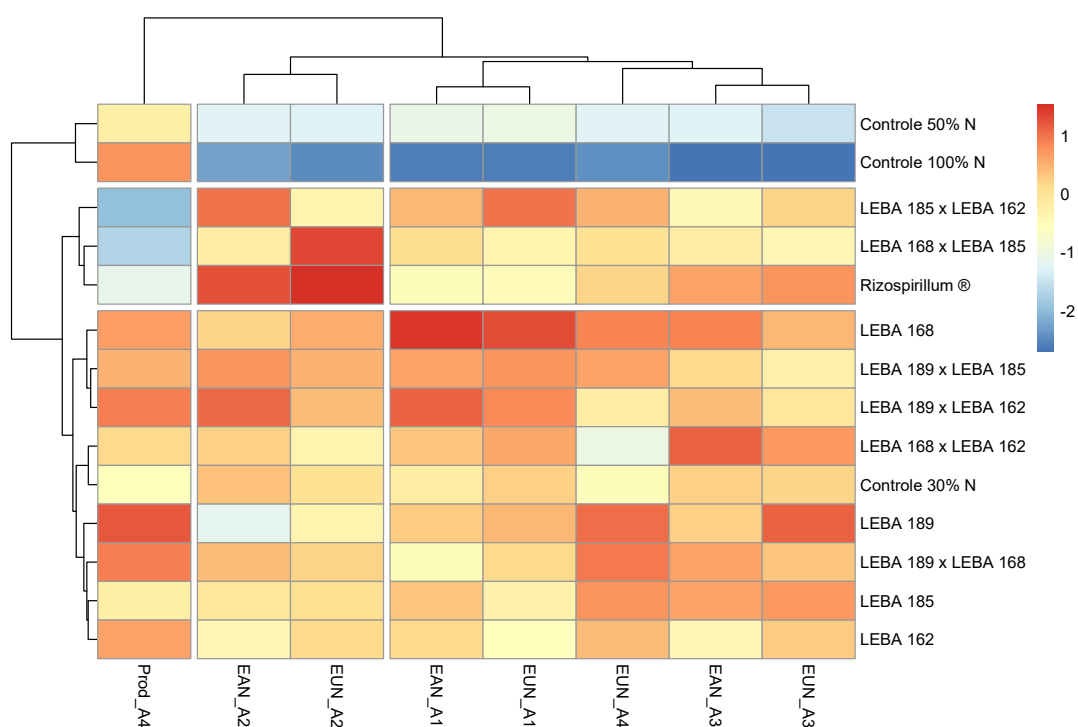
Na análise de componentes principais (PCA), os dois primeiros componentes explicaram 66,1 e 15,3% da variação total, respectivamente (Figura 8). Com base no gráfico bidimensional, foi observado a formação de três grupos, associando os parâmetros de produtividade, EAN e EUN dos respectivos ambientes de significância. O isolado LEBA 189 se destaca por maior produtividade no A4 e, junto com o isolado 162, 168 e as associações 189x168, 168x162, se destacam também por maiores EAN e EUN no mesmo ambiente. Os controles 50%N e 100%N diferiram dos demais tratamentos.



A1: Entre Rios; A2: Guarapuava; A3: Londrina; A4: Maringá.

Figura 8. Análise de componentes principais (PCA) das características de produtividade (A4), eficiência de aquisição (EAN) (A1, A2, A3) e eficiência no uso do nitrogênio (EUN) (A1, A2, A3, A4) nos respectivos ambientes, avaliados em 10 tratamentos em condições de baixa dose de nitrogênio e os controle com as doses 30%N, 30%N + inoculação com *Azospirillum brasilense*, 50%N e 100%N.

Na análise de agrupamento hierárquico, assim como na análise PCA, é possível constatar a formação de três grandes grupos (Figura 9). O primeiro é formado pelos controles 50% e 100% N, com baixa EAN e EUN para todos os ambientes e com as maiores produtividades. O segundo grupo é formado pelas associações LEBA 185X162 e 168X185, que se destacam principalmente pelo desempenho em EAN e EUN no ambiente 2, sendo o Rizosporillum® o de maior EUN. O terceiro grupo foi formado pelos demais tratamentos, além do controle de 30%N, estes apresentaram desempenho médio para todas as variáveis, com destaque para o isolado 189 que apresentou maior produtividade em A4 e o isolado 168 com maior EAN e EUN em A1.



A1: Entre Rios; A2: Guarapuava; A3: Londrina; A4: Maringá.

Figura 9. Agrupamento hierárquico das características de produtividade (Maringá), eficiência de aquisição (EAN) (Entre Rios, Guarapuava e Londrina) e eficiência no uso do nitrogênio (EUN) (Entre Rios, Guarapuava, Londrina e Maringá) nos respectivos ambientes, avaliados em 10 tratamentos em condições de baixa dose de nitrogênio e os controles com as doses 30%N, 30%N + inoculação com *Azospirillum brasilense*, 50%N e 100%N.

## 5 DISCUSSÃO

Na prospecção da comunidade microbiana na rizosfera de solos agrícolas utilizados neste estudo, foram obtidos maior número e diversidade de isolados de solos com maior teor de matéria orgânica do solo. Essa população pode ser influenciada pelas características físico-químicas do solo e, também, por meio da interação com as espécies cultivadas (BERG e SMALLA, 2009). Fatores como a relação carbono nitrogênio, textura, pH e teor de nutrientes como N, P e Fe podem contribuir com o aumento da diversidade microbiana no solo ou ainda, favorecer ou não a permanência de determinadas espécies no ambiente (LIU *et al.*, 2020).

No que se refere ao potencial das espécies como promotoras de crescimento vegetal, os resultados observados neste estudo constataram o potencial de *Bacillus pseudomycooides* e *Bacillus amyloliquefaciens* na promoção de crescimento de plantas de milho em condições de ambiente controlado. Embora resultados positivos foram observados em experimentos em casa de vegetação, quando testados em condições de campo, os tratamentos inoculados com as bactérias em estudo apresentaram, de forma geral, instabilidade e não tiveram efeito no incremento da produtividade. De acordo com Vidotti *et al.* (2019), o estabelecimento da associação planta-BPCV envolve mecanismos complexos onde diferentes fatores relacionados à base genética da planta hospedeira e da bactéria, o ambiente de cultivo e condições do solo, desempenham um papel crucial na regulação dessa associação. Monteiro *et al.* (2012), Martins *et al.* (2018) e Ikeda *et al.* (2020) também constataram que a habilidade dos isolados em promover o crescimento de plantas é dependente da interação entre genótipos x isolado x ambiente. Aliado à tais fatores, também deve ser considerado a capacidade de competição dos isolados inoculados no solo com a comunidade microbiana nativa. Bashan *et al.* (2014) afirma que a eficiência de competição do isolado bacteriano com a microbiota do solo e a tecnologia de aplicação adequada são um dos principais fatores que determinam o sucesso da inoculação.

