

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
CÂMPUS DE CHAPADÃO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ÉDIPO SILVA FREITAS

**APLICAÇÃO FOLIAR DE *Azospirillum brasilense* ISOLADA E EM  
ASSOCIAÇÃO A ADUBAÇÃO NITROGENADA NA CULTURA DO  
MILHO**

CHAPADÃO DO SUL – MS  
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
CÂMPUS DE CHAPADÃO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ÉDIPO SILVA FREITAS

**APLICAÇÃO FOLIAR DE *Azospirillum brasilense* ISOLADA E EM  
ASSOCIAÇÃO A ADUBAÇÃO NITROGENADA NA CULTURA DO  
MILHO**

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Félix Alvarez

Coorientadora: Profa. Dra. Meire Aparecida Silvestrini Cordeiro

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração: Produção Vegetal.

CHAPADÃO DO SUL – MS  
2023



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**DISCENTE:** Édipo Silva Freitas

**ORIENTADOR:** Dra. Rita de Cassia Felix Alvarez

**TÍTULO:** Aplicação foliar de *Azospirillum brasilense* isolada e em associação a adubação nitrogenada na cultura do milho

**AVALIADORES:**

Profa. Dra. Rita de Cássia Félix Alvarez

Prof. Dr. Sebastião Ferreira de Lima

Prof. Dr. Rafael Ferreira Barreto

Chapadão do Sul, 08 de março de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Rita de Cassia Felix Alvarez, Professora do Magistério Superior**, em 10/03/2023, às 09:20, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Ferreira Barreto, Professor do Magisterio Superior**, em 10/03/2023, às 09:22, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sebastiao Ferreira de Lima, Professor do Magisterio Superior**, em 10/03/2023, às 09:22, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

## **APLICAÇÃO FOLIAR DE *Azospirillum brasilense* ISOLADA E EM ASSOCIAÇÃO A ADUBAÇÃO NITROGENADA NA CULTURA DO MILHO**

**RESUMO:** O milho (*Zea mays* L.) está entre as espécies mais cultivadas no Brasil, que o produz em larga escala. O nitrogênio é um dos nutrientes mais requerido pela cultura de milho. Uma alternativa para diminuir o uso dos fertilizantes nitrogenados é por meio da aplicação de bactérias do gênero *Azospirillum* que realizam a fixação biológica de nitrogênio. Assim, objetivou-se avaliar o efeito da aplicação foliar de *Azospirillum brasilense*, isolada e em associação a adubação nitrogenada, na atividade microbiológica do solo, nos componentes de produção e produtividade de grãos na cultura do milho. O experimento foi realizado em blocos casualizados, com quatro repetições. Os tratamentos foram: adubação com nitrogênio (66 kg ha<sup>-1</sup>) em cobertura, aplicações foliares de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 (0,5 L ha<sup>-1</sup>) e *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 (0,5 L ha<sup>-1</sup>) isolados e em associação com nitrogênio mineral (33 kg ha<sup>-1</sup>), aplicados em V3 e V6, e o tratamento controle. Foram realizadas as avaliações microbiológicas de carbono da biomassa microbiana do solo, a respiração microbiana do solo, o quociente metabólico, a porcentagem de colonização de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e a densidade de esporos de FMAs. Na cultura foram avaliados a altura de planta, diâmetro do colmo, número de fileiras por espiga, número de grãos por fileira, massa de 100 grãos e produtividade de grãos. A inoculação com *A. brasilense* (trat. 3) foi eficaz no aumento do teor de clorofila. A aplicação foliar de *Azospirillum brasilense* de forma isolada proporcionou maiores valores para diâmetro de colmo, massa de cem grãos e produtividade de grãos, assemelhando-se a adubação com nitrogênio mineral.

**Palavras-chave:** Bactérias Fixadoras de Nitrogênio. Inoculante. Suplementação de Nitrogênio.

## **EFFECT OF FOLIAR APPLICATION OF *Azospirillum brasilense* ISOLATED AND IN ASSOCIATION WITH NITROGEN FERTILIZATION IN CORN CULTURE**

**ABSTRACT:** Corn (*Zea mays* L.) is among the most cultivated species in Brazil, which produces it on a large scale. Nitrogen is one of the nutrients most required by corn. An alternative to reduce the use of nitrogen fertilizers is through the application of bacteria of the genus *Azospirillum* that carry out biological nitrogen fixation. Thus, the objective was to evaluate the effect of foliar application of *Azospirillum brasilense*, isolated and in association with nitrogen fertilization, on the microbiological activity of the soil, on the components of production and grain yield in maize. The experiment was carried out in randomized blocks, with four replications. The treatments were: nitrogen fertilization (66 kg ha<sup>-1</sup>) in coverage, foliar applications of *Azospirillum brasilense* Ab-V5 (0.5 L ha<sup>-1</sup>) and *A. brasilense* Ab-V5 and Ab-V6 (0.5 L ha<sup>-1</sup>) isolated and in association with mineral nitrogen (33 kg ha<sup>-1</sup>), applied in V3 and V6, and the control treatment. Microbiological evaluations of carbon in soil microbial biomass, soil microbial respiration, metabolic quotient, percentage of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) colonization, and AMF spore density were performed. In the crop, plant height, stem diameter, number of rows per ear, number of grains per row, mass of 100 grains and grain yield were evaluated. Inoculation with *A. brasilense* (treatment 3) was effective in increasing the chlorophyll content. Foliar application of *Azospirillum brasilense* in isolation provided higher values for stem diameter, 100-grain weight and grain yield, similar to mineral nitrogen fertilization.

**Keywords:** Nitrogen-binding bacteria. Inoculant. Nitrogen Supplementation.

## INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) está entre as espécies mais cultivadas no Brasil, produzido em larga escala (CHIEZA et al., 2017). O alto potencial produtivo dessa cultura é influenciado por diversos fatores, com destaque para a adubação nitrogenada, em função do nitrogênio (N) ser o nutriente mais absorvido e extraído pela cultura do milho (MOREIRA et al., 2019).

