INOCULAÇÃO DE *Bacillus subtilis* E *Azospirillum brasilense* NA CULTURA DO MILHO

Rita de Cássia Lima Mazzuchelli[1]; Bruno Ferrari Sossai[2]; Fabio Fernando de Araujo[3].

Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, [1,3]Programa de Pós Graduação em Agronomia, [2,3]Especialização em Integração lavoura pecuária floresta, Presidente Prudente – SP. E-mail: bfs_sossai@yahoo.com.br , ritamazzuchelli@yahoo.com.br

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da inoculação de *Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense* no crescimento e na produção de milho. O experimento foi conduzido no município de São Jorge do Ivaí, durante o período de abril a agosto de 2013, em delineado no esquema de blocos casualizados, com cinco tratamentos e quatro repetições. T1 – Controle; T2 – *Bacillus subtilis* em suspensão aquosa (1L ha^{-1}) no sulco de semeadura; T3 – *Bacillus subtilis* em pó (1 kg ha^{-1}) inoculado nas sementes; T4 – *Azospirillum* (100 mL ha^{-1}) inoculado nas sementes; T5 – *Azospirillum* (100 mL ha^{-1}) + *Bacillus* (1L ha^{-1}) no sulco. Foram realizadas análises de nematoides nas raízes do milho, massa fresca da parte aérea, peso da espiga e altura de plantas e avaliado o rendimento da cultura. Foi utilizado o programa Sisvar para realização da analise estatística. Para análise de variância foi utilizado o teste F e Tukey (5%) para comparação das médias. Não houve controle populacional dos fitonematoides avaliados durante a condução do experimento. A utilização de *Bacillus subtilis* possibilitou um desenvolvimento da massa fresca da parte aérea em aproximadamente 15% do milho no cultivo safrinha. O uso de *Azospirillum brasilense* nas sementes aumentou em 21,9% a produtividade do milho, quando comparados ao tratamento controle.

Palavras-chave: rizobactérias; produtividade; *Zea mays*.

INOCULATION OF *Bacillus subtilis* AND *Azospirillum brasilense* ON GROWTH AND YIELD OF CORN

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on growth and yield of corn. The experiment was conducted in the municipality of São Jorge Ivaí during the period April to August 2013 in outlined in a randomized block design with five treatments and four replications. T1 - Control; T2 - *Bacillus subtilis* suspended in water (1 L ha-1) at sowing; T3 - *Bacillus subtilis* powder (1 kg ha^{-1}) inoculated seeds; T4 - *Azospirillum* (100 mL ha^{-1}) inoculated seeds; T5 - *Azospirillum* (100 mL ha^{-1}) + *Bacillus* (1 L ha^{-1}) in the groove. Analysis of nematodes in the roots of corn, fresh weight of shoots, ear weight and plant height were performed and evaluated crop yield. Sisvar the program to conduct statistical analysis was used. For the analysis of variance F and Tukey test (5%) for comparison of means was used. There was no population control of plant nematodes evaluated during the experiment. The use of *Bacillus subtilis* has supported development of the fresh weight of shoots in approximately 15% of corn in the off-season cultivation. The use of *Azospirillum brasilense* in the seeds increased by 21.9% corn yield compared to the control treatment.

Keywords: rhizobacteria; productivity; *Zea mays*.

INTRODUÇÃO

Em função do potencial produtivo do milho, a sua composição química e valor nutritivo constituem-se em um dos mais importantes cereais cultivados e consumidos no mundo. Devido a sua multiplicidade e aplicações, na alimentação humana ou na alimentação animal, assume relevante papel socioeconômico, além de constituir-se em indispensável matéria-prima, impulsionadas de diversificados complexos agroindustriais (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000).

A utilização do milho em grão como alimentação animal representa cerca de 70% em todo o mundo. Nos Estados Unidos 50% são destinados para essa finalidade, enquanto no Brasil o seu percentual varia entre 60 a 80% (GODOY, 2002). Após o trigo e do arroz, o milho (*Zea mays* L.) é o cereal mais cultivado no mundo (FAO, 2008).