A colonização das raízes pelas cepas presentes nos inoculantes comerciais está intimamente associada aos fatores de qualidade do solo e a capacidade de sobrevivência e competição microbiana dos isolados (SOUZA *et al.*, 2015). Para Lopes *et al.* (2021) fatores como o método de inoculação, densidade do inóculo, colonização radicular, que varia com a multiplicação e distribuição dos

micróbios através da rizosfera, antagonismo microbiano, estado fisiológico da planta, umidade do solo, pH, temperatura, hospedeiro e exsudatos radiculares podem influenciar na eficiência da inoculação, com isso, é comum encontrar inúmeras respostas à inoculação com cepas promissoras, que podem ser resultado do método de inoculação e de fatores abióticos.

As condições do solo modificam a diversidade do microbioma, solos ácidos, com alto índice teor e mineralização de matéria orgânica do solo (MOS) e maior umidade favorece a permanência de populações microbianas, enquanto em solos arenosos, de baixa umidade e teor de MOS, apresentam menor comunidade microbiana nativa (ARAUJO; PEDROSO, 2013; LOPES et al., 2021) Neste trabalho, quando as cepas foram inoculadas em condições de ambiente protegido e substrato arenoso estéril, livre da presença de outros microrganismos, os isolados demonstraram potencial como bactérias promotoras de crescimento vegetal. Em condições de campo, maior eficiência de uso de nitrogênio foi notada apenas em um ambiente, de solo menos argiloso e menor teor de MOS, quando comparado aos demais locais. Esse resultado indica que os isolados inoculados apresentam baixo potencial de competitividade, uma vez que os efeitos como BPCV foram presentes apenas em locais com provável baixa população microbiana nativa.

A cultura e a interação com o ambiente também são fatores determinantes para a colonização de BPCV, uma vez que as raízes das plantas reagem a diferentes condições ambientais através da secreção de uma ampla gama de compostos que interferem na interação planta-bactéria, sendo considerado um fator importante na eficiência dos inoculantes (SOUZA *et al.*, 2015). O mesmo comportamento de ineficiência da inoculação em condições de campo já foi relatado também por Oliveira *et al.* (2006), Babalola (2010) e Bashan *et al.* (2014). Salamone *et al.* (2012) estudando o efeito de isolados de *A. brasilense* e *P. fluorescens* inoculados em alta concentração, também atribuiu a ausência de efeitos na produtividade devido a severa competição entre os microrganismos nativos e as cepas adicionadas.

Em ambiente protegido efeitos positivos no incremento de massa seca de raiz e parte aérea foram observados, apontando que as bactérias inoculadas estimularam o desenvolvimento do sistema radicular, o que possibilitou o aumento da superfície de contato explorada pela planta e, conseqüentemente, maior absorção de água e aquisição de nutrientes pelas mesmas (DI BENEDETTO *et al.*, 2017). Sousa

*et al.* (2021) também observaram o potencial de isolados de *Bacillus* para o crescimento do sistema radicular, onde o aumento da massa seca da raiz, proporcionada pela inoculação de cepas de *Bacillus*, resultou do aumento da área superficial da raiz, e promoveu maior absorção de nutriente e promoção de crescimento nos estágios iniciais da planta. As alterações observadas na arquitetura do sistema radicular pela interação com BPCV, podem resultar dos efeitos de regulação hormonal realizado pelas bactérias (ALONI *et al.* 2006; DODD *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.* 2014).

Em relação aos resultados de eficiência de uso de nitrogênio, onde efeito significativo dos tratamentos foi observado apenas no experimento de Maringá, Oliveira *et al.* (2013) obtiveram resultados similares em cana de açúcar cultivada em solos com diferentes níveis de adubação, onde plantas inoculadas com uma mistura de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas obtiveram maior contribuição de FBN em solos mais pobres, com baixo teor de N. De acordo com Barbosa *et al.* (2022), baixas contribuições de FBN são observadas em solos com alto teor de N. Carvalho *et al.* (2014) atribuiu esse fator a uma consequência do controle do N sobre a atividade da nitrogenase, uma vez que o complexo nitrogenase de bactérias diazotróficas fixa o N<sub>2</sub> apenas sob condições microaeróbicas limitantes de N.

Embora a cepa de *Azospirillum* utilizada nesse trabalho não apresentou resultados positivos de incremento na massa seca e produtividade, esta se mostrou eficaz no aumento da eficiências de uso do nitrogênio na planta em Maringá. De acordo com Barbosa *et al.* (2022), resultados significativos de incremento na produtividade por cepas de *Azospirillum* são observados em casos de baixa produtividade e investimento, sendo que em cultivos com produtividade superior a 3 ton ha<sup>-1</sup> os efeitos observados do inóculo tendem a decrescer significativamente. Calzavara *et al.* (2018) comparou o efeito de *Bacillus* e *Azospirillum* em milho sob diferentes doses de nitrogênio e constatou que ambas as espécies podem contribuir com o crescimento sob condições limitantes de nitrogênio. No entanto, cepas de *Bacillus* apresentam maior potencial para promover o crescimento do milho sob suprimento pleno de N.

A ausência no efeito do tratamento de *Azospirillum* para os demais ambientes evidencia, mais uma vez, os resultados anteriores que relatam a instabilidade desse inoculante. Cassan e Diaz-Zorita (2016) apontam que tais variações nos resultados da inoculação podem ser explicadas pelos diferentes os

métodos de inoculação utilizados e, também, as diversas práticas de manejo de culturas. No entanto, neste trabalho foram seguidos os métodos de inoculação propostos pelo fabricante do produto comercial Rizospirillum®. Díaz-Zorita *et al.* (2012), similar ao colocado anteriormente, relata também que as respostas do milho à inoculação foram maiores sob condições estressantes durante o crescimento inicial das culturas ou na ausência de adubação nitrogenada. Em condições favoráveis ao desenvolvimento da cultura, o efeito da inoculação por *Azospirillum* sp., são menos evidentes.