O N é o nutriente que mais influência na produtividade de grãos (SILVA et al., 2013), devido ao seu papel fundamental como constituinte essencial dos aminoácidos, principais integrantes de proteínas no milho (GONÇALVES et al., 2016), participação na biossíntese de clorofila, influenciando na formação de grãos das plantas (SILVA et al., 2013), diretamente ligado a produtividade. Também, favorece maior desenvolvimento das raízes, parte aérea e, conseqüentemente, a absorção de água e nutrientes (ROSCOE et al, 2010).

Para garantir produtividade satisfatória de grãos da cultura do milho, é necessário a fertilização com N, o que onera o custo de produção (MELO et al., 2011), principalmente devido ao uso intenso e ao elevado valor financeiro dos fertilizantes, chegando a representar 18,44% do custo total da cultura (CARMO et al., 2020).

Uma alternativa para diminuir o emprego dos fertilizantes nitrogenados é o uso de microrganismos que realizam a fixação biológica de nitrogênio (FBN) como as bactérias que podem fixar o N atmosférico e o disponibilizar para as plantas (CARMO et al., 2020). O nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) não pode ser absorvido e assimilado pelas plantas, assim, os microrganismos diazotróficos possuem a capacidade de reduzir o N<sub>2</sub> em amônia (NH<sub>3</sub>), forma que pode ser absorvida pela planta (ROSCOE et al, 2010).

Dentre as bactérias fixadoras de N, as do gênero *Azospirillum* são as mais bem caracterizadas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, relacionadas ao aumento de assimilação de N e na atividade de enzimas fotossintéticas nas plantas por ela colonizadas (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016).

Além do N<sub>2</sub> fixado do ar atmosférico, as bactérias do gênero *Azospirillum* também auxilia na produção de hormônios que potencializa os processos metabólicos realizados pelas plantas, como a produção de fotoassimilados para o crescimento e desenvolvimento (HUNGRIA, 2011; VITTO et. al., 2022), aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes (RAMASAMY et al., 2011; DHAWI et al., 2015), proporcionando maior altura de planta, massa fresca de parte aérea e raiz (COSTA; MELLONI, 2019).

Apesar da fixação de nitrogênio por meio de bactérias ser uma ótima alternativa técnica e econômica, tendo em vista a busca por práticas que visem a redução na aplicação de fertilizantes (CARMO et al., 2020; REIS et al., 2020) e sendo uma forma barata e não poluente,

grande parte dos estudos referem-se apenas ao uso de aplicação desses biofertilizantes na complementação da adubação nitrogenada com N sintético (REPKE et al., 2013; VERONEZI et al., 2018; MACHADO et al., 2020).

Existe no mercado produtos comerciais contendo cepas de *Azospirillum brasilense* prontos para serem aplicadas por via foliar (BRASIL, 2020), no tratamento de sementes e sulco de plantio (KOPPERT, 2022). Contudo, as formas de aplicação nem sempre são realizadas como recomendado pelo fabricante, além disso, poucos são os estudos que apresentam o efeito do uso desses inoculantes para comunidade microbiana e sua atividade metabólica no solo.

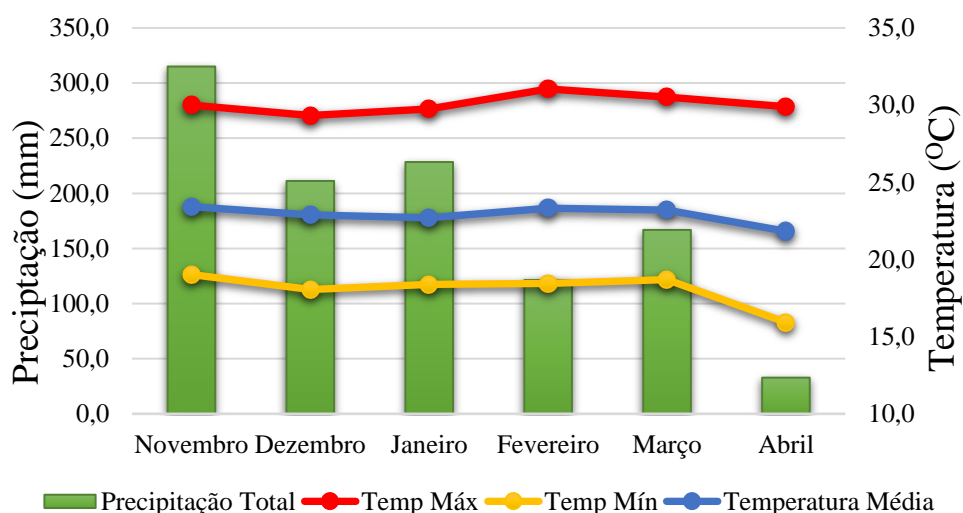
A biomassa microbiana representa 1% a 5% da matéria orgânica do solo (MOS) e é tida como a fração ativa dessa, principalmente por incluir bactérias, arqueas, fungos, protistas e outros microrganismos edáficos. Além disso, trata-se de uma importante propriedade biológica edáfica devido a sua rápida taxa de reciclagem. Alterações na comunidade microbiana e na sua atividade interferem diretamente nos processos biológicos e bioquímicos do solo, na produtividade agrícola e, conseqüentemente, na sustentabilidade dos agroecossistemas (JENKINSON; LADD, 1981; LIANG et al., 2017).

Assim, é importante o conhecimento sobre o efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* no suprimento de N ao milho aplicado via foliar, bem como a interação entre *A. brasilense* e nitrogênio mineral. Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito da aplicação foliar de *Azospirillum brasilense*, isolada e em associação a adubação nitrogenada, na atividade microbiológica do solo, nos componentes de produção e produtividade de grãos na cultura do milho.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Informações tecnológicas do experimento**

O estudo foi conduzido na área experimental da Fundação Chapadão (18°41'33" S e 052°40'45") em Chapadão do Sul – MS, na safra de 2021/22. O clima da região, segundo Köppen, é do tipo tropical úmido (Aw), com estação chuvosa no verão e seca no inverno e precipitação média anual de 1.850 mm, com temperatura média anual variando de 13°C a 28°C (CUNHA et al., 2013) (Figura 1).



