

## Biodiversity of soil bacteria and its applications for a sustainable agriculture

### Aplicações da biodiversidade bacteriana do solo para a sustentabilidade da agricultura

Títulos abreviados:

*Soil bacteria and sustainable agriculture*

*Biodiversidade bacteriana do solo e agricultura sustentável*

**André Luiz Martinez de Oliveira\***; Karita dos Reis Costa; Danielle Cristina Ferreira; Karina Maria Lima Milani; Odair José Andrade Pais dos Santos; Mayara Barbosa Silva; Mónica Yorlady Alzate Zuluaga.

#### ABSTRACT

Brazilian agribusiness is of great competitiveness mostly due to the lack of government subsidies and the historical efforts made in research and development by the public institutes and Universities. Nevertheless the Brazilian agriculture is fundamented in the use of fertilizers and agrochemicals that needs to be imported in huge amounts to supply the Brazilian farmers. In this sense, the safety and sustainability of the Brazilian agribusiness is subjected to the supply of these inputs and to the prices prevailing on the international market. In addition, a new concern is emerging in the global society, which has increased demands for food, feed, and energy that must be provided by the agriculture, although new sustainable farming practices urge to be implemented. Natural relationships between plants and soil microbes are on the heart of the matter, with growing scientific data supporting the use of the former-potential plant-bacteria associations in large scale to increase the crop productivity and hence the production of food and energy. The total substitution of nitrogen fertilizers in soybean crops by the biological nitrogen fixation held by rhizobia corroborates the efficiency of such associations, and point out for the need to expand this and other natural mechanisms directed to provide nutrients to cereals and other non-leguminous crops. To achieve this, much effort is also needed to reach a better understanding of the mechanisms controlling plant-bacteria associations, and to develop biofertilizer formulations presenting a high efficiency under a myriad of field conditions, as those found in Brazil. Biotechnological approaches aimed to reach this goal are reviewed and discussed throughout this manuscript.

**Keywords:** Biofertilizer, plant growth-promoting bacteria, plant nutrition, plant inoculation.

*Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), km 380, Campus Universitário, Cx. Postal 6001, CEP 86057-970, Londrina, Paraná, Brasil. \*Autor para correspondência: Telefone: (43) 33715473, Fax: (43)33714440, email: [almoliva@uel.br](mailto:almoliva@uel.br)*

#### RESUMO

O agronegócio brasileiro possui grande competitividade internacional, principalmente pelos esforços historicamente dispendidos por institutos públicos de pesquisa e Universidades. No entanto, muito dos avanços obtidos pelo agronegócio brasileiro é decorrente do uso em larga escala de fertilizantes e agroquímicos, que devem necessariamente ser importados em grandes quantidades para suprir a demanda dos agricultores brasileiros. Neste sentido, a segurança e a sustentabilidade do agronegócio brasileiro estão ameaçadas pela disponibilidade e susceptibilidade destes insumos aos preços praticados pelo mercado internacional. Além disso, a sociedade global apresenta uma nova apreensão quanto à necessidade de alcançar produtividades mais elevadas e de uma maneira mais sustentável, para prover a população crescente com alimentos e energia. As relações naturais existentes entre as plantas e a microbiota do solo estão no cerne desta questão, uma vez que a quantidade de informações científicas disponibilizadas pela literatura mundial dando suporte à utilização destas associações em benefício da produção de alimentos e energia é crescente. A substituição total do uso de fertilizantes nitrogenados pela fixação biológica de nitrogênio realizada pelos rizóbios, nos cultivos de soja conduzidos no Brasil, corrobora a eficiência destas associações e imprimem a necessidade de expandir os mecanismos relacionados com o suprimento de nutrientes para diferentes culturas não-leguminosas. Para o alcance destes objetivos, são necessários ainda muitos esforços de pesquisa para um melhor entendimento dos mecanismos que controlam as interações naturais entre plantas e a microbiota associativa, como também para o desenvolvimento de formulações de biofertilizantes que apresentem uma elevada eficiência sob uma grande variedade de condições edafoclimáticas, como as que ocorrem no Brasil. Algumas abordagens biotecnológicas dirigidas para o alcance destes objetivos estão compiladas e discutidas ao longo desta revisão.

**Palavras-chave:** Biofertilizante, bactérias promotoras do crescimento vegetal, nutrição vegetal, inoculação de plantas.