Zeffa *et al.* (2018) observaram que efeitos da inoculação positiva de *Azospirillum* são significativos somente em condições de baixa concentração de N e não são observados incrementos na produtividade na presença de doses elevadas do nutriente, quando é realizada a adubação de cobertura, isso devido à baixa capacidade de competição de *Azospirillum* frente a comunidade microbiana do solo, o que pode ser corroborado, também, para as cepas estudadas nesse trabalho. Com isso, o estudo da interação cultura x isolado x ambiente se faz necessário para melhor entendimento da influência desses fatores no sucesso da inoculação.

## 6 CONCLUSÃO

Na prospecção de isolados na rizosfera do milho foi observado uma ampla variabilidade dos isolados bacterianos, possibilitando a obtenção de uma coleção de 397 isolados para o estudo;

Os isolados de *Bacillus* selecionados *in vitro* apresentaram efeito de promoção de crescimento vegetal em condições controladas. No entanto, o mesmo efeito não foi observado em condições de campo em virtude das inúmeras interações que podem ter influência no processo de colonização e a baixa capacidade de competição dessas cepas;

O incremento na EUN pelos isolados foi observado apenas no ambiente de Maringá, devido provavelmente às condições de ambiente/solo que favoreceram a colonização dos isolados nesse local.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, D. B.; FRIKHA-GARGOURI, O.; TOUNSI, S. Rhizospheric competence, plant growth promotion and biocontrol efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain 32a. **Biological Control**, v.124, p.61-67, 2018.
- AFZAL, I.; SHINWARI, Z.K.; SIKANDAR, S.; SHAHZAD, S. Plant beneficial endophytic bacteria: mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. **Microbiological research**, 221, pp.36-49, 2019.
- ALI, A.M.; AWAD, M.Y.; HEGAB, S.A.; GAWAD, A.M.A.E.; EISSA, M.A. Effect of potassium solubilizing bacteria (*Bacillus cereus*) on growth and yield of potato. **Journal of Plant Nutrition**, v. 44, n. 3, pp.411-420, 2021.
- ALMEIDA, T.; POCOJESKI, E.; NESI, C.N.; OLIVEIRA, J.P.M.; SILVA, L.S. Eficiência de fertilizante fosfatado protegido na cultura do milho. **Scientia agraria**, v.17, n.1, pp.29-35, 2016.
- ALONI R.; ALONI E.; LANGHANS M.; ULLRICH C. I. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. **Ann. Bot.** v. 97, p. 883–893, 2006.
- ARAUJO, F.F.; PEDROSO, R.A.B. Interação de *Bacillus* sp. com a rizosfera de três espécies de plantas forrageiras. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 1, p. 152-158, 2013.
- ARMADA, E.; PROBANZA, A.; ROLDÁN, A.; AZCÓN, R. Native plant growth promoting bacteria *Bacillus thuringiensis* and mixed or individual mycorrhizal species improved drought tolerance and oxidative metabolism in *Lavandula dentata* plants. **Journal of plant physiology**, v. 192, pp.1-12, 2016.
- ARTUZO, F.D.; FOGUESATTO, C.R.; SOUZA, Â.R.L.D.; SILVA, L.X.D. Costs management in maize and soybean production. **Revista Brasileira de Gestão de Negócios**, 20, pp.273-294, 2018.
- AZEVEDO NETO, A.D.; PRISCO, J.T.; ENEAS, J.; ABREU, C.E.B.; GOMES-FILHO, E. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt sensitive maize varieties. **Environmental and Experimental Botany**, v.56, p.87–94, 2006. doi:10.1016/j.envexpbot.2005.01.008
- BABALOLA, O.O. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnological Letters* 32:1559-1570, 2010.
- BADRI, D.V.; WEIR, T.L.; VAN DER LELIE, D.; VIVANCO, J.M. Rhizosphere chemical dialogues: plant–microbe interactions. **Current opinion in biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 642-650, 2009.
- BADRI, D.V.; VIVANCO, J.M. Regulation and function of root exudates. **Plant, cell & environment**, v. 32, n. 6, p. 666-681, 2009.
- BAI, Y.; ZHOU, X.; SMITH, D.L. Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. **Crop science**, v. 43, n. 5, pp.1774-1781, 2003.
- BARAL, B.R.; ADHIKARI, P. Effect of *Azotobacter* on growth and yield of maize.

**Journal of Agriculture**, v. 11, n. 2, p. 141-147, 2013.

BARBOSA, J. Z.; ALMEIDA ROBERTO, L.; HUNGRIA, M.; CORRÊA, R. S.; MAGRI, E.; CORREIA, T. D. Meta-analysis of maize responses to *Azospirillum brasilense* inoculation in Brazil: Benefits and lessons to improve inoculation efficiency. **Applied Soil Ecology**, v. 170, 104276, 2022.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. **Adv Agron**, v. 108, p.77–136, 2010. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)08002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8)

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.E.; PRABHU, S.R.; HERNANDEZ, J.P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant Soil**, v.378, p.1-33, 2014

BASI-CHIPALU, S.; DISCHINGER, J.; JOSTEN, M.; SZEKAT, C.; ZWEYNERT, A.; SAHL, H.G.; BIERBAUM, G. Pseudomycoicidin, a class II lantibiotic from *Bacillus pseudomycooides*. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 10, pp.3419-3429, 2015.

BLAKE, C.; CHRISTENSEN, M.N.; KOVÁCS, Á.T. Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 34, n. 1, pp.15-25, 2021.

BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere, **FEMS Microbiology Ecology**, v. 68, pp. 1–13, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x>

BERGAMASCHI, H.; MATZENAUER, R. **O milho e o clima**. Porto Alegre: Emater/RS-Ascar, 2014. 84 p.

BOKHARI, A.; ESSACK, M.; LAFI, F.F. et al. Bioprospecting desert plant *Bacillus* endophytic strains for their potential to enhance plant stress tolerance. **Sci Rep**, v. 9, n. 18154, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54685-y>

BORRIS, R. Use of Plant-Associated *Bacillus* Strains as Biofertilizers and Biocontrol Agents in Agriculture. **Bacteria in Agrobiology: Plant Growth Responses**, 41–76, 2011. doi:10.1007/978-3-642-20332-9\_3

BORRIS, R.; CHEN, X.H.; RUECKERT, C.; BLOM, J.; BECKER, A.; BAUMGARTH, B.; KLENK, H.P. Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7T and FZB42T: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genome sequence comparisons. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 61, p. 1786–1801, 2011.