**Figura 1.** Precipitação pluviométrica total, temperatura máxima, mínima e média de cada mês durante o experimento. Chapadão do Sul-MS, safra 2021/22.

O solo é classificado como Latossolo Vermelho Distrófico (SANTOS et al., 2018) com textura argilosa como apresentado na análise química e granulométrica na Tabela 1, com amostragem realizada previamente a pesquisa.

**Tabela 1.** Caracterização química e granulométrica do solo na profundidade de 0 a 0,2 m e 0,2 a 0,4 m. Fundação Chapadão – Chapadão do Sul, MS (2021).

Prof.	MO	pH	P	Ca	Mg	K	Al	H+Al	SB	CTCe	CTC
	g dm <sup>-3</sup>		mg dm <sup>-3</sup>						cmolc dm <sup>-3</sup>		
0 - 0,2 m	34,6	5,20	96,20	4,40	1,00	0,37	0,07	4,60	5,77	5,84	10,37
0,2 - 0,4 m	-	5,10	55,40	3,80	0,90	0,22	0,06	4,90	4,92	4,98	9,82

Prof.	V	M	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Argila	Silte	Areia
	----- % -----				mg dm <sup>-3</sup>				g kg <sup>-1</sup>		
0 - 0,2 m	55,60	1,20	14,30	0,21	1,00	48,00	17,40	7,10	595	55	350
0,2 - 0,4 m	50,10	1,20	29,30	-	-	-	-	-	-	-	-

MO: Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>; pH: CaCl<sub>2</sub>; P: Resina; Ca, Mg, Al: KCl; H+Al: SMP; S: NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>; B: H<sub>2</sub>O quente; K, Cu, Fe, Mn e Zn: Mehlich.

A calagem foi realizada no ano anterior ao experimento. Quanto aos adubos, foram aplicados 120 kg ha<sup>-1</sup> de potássio (K) a lanço 10 dias antes da semeadura, 230 kg ha<sup>-1</sup> do formulado NPK (11-52-00), equivalente a 25,3 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio (N) e 119,6 de fósforo (P), ambos aplicados no sulco de semeadura. No decorrer do ciclo da cultura foram realizados os tratamentos fitossanitários em função do monitoramento e padrões para controle de pragas e doença da região (Tabela 3). Os tratos culturais (MELHORANÇA; KARAM, 2021) e adubação



(COELHO et al., 2021) foram realizados conforme necessidade e recomendação na cultura do milho.

**Tabela 02.** Manejo fitossanitário de doenças e pragas e manejo cultural de plantas daninhas realizado na cultura do milho. Chapadão do Sul – MS, safra 2021/22. Fundação Chapadão, 2022.

Controle	Ingredientes ativo	Concentração (g/L ou kg)	Dose Comercial (kg ou L ha <sup>-1</sup> )	Data
Dessecação Pré- plantio do milho	Glifosato-sal de potássio	588	2,0	28/10/2021
	Carfentrazona-Etílica	400	0,05	
	Óleo Mineral	756	1,0	
Controle - Pragas	Tiametoxam + Lambda-cialotrina + Nafta de Petróleo	141+106 +72,76	0,25	22/11/2021
Controle - Plantas daninhas	Atrazina	500	3,0	30/11/2021
	Tembotriona	420	0,18	
Controle - doenças	Piraclostrobina + Epoxiconazol	133+50	0,75	29/12/2021
	Óleo Mineral	756	0,5	
	Mancozebe	750	1,5	
Controle - pragas	Clorantraniliprole	200	0,125	29/12/2021
Controle - doenças	Azoxistrobina + Ciproconazol	200+80	0,3	11/01/2022
	Éster metílico de óleo de soja	720	0,5	
	Mancozebe	750	1,5	
Controle - pragas	Imidacloprido + Bifentrina	250 + 50	0,4	11/01/2022
	Metomil + Novalurom	440 + 35	0,5	
	+ N-Metilpirrolidona + Dimetil	+ 271,6 +288,8		
Controle - doenças	Picoxistrobina + Ciproconazole	200 + 80	0,3	24/01/2022
	Óleo Mineral	428	0,3	
	Mancozebe	750	1,5	
Controle - pragas	Acetamiprido + Bifentrina	250 + 250	0,2	24/01/2022

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com 4 repetições e 6 tratamentos (Tabela 3). As parcelas foram constituídas de 7 linhas de 7 metros de comprimento, com espaçamento de 0,45 metros entre as linhas, tendo cada parcela 22 m<sup>2</sup>.

**Tabela 3.** Tratamentos, concentração de ingrediente ativo, dose do produto comercial por hectare, e época de aplicação de *Azospirillum brasilense* cepa Ab-V5 e *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 associada ou não adubação nitrogenada (ureia) na cultura do milho.

Tratamentos	Concentração i.a <sup>1</sup> (UFC <sup>2</sup> mL <sup>-1</sup> ou g <sup>-1</sup> )	Dose (L ou kg pc <sup>3</sup> ha <sup>-1</sup> )	Época de Aplicação	Modo de Aplicação
1. Testemunha	-	-	V3 e V6	-
2. Nitrogênio	-	66 e 66	V3 e V6	Lanço
3. Azo 1	5 x 10 <sup>8</sup>	0,5 e 0,5	V3 e V6	Foliar
4. Azo 2	2 x 10 <sup>8</sup>	0,5 e 0,5	V3 e V6	Foliar
5. Azo 1 + N	5 x 10 <sup>8</sup>	0,5+33 e 0,5+33	V3 e V6	Foliar + Lanço
6. Azo 2 + N	2 x 10 <sup>8</sup>	0,5+33 e 0,5+33	V3 e V6	Foliar + Lanço

Azo 1: *Azospirillum brasilense*-Ab-V5 produto comercial Azos. Azo 2: *Azospirillum brasilense*-Ab-V5 e Ab-V6 produto comercial Azotrop. N: Nitrogênio. i.a<sup>1</sup>: Ingrediente Ativo. UFC<sup>2</sup>: Unidade Formadora de colônia. pc<sup>3</sup>: Produto Comercial. V3 e V6 (estádios de desenvolvimento do milho).