## INTRODUÇÃO

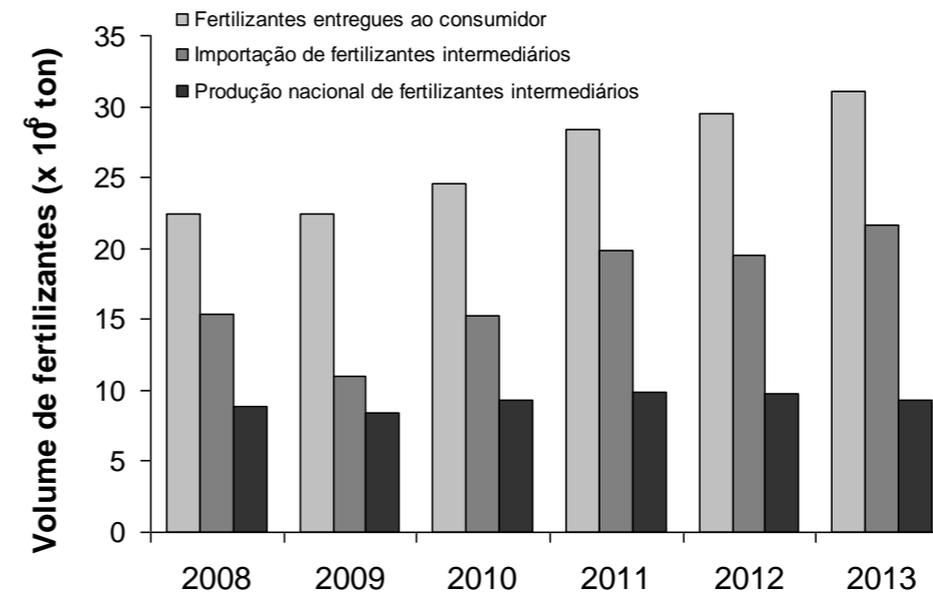
O crescente interesse pelo uso de tecnologias que promovam o desenvolvimento sustentável vem ao encontro das necessidades prementes da sociedade global. Os sistemas agrícolas de produção assumiram historicamente a manutenção da produtividade ao longo do tempo como conceito de sustentabilidade. Atualmente este conceito evoluiu e surge como uma característica dinâmica a ser analisada e medida, envolvendo fatores físicos, bióticos, econômicos e sociais (GOMES et al., 2009). Portanto, a sustentabilidade de ecossistemas está diretamente relacionada com o fluxo da energia no sistema ao longo do tempo, sendo esta energia renovável ou não (BROWN e ULGIATI, 1997). Desta maneira, o desenvolvimento e implementação de técnicas que garantam a perpetuação da atividade agrícola sob seus diferentes aspectos são uma obrigação, principalmente àquelas direcionadas a sistemas de manejo dependentes de grande aporte de insumos externos à propriedade.

A agricultura brasileira é voraz no consumo de fertilizantes, sendo o quarto maior consumidor mundial. Entretanto nosso país encontra-se dependente da disponibilidade e dos preços destes insumos praticados pelo mercado internacional, uma vez que a produção nacional de fertilizantes supre cerca de 33% do mercado. Aliado a isso, o cenário atual é de aumento contínuo do consumo de fertilizantes segundo da Associação Nacional para Difusão de Adubos (ANDA), enquanto a produção de fertilizantes no Brasil está praticamente estagnada desde 2010. Considerando o período de janeiro a dezembro de 2013, houve incremento de 5,2% na quantidade de fertilizantes entregues ao produtor comparativamente a 2012, enquanto a produção nacional de fertilizantes intermediários diminuiu em 4,3% para o mesmo período (Figura 1). Em conjunto, estes dados indicam uma grande dependência da atividade agrícola brasileira por insumos estrangeiros, o que pode causar insegurança econômica e levar ao aumento dos custos de produção.

Uma das alternativas concretas à diminuição da dependência da agricultura brasileira por fertilizantes minerais e por agroquímicos é a ampliação da oferta de insumos biológicos de alta eficiência, como ocorre com a tecnologia de inoculação com rizóbios para a soja e pelo uso de microrganismos no controle biológico de pragas. Neste contexto, a

tecnologia de inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCVs), mesmo que fundamentadas em microrganismos que apresentem um caráter exótico ao ambiente produtivo, pode auxiliar no encontro da sustentabilidade dos sistemas agrícolas, pois são produzidas e atuam sob baixa demanda de energia. A principal característica destes microrganismos é a de favorecer o desenvolvimento vegetal por mecanismos diretos, como a fixação biológica de nitrogênio (FBN), a produção de fitormônios e a solubilização de fosfatos; ou por mecanismos indiretos, como o controle biológico de fitopatógenos e insetos, aumento da resistência a estresses bióticos e abióticos, além de outros mecanismos (BULGARELLI et al., 2013).