CALZAVARA, A.K.; PAIVA, P.H.G.; GABRIEL, L. C.; OLIVEIRA, A. L. M.; MILANI, K.; OLIVEIRA, H. C.; STOLF-MOREIRA, R. Associative bacteria influence maize (*Zea mays* L.) growth, physiology and root anatomy under different nitrogen levels. **Plant Biology**, v. 20, n. 5, p. 870-878, 2018.

CARVALHO, T.L.G.; BALSEMÃO-PIRES, E.; SARAIVA, R.M.; FERREIRA, P.C.G.; HEMERLY, A.S. Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria, **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 19, p. 5631–5642, 2014. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru319>

CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, pp.117-130, 2016.

CASSÁN, F.; CONIGLIO, A.; LÓPEZ, G.; MOLINA, R.; NIEVAS, S.; DE CARLAN, C.L.N.; DONADIO, F.; TORRES, D.; ROSAS, S.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E. Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. **Biology and fertility of soils**, 2020.

CEPEA - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. **Custos Grãos: Agosto/2021**. ESALQ - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. USP - Universidade de São Paulo, 2021.

CHEN, Q.; SAMAYOA, L.F.; YANG, C.J.; BRADBURY, P.J.; OLUKOLU, B.A.; NEUMEYER, M.A. The genetic architecture of the maize progenitor, teosinte, and how it was altered during maize domestication. **PLoS Genet**, v. 16 n.5:, 2020.

CHOWDHURY, S.P.; HARTMANN, A.; GAO, X.; BORRISS, R. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. **Front. Microbiol.** v.6, n. 780, 2015.

CHOUDHARY, D.K., KASOTIA, A., JAIN, S., VAISHNAV, A., KUMARI, S., SHARMA, K.P. AND VARMA, A. Bacterial-mediated tolerance and resistance to plants under abiotic and biotic stresses. **Journal of plant growth regulation**, v.35, n.1, pp.276-300, 2016.

CHUN, L.; MI, G.; LI, J.; CHEN, F.; ZHANG, F. Genetic analysis of maize root characteristics in response to low nitrogen stress. **Plant and Soil**. v. 276, p. 369–382, 2005.

COELHO, A.M. **Nutrição e adubação do milho**. Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 2006.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669–678, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, - safra 2020/2021**, n.11 - Décimo primeiro levantamento, Brasília, p. 1-108, agosto 2021.

CONTINI, E.; MOTA, M.M.; MARRA, R.; BORGHI, E.; MIRANDA, R.D.; SILVA, A.D.; SILVA, D.D.; MACHADO, J.D.A.; COTA, L.V.; COSTA, R.D.; MENDES, S.M. **Milho: caracterização e desafios tecnológicos**. Brasília: Embrapa. 2019.

CUI, W.; HE, P.; MUNIR, S.; HE, P.; LI, X.; LI, Y.; HE, Y. Efficacy of plant growth promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* B9601-Y2 for biocontrol of southern corn leaf blight. **Biological Control**, 139, 2019.

DAVIES-BARNARD, T.; FRIEDLINGSTEIN, P. The global distribution of biological nitrogen fixation in terrestrial natural ecosystems. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 34, n. 3, 2020.

DAY J.M.; DÖBEREINER, J. Physiological aspects of N,-fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* roots. **Soil Biol Biochem**, v. 8, p.45–50, 1976.

DEPARIS, G.A. **Espaçamento, adubação nitrogenada e potássica em cobertura na cultura do milho**. 2006. 63 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2006.

DEMARI, G. H.; CA, I. R.; MONTEIRO, C. J. B.; PEDÓ, T. Importance of nitrogen in maize production. **Journal of Current Research**, v.8, n.08, p.36629-36634, 2016.

DI BENEDETTO, N. A.; CORBO, M. R.; CAMPANIELLO, D.; CATALDI, M. P.; BEVILACQUA, A.; SINIGAGLIA, M.; FLAGELLA, Z. The role of Plant Growth Promoting Bacteria in improving nitrogen use efficiency for sustainable crop production: a focus on wheat. **AIMS microbiology**, v. 3, n. 3, p. 413–434, 2017. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.413>

DÍAZ-ZORITA, M.; CANIGIA, M. V. F.; BRAVO, O. Á.; BERGER, A.; SATORRE, E. H. Field Evaluation of Extensive Crops Inoculated with *Azospirillum* sp. **Handbook for Azospirillum**, p. 435–445, 2015. doi:10.1007/978-3-319-06542-7\_24

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

DÖBEREINER, J.; ALVAHYDO, R. Sobre a influência da cana-de-açúcar na ocorrência de *Beijerinckia* no solo. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 401-412, 1959.

DODD I. C.; ZINOVKINA N. Y.; SAFRONOVA V. I.; BELIMOV A. A. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. **Ann. Appl. Biol.**, v. 157, p. 361–379, 2010.

EL-SAADONY, M.T.; EL-WAFAI, N.A.; EL-FATTAH, H.I.A.; MAHGOUB, S.A. Biosynthesis, optimization and characterization of silver nanoparticles using a soil isolate of *Bacillus pseudomycoides* MT32 and their antifungal activity against some pathogenic fungi. **Adv. Anim. Vet. Sci**, v. 7, n. 4, pp.238-249, 2019.

ELKOCA, E.; TURAN, M.; DONMEZ, M.F. Effects of single, dual and triple inoculations with *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* on nodulation, nutrient uptake, yield and yield parameters of common bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv.'elkoca-05'). **Journal of Plant Nutrition**, v. 33, n. 14, pp.2104-2119, 2010.

FANCELLI, A.L. Cultivo Racional e Sustentável requer maior conhecimento sobre a planta do milho. **Revista Visão agrícola**. São Paulo, p. 20, 2015.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT, 2022.

FARINELLI, R.; LEMOS, L.B. Produtividade e eficiência agrônômica do milho em função da adubação nitrogenada e manejos de solo. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 9, n. 2, p. 135-146, 2010.

FAROOQ, M.; HUSSAIN, M.; WAKEEL, A.; SIDDIQUE, K. H. Salt stress in maize: effects, resistance mechanisms, and management. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, v.35, n.2, p.461-481, 2015.

FERREIRA, A.S.; PIRES, R.R.; RABELO, P.G.; OLIVEIRA, R.C.; LUZ, J.M.Q.; BRITO, C.H. Implications of *Azospirillum brasilense* inoculation and nutrient addition on maize in soils of the Brazilian Cerrado under greenhouse and field conditions. **Appl Soil Ecol**. 2013, v. 72, p.103–8.