O híbrido de milho comercial utilizado foi o Refúgio Max 3700 RR, semeado em 11 de novembro de 2021, com emergência em 16 de novembro. Nos tratamentos, a testemunha foi sem aplicação de adubação nitrogenada e sem inoculação de *A. brasilense*, no tratamento 2 foi realizada somente a adubação nitrogenada composta de 66 kg de N tendo como fonte a ureia aplicado a lanço no solo.

O inoculante dos tratamentos com Azo 1 foi o produto comercial Azos da empresa Lallemand Soluções Agrobiológicas Ltda, composto pela cepa Ab-V5 de *A. brasilense*, sendo produto líquido indicado para uso exclusivo em aplicação foliar (BRASIL, 2020). O produto comercial dos tratamentos com Azo 2 foi o Azotrop da empresa Biotrop Soluções Biológicas Ltda, também inoculante líquido, composto pela cepa Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense*, sendo sua indicação comercial para o tratamento de sementes e aplicação no sulco de semeadura (KOPPERT, 2022). A aplicação do inoculante foi realizada via foliar e a aplicação do nitrogênio mineral foi feita em superfície, na linha de cultivo, próximo a base das plantas, nos estádios V3 e V6 (3<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> folha desenvolvida, respectivamente).

Para a aplicação foliar dos tratamentos foi utilizado um pulverizador costal de pressão constante de 3,0 kgf cm<sup>-2</sup>, pressurizado a CO<sub>2</sub>, equipado com uma barra de 2,0 m, com seis pontas pulverizadoras jato leque tipo XR 11002, espaçadas de 0,50 m, e conduzida a uma altura de 0,50 m do alvo. O volume de calda empregado foi de 150 L ha<sup>-1</sup>.

### Avaliação dos parâmetros de produtividade

A colheita manual foi realizada em 2 de abril de 2022, nas duas linhas de 2 metros no centro da parcela. Foram mensurados os seguintes componentes de produção do milho: altura de planta considerando a distância da região do “colo” até o ponto de inserção da folha “bandeira” com o colmo, diâmetro de colmo, número de fileiras por espiga, número de grãos por fileira, massa de 100 grãos, ambos em três plantas por parcela. A produtividade de grãos

foi obtida a partir da trilha mecânica e verificação da massa de grãos das áreas úteis das parcelas, com a umidade corrigida para 13%.

### **Determinação da atividade microbiológica do solo**

Foi realizada coleta de raízes de milho e solo separadamente na fase de florescimento da cultura. Foram coletadas as raízes de três plantas dentro de cada parcela, com auxílio de um enxadão para tirar a planta inteira e após cortar e tirar as raízes. O solo foi coletado na entrelinha dentro da parcela com auxílio de um trado holandês. Ambas as coletas, de raiz e de solo, foram coletadas a uma profundidade de 0 a 10 cm. Foi realizado também a avaliação da clorofila, avaliada na fase do florescimento, utilizando o aparelho Clorofilog.

As amostras coletadas foram levadas ao Laboratório de Biotecnologia, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - Câmpus de Chapadão do Sul, onde realizou-se a lavagem das raízes e posterior armazenamento em álcool 50%, enquanto o solo foi armazenado em sacos plásticos e conservado em geladeira a 4°C. Foram realizadas análises referentes ao carbono da biomassa microbiana do solo (CBM), a respiração basal do solo (RBS), o quociente metabólico ( $qCO_2$ ), a porcentagem de colonização micorrízica (MIC) e a densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (ESP).

O carbono da biomassa microbiana do solo (CBM) foi avaliado pelo método da fumigação-extração (VANACE et al., 1987) após incubação por 24 h, extração com  $K_2SO_4$  0,5 mol L<sup>-1</sup>, oxidação com  $K_2Cr_2O_7$  0,0667 mol L<sup>-1</sup> e titulação com sulfato ferroso amoniacal 0,0333 mol L<sup>-1</sup>. A respiração basal do solo (RBS) foi mensurada pela liberação de  $CO_2$  a partir de 10 g de solo durante dez dias, com extração através de NaOH 0,05 mol L<sup>-1</sup> e titulação com HCl 0,05 mol L<sup>-1</sup> (ALEF; NANNIPIERI, 1995).

Para a determinação do quociente metabólico ( $qCO_2$ ), foi utilizado a equação:  $qCO_2 = C-CO_2 / C-BM$ ; em que, C- $CO_2$  é a taxa de respiração basal do solo (mg de C- $CO_2$  kg<sup>-1</sup>), e CBM é o carbono da biomassa microbiana (mg de  $CO_2$  kg<sup>-1</sup>) (ANDERSON; DOMSH, 1993).

Para a determinação da colonização por FMAs nas raízes utilizou-se o método da placa quadriculada (GIOVANNETTI; MOSSE, 1980). Com o auxílio de microscópio estereoscópico (40x) foi observado 0,5 g de raízes, clarificadas com KOH 25 g L<sup>-1</sup> (KOSKE; GEMMA, 1989) e as estruturas fúngicas, coloridas com azul de metila 0,05% (GRACE; STRIBLEY, 1991). A densidade de esporos de FMAs no solo (ESP) foi obtida separando-os de 50 dm<sup>-3</sup> de solo por peneiramento úmido em malhas de 0,710 mm e 0,053 mm (GERDEMANN; NICOLSON, 1963) e centrifugações a 3.000 rpm, em água e em sacarose (450 g L<sup>-1</sup>), por três e dois minutos,

respectivamente. Os esporos separados foram contados com o auxílio de microscópio estereoscópico (40x).