O crescimento e a produtividade do milho são em função do potencial genético para reagir às condições ambientais as quais ele está submetido. O ambiente fornece a maior influência sobre estes fatores, mas o produtor pode utilizar práticas eficientes para a obtenção de maiores produtividades, aumentando consequentemente o lucro (RITCHIE et al., 2003). Há necessidade de sementes de milho de alta qualidade, já que a base da alta produção está diretamente relacionada com o estabelecimento das plantas no campo (MACHADO et al., 2001).

O milho é uma cultura que está presente em todas as regiões brasileiras, nos últimos anos, os custos de produção aumentaram. As utilizações de técnicas que proporcionem economia, sem perda de produtividade agrícola, podem incentivar seu cultivo que é de grande importância no país para pequenos e grandes produtores (SILVA; SOUZA, 2007).

A inoculação com *Azospirillum amazonense* no cultivo do milho promove a maior produção de matéria seca e acúmulo de nitrogênio nas raízes, é uma bactéria promotora do crescimento de plantas, realiza a fixação biológica do nitrogênio, indicando desta forma sua inoculação, na cultura do milho e outras gramíneas (REIS JUNIOR et al., 2008). Devem ser considerados os benefícios por menor poluição ambiental que resulta da produção e utilização de fertilizantes nitrogenados, bem como pela redução na emissão de gases de efeito estufa. Desse modo, além da economia para os agricultores, o uso de inoculantes contendo *Azospirillum* contribui para o ambiente e pode ser objeto de negociações futuras no comércio de créditos de carbono (CORREA et al., 2008).

Nematoides do gênero *Meloidogyne* acarretam grandes danos ao sistema radicular das plantas. Estes parasitas injetam toxinas e também provocam deformações conhecidas como “galhas”, acarretando,

enfim em baixo desenvolvimento e pouca eficiência das raízes, consequentemente ocorrem reduções na produtividade (DINARDO-MIRANDA, 2005). Os nematoides do gênero *Pratylenchus* são conhecidos como nematoides das lesões radiculares. Estes parasitas penetram e saem livremente das raízes, já que não há nenhuma fase ou estágio que possa ser denominado infestante. Este parasitismo acarreta em aberturas nas raízes, onde podem penetrar bactérias e fungos patogênicos. Os nematoides deste gênero abandonam o sistema radicular quando encontram condições desfavoráveis, migrando para o solo (GOULART, 2008).

O *Bacillus subtilis*, é uma bactéria habitante natural do solo, que produz antibióticos, enzimas e fito hormônios que vai proporcionar benefícios para as plantas. É uma espécie microbiana, também descrita como rizobactéria promotora de crescimento de plantas. A rizobactéria promotora de crescimento de plantas é um agentes potencial para controle biológico de fitopatógenos, como por exemplo, os nematoides (KLOEPPER et al., 1999). Essas rizobactérias podem acabar ou controlar as doenças por modos de ação: por antagonismo relacionado à produção de antibióticos antifúngicos como iturina em *B. subtilis* (ARAÚJO et al., 2005).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da inoculação de *Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense* no crescimento e na produção de milho safrinha no norte do Paraná.

METODOLOGIA

O experimento foi conduzido no município de São Jorge do Ivaí, latitude 23º 25’ 58” S, longitude 52º 17’ 35”W, altitude 430 m, no noroeste do Paraná, durante o período de abril a agosto de 2013 (cultivo safrinha). O clima da região climática classificada, segundo o modelo de Köppen, como do tipo Cfa. O solo é classificado como Latossolo Roxo eutrófico com A moderado textura argilosa, e o relevo suave ondulado, apresentando o seguinte perfil de fertilidade (RAIJ et al., 2001): pH $CaCl_2$ = 5,1; pH (H_2O) = 5,8; pH(SMP) = 6,30; H+ Al = 3,1 $_c$mol; Al= 0 $_c$mol; Ca= 68 mmolc dm^{-3}; Mg= 18 mmolc dm^{-3}; K = 7,5 mmolc dm^{-3}; P (Mehlich) = 11,0 mg dm^{-3}; P(Resina) = 21,0 mg dm^{-3}; M. O. = 3,3 g dm^{-3}; SB = 93,5 mmol; CTC = 124,5 cmol; V% = 75,10. O clima da região é classificado segundo o modelo de Köppen, como do tipo Cfa, com precipitação anual média de 1875,4 mm. O experimento foi delineado no esquema de blocos casualizados. As parcelas possuíam 20 m de comprimento por 5,40 m de largura, totalizando 108 m² por parcela, sendo quatro blocos, em cada bloco os 5