- FIERER, N.; JACKSON, R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 3, p. 626-631, 2006.
- GALILI, T.; O'CALLAGHAN, A.; SIDI, J.; SIEVERT, C. Heatmaply: an R package for creating interactive cluster heatmaps for online publishing. **Bioinformatics**, 34:1600-1602, 2018.
- GALINDO, F.S.; TEIXEIRA FILHO, M.C.; BUZETTI, S.; PAGLIARI, P.H.; SANTINI, J.M.; ALVES, C.J.; MEGDA, M.M.; NOGUEIRA, T.A.; ANDREOTTI, M.; ARF, O. Maize yield response to nitrogen rates and sources associated with *Azospirillum brasilense*. **Agronomy Journal**, v.111, n.4, pp.1985-1997, 2019.
- GALVÃO, J.C.C.; MIRANDA, G.V.; TROGELLO, E.; FRITSCHÉ-NETO, R. Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. **Revista Ceres**, v. 61, p. 819-828, 2014.
- GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, 2012.
- GLICK, B.R. Introduction to plant growth-promoting bacteria. In **Beneficial plant-bacterial interactions**, p. 1-37, 2020.
- GRANHALL, U. Biological nitrogen fixation in relation to environmental factors and functioning of natural ecosystems. **Ecological Bulletins**, p. 131-144, 1981.
- GRAY, E.J.; SMITH, D.L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. **Soil biology and biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 395-412, 2005.
- GROSS, M.R.; PINHO, R.V.; BRITO, A.D. Adubação nitrogenada, densidade de semeadura e espaçamento entre fileiras na cultura do milho em sistema plantio direto. **Ciência e agrotecnologia**, v. 30, n. 3, p. 387-393, 2006.
- GUEL, A.; KIDOGLU, F.; TUZEL, Y.; TUZEL, I.H. Effects of nutrition and *Bacillus amyloliquefaciens* on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) growing in perlite. **Span Agric J Res**, v.6, p.422–429, 2008.
- HAICHAR, F.Z.; MAROL, C.; BERGE, O.; RANGEL-CASTRO, J.I.; PROSSER, J.I.; BALESDENT, J.; HEULIN, T.; ACHOUAK, W. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **The ISME Journal**, v. 2, 2008.
- HALL, T.; BIOSCIENCES, I.; CARLSBAD, C. BioEdit: an important software for molecular biology. **GERF Bull Biosci**, v. 2, n. 1, p. 60-61, 2011.
- HE, Y.; PANTIGOSO, H.A.; WU, Z.; VIVANCO, J.M. Co-inoculation of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas putida* at different development stages acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of tomato. **Journal of applied microbiology**, v. 127, n. 1, pp.196-207, 2019.
- HOAGLAND, D.; ARNON, D. **The water-culture method for growing plants without soil**. 2nd ed. California agricultural experiment station; 1950.
- HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 4765–4774, 1998.

- 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, pp.413-425., 2010.
- IKEDA, A. C.; SAVI, D. C.; HUNGRIA, M.; KAVA, V.; GLIENKE, C.; GALLI-TERASAWA, L. V. Bioprospecting of elite plant growth-promoting bacteria for the maize crop. **Acta Scientiarum**. Agronomy, 42, 2020.
- KALAJI, H. M.; OUKARROUM, A.; ALEXANDROV, V.; KOUZMANOVA, M.; BRESTIC, M.; ZIVCAK, M.; GOLTSEV, V. Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by in vivo chlorophyll a fluorescence measurements. **Plant physiology and biochemistry**, v.81, p.16-25, 2014.
- KIMOTHO, R.N.; BAILLO, E.H.; ZHANG, Z. Transcription factors involved in abiotic stress responses in Maize (*Zea mays* L.) and their roles in enhanced productivity in the post genomics era. **PeerJ**, 7, p.e7211, 2019.
- KHORSHIDI, Y.R.; ARDAKANI, M.R.; RAMEZANPOUR, M.R.; KHAVAZI, K.; ZARGARI, K. Response of yield and yield components of rice (*Oryza sativa* L.) to *Pseudomonas fluorescens* and *Azospirillum lipoferum* under different nitrogen levels. **Am Euras J Agric Environ Sci**, 10, pp.387-95, 2011.
- KISTLER, L.; MAEZUMI, S.Y.; SOUZA, J.G.; PRZELOMSKA, N.A.; COSTA, F.M.; SMITH, O.; LOISELLE, H.; RAMOS-MADRIGAL, J.; WALES, N.; RIBEIRO, E.R.; MORRISON, R.R. Multiproxy evidence highlights a complex evolutionary legacy of maize in South America. **Science**, v. 362 n. 6420, p. 1309-1313, 2018.
- KNEŽEVIĆ, M.M.; STAJKOVIĆ-SRBINOVIĆ, O.S.; ASSEL, M.; MILIĆ, M.D.; MIHAJLOVSKI, K.R.; DELIĆ, D.I.; BUNTIĆ, A.V. The ability of a new strain of *Bacillus pseudomycooides* to improve the germination of alfalfa seeds in the presence of fungal infection or chromium. **Rhizosphere**, v. 18, 2021.
- KUAN, K.B.; OTHMAN, R.; ABDUL, R.K.; SHAMSUDDIN, Z.H. Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, 2016.
- KUMAR S.; STECHER G.; LI M.; KNYAZ C.; TAMURA K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p.1547-1549, 2018.
- KUMAR, N.; SINHA, S.; MEHROTRA, T.; SINGH, R.; TANDON, S.; THAKUR, I.S. Biodecolorization of azo dye acid black 24 by *Bacillus pseudomycooides*: process optimization using box Behnken design model and toxicity assessment. **Bioresource Technology Reports**, v. 8, 2019.
- LANG, CALVIN A. Simple microdetermination of Kjeldahl nitrogen in biological materials. *Analytical Chemistry*, 30(10):1692-1694, 1958.
- LAUBER, C.L.; HAMADY, M.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 15, p. 5111-5120, 2009.
- LÊ, S.; JOSSE, J.; HUSSON, F. FactoMineR: an R Package for multivariate analysis.

**Journal of Statistical Software**, 25:1-18, 2008.

LIMA, R.C.M.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.; LIRA JÚNIOR, M.A.; DIAS, S.H. Eficiência e efeito residual de biofertilizantes de rochas com PK e enxofre com *Acidithiobacillus* em alface. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 402-407, 2007.