### Análises estatísticas

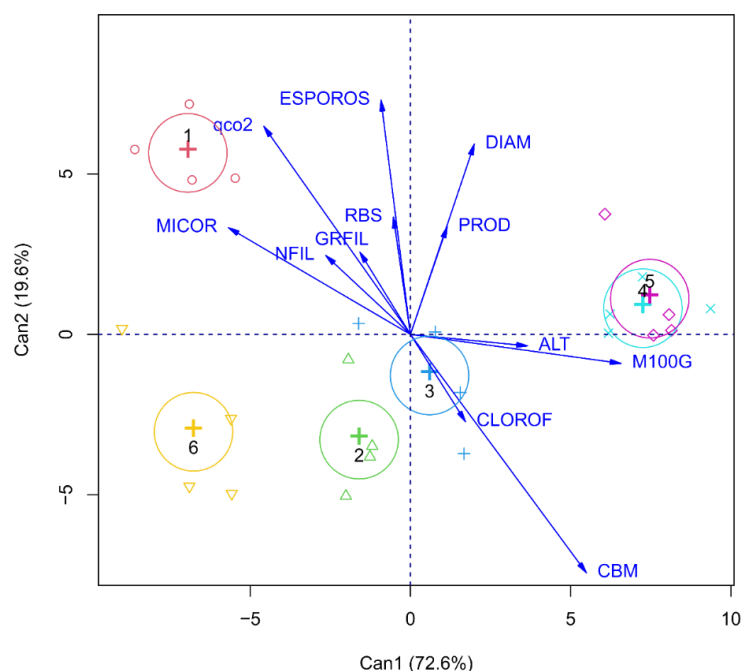
Para analisar a atividades microbiológicas do *Azospirillum brasilense* foi realizada análise de componentes principais, no ambiente estatístico R (BHERING, 2017), com as variáveis altura de plantas (ALT), diâmetro de colmo (DIAM), número de fileiras (NFIL), grãos por fileira (GFIL), clorofila (CLOR), massa de cem grãos (M100G), produtividade de grãos (PROD), carbono da biomassa microbiana (CBM), respiração basal do solo (RBS), quociente metabólico ( $qCO_2$ ), porcentagem de colonização micorrízica (MIC), densidade de esporos micorrízicos (ESP) e a produtividade do milho em função dos diferentes tratamentos com *Azospirillum brasilense* e N mineral.

Foi realizado também análise de variância com os dados de altura de plantas, diâmetro de colmo, número de fileiras, grãos por fileira, massa de cem grãos e produtividade de grãos, pelo software Sisvar® (Versão 5.7), utilizando o teste Tukey a 5% de probabilidade (FERREIRA, 2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análise de variáveis canônicas

Para resumir a variabilidade observada entre cada grupo de atributos, foi realizada a análise de variáveis canônicas (Figura 2).



**Figura 2.** Análise de variáveis canônicas entre os tratamentos: testemunha (1), nitrogênio (2), *Azospirillum brasilense* 1 sozinho e associado a N (3 e 5), *Azospirillum brasilense* 2 sozinho e associado a N (4 e 6) e as variáveis: altura de plantas (ALT), diâmetro de colmo (DIAM), número de fileiras (NFIL), grãos por fileira (GFIL), clorofila (CLOR), massa de cem grãos (M100G), produtividade de grãos (PROD), carbono da biomassa microbiana (CBM), respiração basal do solo (RBS), quociente metabólico ( $qCO_2$ ), porcentagem de colonização micorrizas (MIC), densidade de esporos micorrízicos (ESP).

A análise de variáveis canônicas foi utilizada para verificar a contribuição de cada variável para a diferença entre os tratamentos. A primeira variável canônica (Can1) reteve 72,6% da variabilidade total dos tratamentos com dois diferentes cepas de *Azospirillum brasilense* aplicadas via foliar isoladamente e associadas a nitrogênio mineral. Enquanto a segunda variável canônica (Can2) foi de 19,6% dessa variação. Essas duas variáveis canônicas acumularam 92,2% da variabilidade total, permitindo uma interpretação precisa em gráfico bidimensional (Figura 2).

Na Figura 2, observa-se que as variáveis quociente metabólico e colonização micorrízica ficaram mais próximos ao tratamento 1 (Testemunha). Isso pode ter ocorrido devido a não fertilização de N e a não inoculação com *Azospirillum brasilense* no tratamento Testemunha, tendo em vista que a adição de fertilizante mineral ao solo alterar dos índices de qualidade microbiológicos, evidenciando o estresse da fertilização sobre as comunidades microbianas, provocando a não estimulação dos microrganismos e consequente diminuição do carbono da biomassa (TEJADA et al. 2002).

Assim, na análise canônica das variáveis, os tratamentos que foram inoculados com *Azospirillum brasilense*, independente da cepa, e os que receberam nitrogênio mineral não se aproximaram dessas variáveis, quociente metabólico e colonização micorrízica, porque mesmo em pequena escala, as alterações das propriedades químicas do solo influenciam na composição e atividade da biomassa microbiana do solo (DIACONO; MONTEMURRO, 2015).

Já a variável clorofila esteve mais aproximada do tratamento 3 (Azos 1) (Figura 2). Isso mostra que a inoculação foi eficaz em aumentar o teor de clorofila. Tendo em vista que a inoculação com *Azospirillum brasilense* aumenta o teor de clorofila e pigmentos de fotoproteção, melhora a condutância estomática e eleva a produção de biomassa (BULEGON et al., 2017).

Outro ponto importante que explica por que o teor de clorofila ficou mais próximo do tratamento contendo a *Azospirillum brasilense* cepa Ab-V5, foi devido ao seu modo recomendado de aplicação, via foliar (BRASIL, 2020). Tendo em vista que a clorofila, geralmente, correlaciona-se positivamente com o teor de N foliar, devido a esse nutriente constituir parte de sua molécula (CARVALHO et al., 2012).