tratamentos se alternavam, a área total conduzida foi de 2160m².

Foram definidos os seguintes tratamentos, com quatro repetições:

T1 – Controle;

T2 – *Bacillus subtilis* em suspensão aquosa (1L ha^{-1}) no sulco de semeadura;

T3 – *Bacillus subtilis* em pó (1 kg ha^{-1}) inoculado nas sementes;

T4 – *Azospirillum* (100 mL ha^{-1}) inoculado nas sementes;

T5 – *Azospirillum* (100 mL ha^{-1}) + *Bacillus* (1L ha^{-1}) no sulco de semeadura.

Para inoculação com *Bacillus subtilis* foi utilizado um produto comercial em pó (FATEC) contendo a concentração de 1,0 x 10^8 células por grama. Para inoculação do *Azospirillum* foi utilizado inoculante comercial contendo a concentração de 1,0x10^9 células por mL.

A semeadura do milho foi realizada no dia vinte e três de março de 2013, a semente utilizada foi da cultivar Pionner 34 31 Híbrido simples. A semeadura foi feita com uma semeadora de seis linhas, com espaçamento entre linhas de noventa centímetros, sendo regulada para distribuir 5,2 sementes por metro linear, com adubação na base com formulação 08-20-20 com a dose de 300 kg por hectare. Na semeadora havia acoplado um equipamento para a inoculação direta no sulco de semeadura, sendo utilizado para o tratamento com a aplicação de *Bacillus subtilis* em suspensão aquosa (1L ha^{-1}) e *Azospirillum* (100 mL ha^{-1}) com *B. subtilis* (1L ha^{-1}), os dois tratamentos consistiam na diluição do produto em água, na dosagem de 300 L de volume de calda ha^{-1}.

Após a semeadura foram retiradas amostras de solo, e encaminhadas ao laboratório de Microbiologia da Unoeste para a quantificação de nematoides, encontrando em média 500 nematoides a cada 100 g de solo. Durante a condução do experimento foram efetuadas avaliações do crescimento das plantas e índice populacional de nematoides. Aos 60 dias foram retiradas amostras de raízes para a quantificação e identificação de nematoides. Aos 120 dias após o plantio foram realizadas análises de massa fresca da parte aérea, peso da espiga e altura de plantas.

No final do ciclo da cultura, aos 137 dias após o plantio, foi avaliado o rendimento considerando a produção de grãos na área útil das parcelas, em 4 linhas espaçadas a 0,9 m, com 20 m de comprimento, totalizando 72 m^2.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, através do programa computacional Sistema de Análise de Variâncias - SISVAR (FERREIRA, 2000), sendo as médias comparadas pelo teste Tukey.

RESULTADOS

A análise de nematoides nas raízes do milho indicou que os tratamentos efetuados com as rizobactérias não mostraram diferenças significativas na população de nenhum dos gêneros de nematoides presentes na área do cultivo (Tabela 1).

Tabela 1. Nematoides dos gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus* em 20g de raízes, com inoculação de *Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense* na semente e no sulco de semeadura para o cultivo de milho.