LIU, L.; HUANG, X.; ZHANG, J.; CAI, Z.; JIANG, K.; CHANG, Y. Deciphering the relative importance of soil and plant traits on the development of rhizosphere microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, 148, 2020.

LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G. Fertilidade do solo e produtividade agrícola. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. **Fertilidade do solo**, pp.2-64, Viçosa, 2007.

LOPES, M. J. D. S.; DIAS-FILHO, M. B.; GURGEL, E. S. C. Successful plant growth-promoting microbes: inoculation methods and abiotic factors. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, 5, 2021.

LOURENZI, C.R.; CERETTA, C.A.; CERINI, J.B.; FERREIRA, P.A.A.; LORENSINI, F.; GIROTTO, E.; TIECHER, T.L.; SCHAPANSKI, D.E.; BRUNETTO, G. Available content, surface runoff and leaching of phosphorus forms in a typic hapludalf treated with organic and mineral nutrient sources. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 2, p. 544-556., 2014.

MAGALHAES, P.C.; DURÃES, F.O. **Fisiologia da produção de milho**. Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2006.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Agronômica Ceres, 2006.

MARIN, V.A.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.D.S.; BALDANI, J.I. **Fixação biológica de nitrogênio**: bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical. EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 91, 1999.

MARTINS, M.R.; JANTALIA, C.P.; REIS, V.M.; DÖWICH, I.; POLIDORO, J.C.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. Impact of plant growth-promoting bacteria on grain yield, protein content, and urea-15 N recovery by maize in a Cerrado Oxisol. **Plant and Soil**, v. 422, n. 1, pp.239-250, 2018.

MASOOD, S.; ZHAO, X.Q.; SHEN, R.F. *Bacillus pumilus* promotes the growth and nitrogen uptake of tomato plants under nitrogen fertilization. **Scientia Horticulturae**, v. 272, p.109581, 2020.

MELO FILHO, G.A.; RICHETTI, A. Aspectos socioeconômicos da cultura do milho. In: **Milho: Informações Técnicas**. EMBRAPA-CPAO, 1997.

MOLL, R.H.; KAMPRATH, E.J.; JACKSON, W.A. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. **Agronomy Journal**, v. 74, p. 562, 1982.

MONTAÑEZ, A.; SICARDI, M. Effects of inoculation on growth promotion and biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) under greenhouse and field conditions. **Basic Research Journal of Agricultural Science and Review**, v.2, n.4. pp. 102-110, 2013.

MONTEIRO, R.A.; BALSANELLI, E.; WASSEM, R.; MORIN, A.M.;

- BRUSAMARELLO-SANTOS, L.C.C.; SCHMIDT, M.A.; TADRA-SFEIR, M.Z.; PANKIEVICZ, V.C.S.; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L.S.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. Herbaspirillum-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant Soil**, v. 356, p. 175–196, 2012. doi:10.1007/s11104-02-1125-7
- MOUTIA, J.F.Y.; SAUMTALLY, S.; SPAEPEN, S. et al. Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. **Plant Soil**, v. 337, 233–242, 2010. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0519-7>
- NAKAMURA, L. K. *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, n. 3, 1031–1035, 1998.
- NGALIMAT, M.S.; RADIN, S.R.Y.; MOHAMAD, M.A.-A. B.; SYAFIQA, M. Y.; MURNI, K.; SITI, A.A.; SURIANA, S. "A Review on the Biotechnological Applications of the Operational Group *Bacillus amyloliquefaciens*" **Microorganisms** 9, n3, p.614, 2021.
- OKUMURA, R.S.; MARIANO, D.C.; ZACCHEO, P.V.C. Use of nitrogen fertilizer in corn: a review. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, 2011.
- REVA, O.N.; DIXELIUS, C.; MEIJER, J.; PRIEST, F.G. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*, **FEMS Microbiology Ecology**, V. 48, N. 2, 2004.
- OLIVEIRA, A.L.M.; CANUTO, E.L.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant Soil**, v.284, p.23-32, 2006.
- OLIVEIRA, L. R. D.; MIRANDA, G. V.; DELIMA, R. O.; FRITSCH NETO, R.; GALVÃO, J. C. C. Nitrogen uptake and utilization efficiency and enzymatic activity in maize genotypes. **Rev. Ciênc. Agron.** v. 44, p. 614–621, 2013. doi: 10.1590/S1806-66902013000300025
- PADDA, K.P.; PURI, A.; CHANWAY, C.P. *Paenibacillus polymyxa*: a prominent biofertilizer and biocontrol agent for sustainable agriculture. **Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture**, p. 165–191, 2017.
- PEIFFER, J.A.; SPOR, A.; KOREN, O.; JIN, Z.; TRINGE, S.G.; DANGL, J.L.; BUCKLER, E.S.; LEY, R.E. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 16, p. 6548-6553, 2013.
- PENG, S.H.; WAN-AZHA, W.M.; WONG, W.Z.; GO, W.Z.; CHAI, E.W.; CHIN, K.L.; H'NG, P.S. Effect of using agro-fertilizers and n-fixing *Azotobacter* enhanced biofertilizers on the growth and yield of corn. **Journal of Applied Science**, v. 13, p. 508-512. China, 2013.
- PIPERNO, D.R.; RANERE, A.J.; HOLST, I.; IRIARTE, J.; DICKAU, R. Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium BP maize from the Central Balsas River Valley, Mexico. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.106, n.13, pp.5019-5024, 2009.
- PRAMANIK, P.; GOSWAMI, A.J.; GHOSH, S.; KALITA, C. An indigenous strain of potassium-solubilizing bacteria *Bacillus pseudomycooides* enhanced potassium uptake in tea plants by increasing potassium availability in the mica waste-treated soil

of North-east India. **Journal of applied microbiology**, v. 126, n. 1, pp.215-222, 2019.

PRAMANIK, S.K.; MAHMUD, S.; PAUL, G.K.; JABIN, T.; NAHER, K.; UDDIN, M.S.; ZAMAN, S.; SALEH, M.A. Fermentation optimization of cellulase production from sugarcane bagasse by *Bacillus pseudomycooides* and molecular modeling study of cellulase. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 2, p.100013, 2021.

PRIEST, F. Systematics and ecology of *Bacillus*. In: *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria, biochemistry, physiology, and molecular genetics. **American Society for Microbiology Press**, Washington, D.C., p. 3-16, 1993.