O destaque da cepa Ab-V5 de *Azospirillum brasilense* em relação a cepa Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* e ao nitrogênio mineral no aumento da clorofila, se deve em função da especificidade desse produto, sendo a aplicação de *Azospirillum brasilense* cepa Ab-V5 recomendada exclusivamente via foliar (BRASIL, 2020).

Os tratamentos 4 e 5 foram iguais entre si (Figura 2), e a variável de destaque para essa semelhança foi a M100G, mostrando que tanto aplicações isoladas de *Azospirillum brasilense* cepa Ab-V5 e Ab-V6 (Trat. 4) e *A. brasilense* Ab-V5 aplicada em associação com nitrogênio mineral (Trat. 5) foram eficazes no aumento da massa de cem grãos. O nitrogênio é o nutriente que mais influência na produtividade de grãos (SILVA et al., 2013), devido ao seu papel fundamental como constituinte essencial dos aminoácidos, principais integrantes de proteínas no milho (GONÇALVES et al., 2016).

O tratamento com nitrogênio mineral (Trat. 2) e *Azospirillum brasilense*, cepas Ab-V5 e Ab-V6 aplicada em associação com nitrogênio mineral (Trat. 6) não se destacaram quanto a nenhuma variável analisada (Figura 2).

#### **Análise de variância dos parâmetros de produtividade**

Os resultados da análise de variância para a altura de plantas, diâmetro do colmo, número de fileiras por espiga, número de grãos por fileiras, massa de 100 grãos e produtividade da cultura do milho, avaliados neste estudo, estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 04.** Resumo da análise de variância para a altura da planta, diâmetro do colmo, número de fileiras por espiga, número de grãos por fileiras, massa de 100 grãos e produtividade da cultura do milho com aplicação foliar de *Azospirillum brasilense* cepa Ab-V5 e *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 associada ou não adubação nitrogenada (ureia). Chapadão do Sul – MS, safra 2021/22. Fundação Chapadão, 2022.

FV	GL	Quadrado médio					
		Altura de Planta	Diâmetro de colmo	Nº fileira por espiga	Nº grão por fileira	Massa de 100 grãos	Produtividade
Bloco	3	0,02 <sup>ns</sup>	0,13 <sup>ns</sup>	0,12 <sup>ns</sup>	1,08 <sup>ns</sup>	0,37 <sup>ns</sup>	78,98 <sup>ns</sup>
Tratamento	5	0,00 <sup>ns</sup>	2,08 <sup>*</sup>	0,89 <sup>ns</sup>	2,62 <sup>*</sup>	4,47 <sup>*</sup>	1090,22 <sup>*</sup>
Resíduo	15	0,01	0,40	0,54	0,72	1,31	123,86
Total	23	-	-	-	-	-	-
CV (%)	-	4,87	3,24	4,68	2,10	3,35	5,51

<sup>ns</sup>não significativo (P > 0,05); <sup>\*</sup>Significativo (P > 0,05); FV: Fonte de Variação; CV: coeficiente de variação; GL: Graus de Liberdade.

Foram observados resultados significativos nos tratamentos para as variáveis diâmetro do colmo, número de grãos por fileiras, massa de 100 grãos e produtividade de grãos (Tabela 4). Para as variáveis altura de plantas e número de fileira por espiga não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos avaliados (Tabela 4).

O N tem participação direta na divisão e expansão celular e no processo fotossintético, influenciando na altura de planta (TAIZ et. al., 2017). Neste estudo, mesmo o tratamento sem adição de N mineral e sem inoculação com as bactérias diazotróficas (Testemunha) apresentou resultado satisfatório para altura do milho, que pode ter ocorrido em função da disponibilidade de N no solo, verificado pelo teor de matéria orgânica da área experimental (Tabela 1), que liberam carbono, nitrogênio e outros componentes simples durante o processo de decomposição (BARROS, 2013), convertendo elementos na forma orgânica em formas inorgânicas disponíveis para as plantas (FRANCO et al., 2022) promovendo crescimento das plantas.

**Tabela 05.** Altura de plantas (m), diâmetro do colmo (mm), número de fileiras por espiga e grãos por fileiras, massa de 100 grãos (g) e produtividade (kg ha<sup>-1</sup>) do milho com aplicação foliar de *Azospirillum brasilense* cepa Ab-V5 e *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 associada ou não adubação nitrogenada. Chapadão do Sul – MS, safra 2021/22. Fundação Chapadão, 2022.

Tratamentos	Altura de Planta	Diâmetro de colmo	Nº fileira por espiga	Nº grão por fileira	Massa de 100 grãos	Produtividade
<b>Testemunha</b>	2,27 a	19,52 ab	15,00 a	40,40 ab	32,24 b	11.721,00 bc
<b>Nitrogênio</b>	2,33 a	19,52 ab	15,73 a	41,71 a	34,21 ab	11.289,70 a
<b>Azo 1</b>	2,29 a	20,06 a	15,92 a	40,12 ab	33,10 a	10.831,80 a
<b>Azo 2</b>	2,34 a	19,41 ab	15,95 a	40,16 ab	33,80 ab	12.035,70 a
<b>Azo 1 + N</b>	2,32 a	20,52 a	15,66 a	40,44 ab	35,28 ab	12.028,80 ab
<b>Azo 2 + N</b>	2,29 a	18,37 b	16,44 a	39,20 b	33,69 ab	10.526,60 c
<b>CV (%)</b>	4,87	3,24	4,68	2,10	3,35	5,51

>Aplicação sequencial. CV: coeficiente de variação. Médias seguidas de mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05). *Azospirillum brasilense*-Ab-V5 produto comercial Azos. Azo 2: *Azospirillum brasilense*-Ab-V5 e Ab-V6 produto comercial Azotrop.