Tratamentos	*Meloidogyne*	*Pratylenchus*	Ovos
Bacillus subtilis no sulco	160,0 a	80,0 a	160,0 a
Bacillus subtilis na semente	120,0 a	80,0 a	160,0 a
Azospirillum brasilense na semente	160,0 a	120,0 a	160,0 a
Azospirillum com *Bacillus subtilis*	160,0 a	80,0 a	80,0 a
Controle	320,0 a	80,0 a	200,0 a
C.V(%)	30,74	28,75	37,22

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (5%)

A análise da altura das plantas de milho indicou um maior desenvolvimento das plantas com a realização do tratamento de co-inoculação de *Azospirillum brasilense* com *Bacillus subtilis,* enquanto os demais tratamentos não diferiram significativamente do controle (Tabela 2).

A massa fresca da parte aérea das plantas de milho evidenciou que o tratamento com *Bacillus subtilis* aplicado sulco de semeadura apresentou o maior desenvolvimento das plantas em relação aos outros tratamentos, sendo 14,87% superior ao tratamento controle. A co-inoculação de *Azospirillum* com *Bacillus subtilis* e o tratamento controle apresentaram as menores médias da massa fresca da parte aérea das plantas de milho (Tabela 2).

A massa das espigas de milho foi maior no tratamento com *Bacillus subtilis* aplicado nas sementes, sendo 15,34% superior ao tratamento controle, que apresentou os menores valores de peso de espiga (Tabela 2).

Tabela 2. Altura das plantas em metro, aos 120 dias após o plantio, com inoculação de *Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense* na semente e no sulco de semeadura para o cultivo de milho.

Tratamentos	Altura - m	MFPA - kg	Peso da espiga - kg
Bacillus subtilis no sulco	1,91 b	0,518 a	0,410 ab
Bacillus subtilis na semente	1,91 b	0,503 ab	0,417 a
Azospirillum brasilense na semente	1,92 ab	0,476 bc	0,379 c
Azospirillum com *Bacillus subtilis*	1,97 a	0,450 c	0,396 bc
Controle	1,88 b	0,441 c	0,353 d
C.V(%)	3,03	9,37	5,94

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (1%).

A produtividade do milho foi maior no tratamento com a inoculação de *Azospirillum brasilense* nas sementes, aumentando a produtividade do milho em cerca de 12 sacas por hectare, uma superioridade de 21,9% em relação ao tratamento controle (Tabela3).

Tabela 3. Produtividade em quilograma por hectare, com inoculação de *Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense* na semente e no sulco de semeadura para o cultivo de milho.

Tratamentos	Produtividade
Bacillus subtilis sulco	3166,30 ab
Bacillus subtilis semente	3077,48 ab
Azospirillum brasilense semente	3364,03 a
Azospirillum com *Bacillus subtilis*	3146,19 ab
Controle	2626,17 b
C.V(%)	10,47

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (5%).

DISCUSSÃO

Freitas (2001) afirma que rizobactérias podem produzir substâncias tóxicas ou repelentes que podem desestimular a penetração ou alimentação de nematoides nas raízes das plantas. Conforme constatado por Silveira (2001), as rizobactérias podem atuar na infectividade, virulência e agressividade do patógeno, e também nos processos de infecção, desenvolvimento de sintomas e reprodução. Entretanto, as rizobactérias avaliadas no experimento não contribuíram para controlar de maneira significativa a infestação de nematoides nas raízes do milho.

A utilização de rizobactérias promotoras de crescimento em plantas, promovem uma colonização das raízes e estimulam diretamente beneficiamento o crescimento e desenvolvimento de diversas plantas (ROESCH et al., 2007).

Araújo et al. (2009) constatou um maior crescimento da parte aérea de tomate tratado com *Bacillus subtilis*, o que

caracteriza a bactéria como promotora de crescimento de planta, e esse efeito pode ser devido, à produção de fitoreguladores vegetais por *B. subtilis* na rizosfera das plantas (ARAÚJO et al., 2005).

Araújo (2008) avaliando a inoculação de *Bacillus subtilis* no milho, conclui que o *Bacillus subtilis* formulado com a farinha de ostras (BSFO) e inoculado nas sementes de milho apresenta potencial para incrementar o crescimento e a nutrição das plantas. Lima et al. (2011) constatou que a inoculação das sementes com *Bacillus subtilis* melhorou o desenvolvimento e aumentou a produtividade de grãos do milho.