RADDADI, N.; CHERIF, A.; BOUDABOUS, A.; DAFFONCHIO, D. Screening of plant growth promoting traits of *Bacillus thuringiensis*. **Annals of Microbiology**, v. 58, n. 1, pp.47-52, 2008.

REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F.; CASTELLUCCI, A.C.L. Processamento e industrialização do milho para alimentação humana. **Visão Agrícola**, v. 13, p. 138-140, 2015.

REIS, V.M.; JESUS, E.C.; SCHWAB, S.; OLIVEIRA, A.L.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M.S.; SOUZA, S.R.; SANTOS, L.A. **Nutrição Mineral de Plantas**. 2 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2018.

REMANS, R.; RAMAEKERS, L.; SCHELKENS, S. et al. Effect of *Rhizobium–Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. **Plant Soil**, v.312, p.25–37, 2008. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9606-4>

RIBEIRO, V.P.; MARRIEL, I.E.; SOUSA, S.M.D.; LANA, U.G.D.P.; MATTOS, B.B.; OLIVEIRA, C.A.D.; GOMES, E.A. Endophytic *Bacillus* strains enhance pearl millet growth and nutrient uptake under low-P. **Brazilian journal of microbiology**, v. 49, pp.40-46, 2018.

RONDINA, A.B.L.; SANZOVO, A.W.S.; GUIMARÃES, G.S.; WENDLING, J.R.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. Changes in root morphological traits in soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* or treated with *A. brasilense* exudates. **Biol Fertil Soils**. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01453-0>

ROSA, T.C.; CARVALHO, I. R.; HUTRA, D. J.; BRADEBON, L. C.; ROSA SARTURI, M. V.; SZARESKI, V. J. Maize breeding for abiotic stress tolerance: An alternative to face climate changes. **Agronomy Science and Biotechnology**, v. 6, p. 1-13, 2020.

SAITOU N.; NEI M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, p.406-425, 1987.

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

SALDIVAR, S.O.S.; PEREZ-CARRILLO, E. Maize. **Encyclopedia of Food and**

**Health**, p. 601–609, 2016.

SANGOI, L.; SILVA, P.D.; ARGENTA, G.; RAMBO, L. Ecofisiologia da cultura do milho para altos rendimentos. Lages: **Graphel**, p. 88, 2010.

SANSINENEA, E. **Bacillus spp.: As Plant Growth-Promoting Bacteria**. Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms, pp. 225–237, 2019.

SANTOS, R. M.; DIAZ, P. A. E.; LOBO, L. L. B.; RIGOBELLO, E. C. Use of plant growth-promoting rhizobacteria in maize and sugarcane: characteristics and applications. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, p. 136, 2020.

SANTOS, M.S.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. Outstanding impact of Azospirillum brasilense strains Ab-V5 and Ab-V6 on the Brazilian agriculture: Lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. **Rev Bras Cienc Solo**. 2021.

SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; OROZCO-MOSQUEDA, D.C.M.; GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological research**, v. 183, p. 92-99, 2016.

SCHWARTZ, A.R.; ORTIZ, I.; MAYMON, M.; HERBOLD, C.W.; FUJISHIGE, N.A.; VIJANDERAN, J.A.; VILLELLA, W.; HANAMOTO, K.; DIENER, A.; SANDERS, E.R.; DEMASON, D.A. Bacillus simplex—a little known PGPB with anti-fungal activity—alters pea legume root architecture and nodule morphology when coinoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. **Agronomy**, v. 3, n. 4, pp.595-620, 2013.

SHEORAN, S.; KUMAR, S.; KUMAR, P. *et al.* Nitrogen fixation in maize: breeding opportunities. **Theoretical and Applied Genetics**, v.134, p. 1263–1280, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00122-021-03791-5>

SHOBANA, N.; THANGAPPAN, S.; UTHANDI, S. Plant Growth-Promoting Bacillus sp. Cahoots Moisture Stress Alleviation in Rice Genotypes by Triggering Antioxidant Defense System. **Microbiological Research**, p. 126518., 2020.

SINGH, R.K.; MALIK, N.; SINGH, S. Impact of rhizobial inoculation and nitrogen utilization in plant growth promotion of maize (*Zea mays* L.). **Bioscience**, v. 5, n. 8-14, 2013.

SOARES, M.A.; LI, HY.; BERGEN, M. Functional role of an endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* in enhancing growth and disease protection of invasive English ivy (*Hedera helix* L.). **Plant Soil**, v.405, p.107–123, 2016.

SOLANO, B.R.; MAICAS, J.B.; MAÑERO, F.G. Physiological and molecular mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). In: AHMAD, I.; PICHTEL, J.; HAYAT, S. **Plant-bacteria interactions: strategies and techniques to promote plant growth**. Germany, p. 41-52, 2008.

SOLMAZ, K.B.; OZCAN, Y.; MERCAN DOGAN, N.; BOZKAYA, O.; IDE, S. Characterization and production of extracellular polysaccharides (EPS) by *Bacillus pseudomycolides* U10. **Environments**, v. 5, n. 6, p.63, 2018.

SOUSA, S.M.; OLIVEIRA, C.A.; ANDRADE, D.L. Tropical Bacillus Strains Inoculation Enhances Maize Root Surface Area, Dry Weight, Nutrient Uptake and Grain Yield. **J Plant Growth Regul** v. 40, p. 867–877, 2021.