Os maiores diâmetros de colmo foram observados nos tratamentos Azo 1 e Azo 1 + N em relação ao Azo 2 + N, sendo semelhantes aos demais tratamentos. Esse resultado pode ser explicado devido à produção de substâncias promotoras de crescimento pelas bactérias. Os

fitormônios, principalmente o ácido indol-acético (AIA), excretados por *Azospirillum* desempenham papel essencial na promoção do crescimento de plantas em geral, estimulando seu crescimento e aumentando sua produção (HUNGRIA, 2011).

O aumento do diâmetro de colmo é uma característica morfológica vantajosa, por estar relacionada com o percentual de acamamento e quebra de planta na cultura do milho. Além disso, com maior diâmetro de colmo acontece maior capacidade da planta em armazenar fotoassimilados, que contribuirão no enchimento dos grãos, importante na obtenção de alta produtividade (KAPPES et al., 2011).

Na avaliação do número de grãos por fileira, o tratamento com aplicação de nitrogênio apresentou maior média em relação ao tratamento Azo 2 + N. Ressalta-se com esse resultado, que as aplicações isoladas de N e *A. brasilienses* não diferiram entre si (Tabela 5). A bactéria *A. brasilienses* produz metabólito, ácido indol acético, como respostas fisiológicas a inoculação de *Azospirillum* na planta de milho, melhorando os parâmetros fotossintéticos (HUNGRIA, 2011), como maior concentração de clorofila nas folhas, resultando captação de energia luminosa e transformando em fotoassimilados diretamente relacionado com a constituição dos grãos (TAIZ et. al., 2017).

Para a massa de 100 grãos, a maior média foi observada no tratamento com a utilização do tratamento Azo 1 em relação à testemunha, não diferindo dos demais tratamentos (Tabela 5). O destaque do tratamento com Azo 1 aplicado isolado, pode ser em função do polímero carboximetilcelulose em sua composição (BRASIL, 2020). A carboximetilcelulose é um éter derivado da celulose e não tóxico (TABARI, 2017), possui em sua estrutura química grupos funcionais como, hidroxilas e ácidos carboxílicos que promovem sua solubilidade em água (EBRAHIMZADEH et al., 2016). A solubilidade do fertilizante em água facilita a aplicação e a absorção de nutrientes pelas plantas (CHIEN et al., 2009).

A grande contribuição do *Azospirillum brasilense* para as plantas são os metabólitos que a bactéria produz, que estimulam o crescimento das plantas por diversas maneiras, por atuarem em todos os aspectos de vida das plantas como desenvolvimento (HUNGRIA, 2011; VITTO et. al., 2022) e nutrição (RAMASAMY et al., 2011; DHAWI et al., 2015),

As maiores produtividades foram constatadas nos tratamentos com Nitrogênio, Azo 1 e Azo 2 em relação à Testemunha e Azo 2 + N (Tabela 5). Interessante observar, que as aplicações isoladas de bactérias *A. brasilense* mostraram-se mais eficientes do que associadas às fontes nitrogenadas. Isso pode ser explicado devido ao nitrogênio disponível as plantas, liberados no processo de decomposição da matéria orgânica presente no solo (Tabela 1). Além do N disponível as plantas, os componentes orgânicos podem ser usados como fontes de carbono e



energia pelos micro-organismos, onde a atividade microbiana é particularmente intensa na rizosfera (CHAUHAN et al., 2015).

Outra explicação referente a melhor resposta dos tratamentos com *A. brasilense* quando aplicado isolado, é sobre o efeito do N mineral sobre as bactérias. Quando aplicado *A. brasilense* associado ao N na forma mineral de ureia, o efeito da inoculação com *Azospirillum* é anulado (HUNGRIA, 2011).

A adição de fertilizantes nitrogenados promove maior desenvolvimento do milho (REPKE et al., 2013) contribuindo para maior produtividade. Porém, as respostas positivas das aplicações foliares com *A. brasilense* sobre a produtividade, ressalta o papel significativo das bactérias diazotróficas no desempenho da cultura do milho, demonstrando potencial de utilização dessa tecnologia (KAPPES et al., 2013).

## CONCLUSÕES

A aplicação foliar de *Azospirillum brasilense* de forma isolada proporcionou maiores valores para diâmetro de colmo, massa de cem grãos e produtividade de grãos, assemelhando-se a adubação com nitrogênio mineral.

## REFERÊNCIA

ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995, 576p. ISBN: 9780125138406

ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K. H. The metabolic quotient ( $qCO_2$ ) as specificactivity parameter to assess the effects of environment conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 393-395, 1993.

BARROS, J. D. S. Contribuições da matéria orgânica do solo para mitigar as emissões agrícolas de gases de efeito estufa. **Polêmica**, v. 12, n. 2, 2013.

BHERING, L. L. Rbio: A tool for biometric and statistical analysis using the R platform. **Crop Breeding and applied biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 187-190, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Azos - Inoculante formulado com a bactéria *Azospirillum brasilense* Ab-V5**. Registro no MAPA MG 001648-9.000001. Titular do Registro Laboratório de Bio Controle Farroupilha Ltda / Grupo Lallemand), 2020.

BULEGON, L. G. et al. Atividade enzimática, troca gasosa e produção de soja co-inoculada com '*Bradyrhizobium japonicum*' e '*Azospirillum brasilense*'. **Aust J Crop Sci**, v.11, p. 888 - 896, 2017.

CARMO, K. B. et al. Desempenho agrônômico do milho safrinha em resposta a doses de nitrogênio combinadas com inoculante biológico em Mato Grosso. **Scientific Electronic Archives**, v.13, n.7, p.95-101, 2020.

CARVALHO, M. A. F. et al. **Utilização do clorofilômetro para racionalização da adubação nitrogenada nas culturas do arroz e do feijoeiro**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2012.

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

CHAUHAN, H. et al. Novel plant growth promoting rhizobacteria prospects and potential. **Applied Soil Ecology**, n. 95, p. 38-53, 2015.