A aplicação de rizobactérias promotoras de crescimento, promovendo benefícios para a agricultura, pois possuem potencial para estimular crescimento, inibição de fitopatógenos, promover a disponibilização de nutrientes, tornando a planta mais resistente a estresses bióticos e abióticos. Estas bactérias quando aplicadas ao solo proporcionam uma produção mais sustentável, com economia de fertilizantes (ARAÚJO, 2008).

CONCLUSÃO

Não houve controle populacional dos fitonematoides avaliados durante a condução do experimento.

A utilização de *Bacillus subtilis* possibilitou um desenvolvimento da massa fresca da parte aérea em aproximadamente 15% do milho no cultivo safrinha. O uso de *Azospirillum brasilense* nas sementes aumentou em 21,9% a produtividade do milho, quando comparados ao tratamento controle.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, F. F.; MARCHESI, G. V. P. Uso de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro. **Ciência Rural**, vol.39, n.5, p. 1558-1561. 2009. http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782009000500039

ARAUJO, F. F.; HENNING, A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 21, p. 1639-1645, 2005. http://dx.doi.org/10.1007/s11274-005-3621-x

ARAÚJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostra e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v.2, p. 456-462, 2008.

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

DINARDO-MIRANDA, L. L. Nematoides e pragas de solo em cana-de-açúcar. **Potafos**

Informações Agronômicas, n.110, p.25-32, 2005.

FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 360p. 2000.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The state of food and agriculture**. Rome: FAO, 2008.

FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos**. Anais...** São Carlos: UFSCar, p. 255-258. 2000.

FREITAS, L.G. **Rizobactérias versus nematoides**. 2001. Disponível em: <http://www.ufv.br/dpf/labnematologia/rizo .pdf>. Acesso em: 05 jul. 2014.

GODOY, L. J. G**. Manejo do nitrogênio em cobertura na cultura do milho (*Zea mays* L.) em solo arenoso baseado no índice relativo de clorofila**. 94p. Dissertação (Mestrado em Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

GOULART, A. M. C**. Aspectos gerais sobre nematoides das lesões radiculares (gênero *Pratylenchus*)**. Planaltina: Embrapa, 2008. 27p. (Documentos, n. 219).

KLOEPPER, J.W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R.M. Free-living bac- terial inocula for enhancing crop productivity**. Trends in Biotechnology**, v.7, p.39-43, 1999. http://dx.doi.org/10.1016/0167-7799(89)90057-7

LIMA, F.F.; NUNES, L.A.P.L.; MARCIA DO V. B. FIGUEIREDO, M.V.B.; ARAÚJO, F.F.; LUCIANO M. LIMA, L.M.; ARAÚJO, A.S.F. *Bacillus subtilis* e adubação nitrogenada na produtividade do milho. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 6, 2011.

MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; VIEIRA, M. G. G. C.; ALVES, M. C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p.88-94, 2001.

RAIJ, B. V.; ANDRADE, J. C.; ANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agronômico, 2001.

REIS JUNIOR, F. B. et al. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, Brasília, v. 32, p. 1139–1146, 2008.

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; BENSON, G. O. Como a planta de milho se desenvolve. Piracicaba: Potafos, 2003. Informações Agronômicas, n.103.

ROESCH, L. F. W.; PASSAGLIA, L. M. P.; BENTO, F. M.; TRIPLETT, E. W.; CAMARGO, F. A. O. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.31, n.1367-1380, 2007.

SILVA, D. A.; SOUZA, L. C. F. Análise econômica de sucessões de culturas para milho, com níveis de nitrogênio em cobertura. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.6, n.2, p. 256-262, 2007.

SILVEIRA, E.B. Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. In: MICHEREFF, S.J.; BARROS, R. **Proteção de plantas na agricultura sustentável.** Recife: UFRPE, 2001. p.70-100.