- SOUZA, G.M.; BARBOSA, A.M. Fatores de estresse no milho são diversos e exigem monitoramento constante. **Visão Agrícola**, v. 13, n. 1, p. 30-34, 2015.
- SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L.M.P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 4, p. 401-419, 2015.
- SOUZA, A.E.; REIS, J.G.M.; RAYMUNDO, J.C.; PINTO, R.S. Estudo da produção do milho no Brasil. **South American Development Society Journal**, v.4, n.11, 2018.
- STAR, L.; MATAN, O.; DARDANELLI, M.S. et al. The Vicia sativa spp. nigra - *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* symbiotic interaction is improved by *Azospirillum brasilense*. **Plant Soil**, v.356, p. 165–174, 2012.
- STECHEER, G.; TAMURA, K.; KUMAR, S. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS. **Molecular Biology and Evolution**, 2020.
- STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 4, pp.487-506, 2000.
- STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular microbiology**, v. 56, n. 4, pp.845-857, 2005.
- SUN, H.; ZHOU, S.; ZHANG, J.; ZHANG, X.; WANG, C. Effects of controlled-release fertilizer on rice grain yield, nitrogen use efficiency, and greenhouse gas emissions in a paddy field with straw incorporation. **Field Crops Research**, 253, 2020.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal** (4th ed.). Porto Alegre, RS: ArtMed. 2012.
- TAKAMI, H. 2.9 **Genomics and Evolution of Alkaliphilic Bacillus Species**. 2011.
- TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, v.101, p.11030-11035, 2004.
- TARTOWSKI, S.L.; HOWARTH, R.W. Nitrogen, Nitrogen Cycle. **Encyclopedia of Biodiversity**, p. 537–546, 2013.
- TEIXEIRA, L.C.R.S.; PEIXOTO, R.S.; CURY, J.C.; SUL, W.J.; PELLIZARI, V.H.; TIEDJE, J.; ROSADO, A.S. Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica. **The ISME Journal**, v. 4, n. 8, p. 989–1001, 2010.
- TEIXEIRA, L.A.R.; JADOSKI, S.O.; FAGGIAN, R.; SPOSITO, V. Efeito de alterações climáticas na aptidão agrícola para cultivo de milho na microrregião de Guarapuava, Paraná. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 4, p. 5, 2020.
- TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBBELL, D. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Appl Environ Microbiol**, v. 37, p.1016–1024, 1979.
- TIWARI, S.; PRASAD, V.; CHAUHAN, P.S.; LATA, C. *Bacillus amyloliquefaciens* Confers Tolerance to Various Abiotic Stresses and Modulates Plant Response to Phytohormones through Osmoprotection and Gene Expression Regulation in Rice. **Front. Plant Sci**. v.8, n.1510, 2017.

TIWARI, S.; PRASAD, V.; LATA, C. Bacillus: Plant Growth Promoting Bacteria for Sustainable Agriculture and Environment. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, p. 43–55, 2019.

TRIPLETT, E.W. The molecular genetics of nodulation competitiveness in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. **Molecular Plant-Microbe Interact**, v. 3, p. 199–206, 1990.

VACHERON, J.; DESBROSSES, G.; BOUFFAUD, M.L.; TOURAINE, B.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; MULLER, D.; LEGENDRE, L.; WISNIEWSKI-DYÉ, F.; PRIGENT-COMBARET, C. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. **Front Plant Sci**, v. 4, p. 1–19, 2013.

VAN LOON, L.C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. In: BAKKER, P.A.H.M. *et al.* **New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research**, p. 243–254, 2007.

VAUGHAN, M.M.; BLOCK, A.; CHRISTENSEN, S.A. *et al.* The effects of climate change associated abiotic stresses on maize phytochemical defenses. **Phytochem Rev**, v.17, 37–49, 2018.

VERMA, P.; YADAV, A.N.; KAZY, S.K.; SAXENA, A.K.; SUMAN, A. Evaluating the diversity and phylogeny of plant growth promoting bacteria associated with wheat (*Triticum aestivum*) growing in central zone of India. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 5, p. 432-447, 2014.

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

VICARIO, J.C.; PRIMO, E.D.; DARDANELLI, M.S. *et al.* Promotion of Peanut Growth by Co-inoculation with Selected Strains of Bradyrhizobium and Azospirillum . **J Plant Growth Regul**, v. 35, p. 413–419, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9547-0>

VIDOTTI, M. S.; MATIAS, F. I.; ALVES, F. C.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, P.; BELTRAN, G. A.; BURGUEÑO, J.; FRITSCHÉ-NETO, R. Maize responsiveness to *Azospirillum brasilense*: Insights into genetic control, heterosis and genomic prediction. **PloS one**, v.14, n.6, e0217571, 2019.

VINHAL-FREITAS, I.C.; RODRIGUES, M.B. Fixação biológica do nitrogênio na cultura do milho. **Agropecuária Técnica**, v. 31, n. 2, p. 143-154, 2010.

WANG, S.; WU, H.; QIAO, J.; MA, L.; LIU, J.; XIA, Y.; GAO, X. Molecular mechanism of plant growth promotion and induced systemic resistance to tobacco mosaic virus by *Bacillus* spp. **J Microbiol Biotechnol**, v.19, n.10, p.1250–1258, 2009.

WARD, J. Hierarchical grouping to optimize an objective function. **Journal of the American Statistical Association**, 58:236-244, 1963.

WEISBURG, W. G.; BARNES, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, v.173, n.2, p. 697-703, 1991.

WICKHAM, H. ggplot2: elegante graphics for data analysis. 2nd. **Cham: Springer International Publ.**, 2016.

WILKINSON, S.; DAVIES, W. J. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights

from cell to plant to community. **Plant, Cell and Environment**, v.33, p. 510–525, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02052>.

WORDELL FILHO, J.A.; RIBEIRO, L.P.; CHIARADIA, L.A.; MADALÓZ, J.C.; NESI, C.N. **Pragas e doenças do milho: diagnose, danos e estratégias de manejo**. Florianópolis: Epagri, 82p. Boletim Técnico, 170, 2016.

XU, D.; CÔTÉ, J.C. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 53, 695- 704, 2003.

YOUSUF, J.; THAJUDEEN, J.; RAHIMAN, M.; KRISHNANKUTTY, S.P.; ALIKUNJ, A.; ABDULLA, M.H. Nitrogen fixing potential of various heterotrophic *Bacillus* strains from a tropical estuary and adjacent coastal regions. **Journal of basic microbiology**, v. 57, n. 11, pp.922-932, 2017.

ZEFFA, D.M.; FANTIN, L.H.; SANTOS, O.J.A.P.D.; OLIVEIRA, A.L.M.D.; CANTERI, M.G.; SCAPIM, C.A.; GONÇALVES, L.S.A. The influence of topdressing nitrogen on *Azospirillum* spp. inoculation in maize crops through meta-analysis. **Bragantia**, 77, pp.493-500, 2018.

ZEFFA, D.M.; PERINI, L.J.; SILVA, M.B.; SOUSA, N.V.; SCAPIM, C.A.; OLIVEIRA, A.L.M. et al. *Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, 2019.

ZENG, J.; LIU, X.; SONG, L.; LIN, X.; ZHANG, H.; SHEN, C.; CHU, H. Nitrogen fertilization directly affects soil bacterial diversity and indirectly affects bacterial community composition. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 92, p. 41-49, 2016.

ZUFFO, L.T. **Avaliação de híbridos comerciais de milho para caracteres agronômicos e eficiência na utilização de nitrogênio**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, 2016.