CHIEN, S. H. et al. Recent developments of fertilizer production and use to improve nutrient efficiency and minimize environmental impacts. **Advances in Agronomy**, v. 102, p. 267-322, 2009.

CHIEZA, E. D. et al. Produção e aspectos econômicos de milho consorciado com *Crotalaria juncea* L. em diferentes intervalos de semeadura sob manejo orgânico. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 64, n. 2, p. 189-196, 2017.

COELHO A. M. et al. **Adubação Mineral**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 2021. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/milho/producao/manejo-do-solo-e-adubacao/adubacao-e-fertilidade-do-solo/adubacao-mineral>>. Acesso em: 10/10/2022.

COSTA, S. M. L.; MELLONI, R. Relação de fungos micorrízicos arbusculares e rizobactérias no crescimento de mudas de oliveira (*Olea europaea*). **Ciência Florestal**, v. 29, n. 1, p. 169-180, 2019.

CUNHA, F. F. et al. Métodos para estimativa da evapotranspiração de referência para Chapadão do Sul – MS. **Engenharia na Agricultura**, v. 21, p. 159-172, 2013.

DIACONO, M.; MONTEMURRO, F. Effectiveness of organic wastes as fertilizers and amendments in saltaffected soils. **Agriculture**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 221230, 2015.

DHAWI, F. et al. Mycorrhiza and PGPB modulate maize biomass, nutrient uptake and metabolic pathways in maize grown in mining-impacted soil. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 97, p. 390-399, 2015.

EBRAHIMZADEH, S. et al. Physical properties of carboxymethyl cellulose based nanobiocomposites with Graphene nano-platelets. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 84, p. 16–23, 2016.

FERREIRA, D. F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia** [online]. v.35, n.6, p. 1039-1042, 2011. ISSN 1413-7054.

FRANCO, T. C. et al. Seleção de bactérias promotoras do crescimento vegetal produtoras de enzima: Efeito na decomposição de resíduos orgânicos. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 3, p. 2022.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques to measure vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, v. 84, n. 1, p. 484-500, 1980. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x

GONÇALVES, A. K. A. et al. Manejo de adubação nitrogenada em milho solteiro e em consorciado com brachiaria ruziziensis. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 15, n. 2, p. 318–327, 2016.

GRACE, C.; STRIBLEY, D. P. A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycological Research**, v. 95, n. 1, p. 1160-1162, 1991.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense***: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 38 p. (Embrapa Soja. Documentos, 325).

JENKINSON, D. S.; LADD, J. M. **Microbial biomass in soil: measurement and turnover**. IN: PAUL, E. A.; LADD, J. M. (Ed.). Soil biochemistry. New York: Marcel Dekker, v. 5, p. 415-471, 1981.

KAPPES, C. et al. Desempenho de híbridos de milho em diferentes arranjos espaciais de plantas. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 2, p. 334-343, 2011.

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

KOPPERT. AZOTROP. Folder. 2022. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgiclfndmkaj/https://www.instaagro.com/media/attachment/file/f/o/folder\_azokop.pdf>. Acesso em: 28/12/2022.

KOSKE, R. E.; GEMMA, J. N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, v. 92, n.1, p.486-488, 1989. DOI: 10.1016/S0953-7562(89)80195-9

LIANG, C. et al. The importance of anabolism in microbial control over soil carbon storage. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 1–6, 2017.

MACHADO, R. W. B. et al. Inoculação foliar de plantas de milho com *Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense*. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v.17, n.34; p. 289-298, 2020.

MELHORANÇA, A. L.; KARAM, D. **Tratos Culturais**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/milho/producao/tratos-culturais>. Acesso em: 10/10/2022.

MOREIRA, R. C. et al. Desempenho agrônômico do milho em função da inoculação com *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada. **Revista de Ciências Agrárias: Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, 62, p. 1-9, 2019.

RAMASAMY, K. et al. Synergistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural production. **Korean Journal of Soil Science and Fertilizer**, v. 44, n. 4, p. 637-649, 2011.

REIS, C. R. G. et al. Biological nitrogen fixation across major biomes in Latin America: Patterns and global change effects. **Science of The Total Environment**, v. 746, 140998, 2020.

REPKE, R. A. et al. Eficiência da *Azospirillum brasilense* combinada com doses de nitrogênio no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.12, n.3, p. 214-226, 2013.

ROSCOE, M; MIRANDA, S. A. R. **Fixação biológica de nitrogênio e promoção de crescimento em milho safrinha**. Maracaju, MS, 2010.

SANTOS, H. G. et al. Sistema brasileiro de classificação de solos, 2ª ed. rev. ampl; Embrapa Solos: Brasília, Brasil, 356p. 2018.

SILVA, F. C. et al. Aplicação de nitrogênio no cultivo de milho, sob sistema plantio direto: efeitos na qualidade física do solo e características agrônômicas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 3513-3528, 2013.

TABARI, M. Investigation of carboxymethyl cellulose (CMC) on mechanical properties of cold-water fish gelatin biodegradable edible films. **Foods**, v. 6, n. 6, p. 41, 2017.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6<sup>th</sup> ed. Artmed, 2017.

TEJADA, M. et al. Nitrogen mineralization in soil with conventional and organomineral fertilization practices. **Communications in soil science and plant analysis**, [s. l.], v. 33, n. 1920, p. 36793702, 2002.

VANCE, E. D. et al. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 9, n. 1, p. 703-707, 1987. DOI: 10.1016/0038-0717(87)90052-6

VERONEZI, S. D. F. et al. Uso de *Azospirillum brasilense* em milho safrinha solteiro e consorciado com *Brachiaria ruziziensis*. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 12, n. 4, p. 349-360, 2018.

VITTO, D. C. et al. Produção e produtividade de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* fertilizado com cama de frango. **Nativa**, v. 10, n. 4, p. 477-485, 2022.