Figura 1 Evolução na produção, importação e consumo de fertilizantes no Brasil.



Fonte: ANDA – Associação Nacional para Difusão e Adubos.

Os mecanismos de promoção do crescimento vegetal, apresentados por estes microrganismos e que podem ser explorados em benefício de uma agricultura mais sustentável e de menor impacto ambiental, compreendem: a fixação biológica de nitrogênio (JAMES e BALDANI, 2012); o aumento da atividade da nitrato redutase vegetal quando em associações

endofíticas (CASSÁN et al., 2008); a produção de fitormônios como auxinas, citocininas (TIEN et al., 1979), giberelinas (BOTTINI et al., 1989) e a regulação da biossíntese do etileno (STRZELCZYK et al., 1994), além de uma variedade de outras moléculas bioativas (PERRIG et al., 2007); a solubilização de fosfatos (RODRIGUEZ et al., 2004); o controle biológico de patógenos (CORREA et al., 2008); e o aumento da resistência vegetal a diferentes estresses abióticos (YANG et al., 2009). Incrementos no volume radicular promovido pela ação de fitormônios sintetizados por BPCVs pode favorecer a absorção de água e nutrientes, aumentando a eficiência de uso de fertilizantes. Desta forma, a exploração e utilização de microrganismos eficientes na promoção do desenvolvimento vegetal pode auxiliar no encontro da sustentabilidade da atividade agrícola pela diminuição do uso de insumos derivados – direta ou indiretamente – do petróleo (DOBBELAERE et al., 2003; LUGTENBERG e KAMILOVA, 2009).

Produtos comerciais contendo estes microrganismos são comumente denominados inoculantes ou biofertilizantes e compreendem formulações contendo microrganismos vivos adicionados a um veículo inerte. Em geral estes bioprodutos são recomendados para aplicação sobre as sementes, superfície vegetal ou solo. A utilização destes produtos objetiva a colonização da planta pelo microrganismo inoculado, para que os mecanismos microbianos de promoção do crescimento vegetal possam ser ativados (VESSEY, 2003). Neste artigo de revisão estão compiladas informações relacionadas à interação entre bactérias e plantas, com uma discussão maior sobre o desenvolvimento e aplicação de biofertilizantes. Apesar de outros grupos microbianos, como fungos e protozoários, apresentarem relações estreitas e competência para influenciar o desenvolvimento da maioria dos vegetais de maneira direta e/ou indireta, estes não serão aqui abordados. Serão discutidos alguns aspectos ecológicos da microbiota do solo e da rizosfera e sua importância para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável. Algumas estratégias para o isolamento e identificação de bactérias com potencial aplicação biotecnológica e sua utilização para o desenvolvimento de formulações inoculantes são discutidas.

### Biodiversidade microbiana do solo

O solo é um ambiente heterogêneo altamente complexo, geralmente carente de nutrientes e recursos energéticos. Composto por fases sólida, líquida e gasosa, o solo é caracterizado por ancorar uma variedade de processos químicos, físicos e biológicos. Na fase líquida encontram-se em suspensão elementos químicos e moléculas solúveis; a fração gasosa é formada pela modificação do ar atmosférico decorrente de processos bioquímicos como a respiração celular; a fração sólida é composta por substâncias inorgânicas (areia, silte e argila) e materiais orgânicos (ácidos húmicos, ligninas, hemicelulose, celulose, amido, pectina, lignina, lipídeos, quitina etc.) em vários estágios de decomposição. Esta última fração (sólida) representa em média 50% do volume total do solo, sendo cerca de 45% representados por minerais e entre 1 - 5% representados por matéria orgânica, aonde residem os organismos vivos: raízes e macro e microrganismos. Mesmo ocupando uma pequena fração do volume do solo, os microrganismos, juntamente com suas enzimas extracelulares e com a meso e macrofauna, conduzem todas as reações metabólicas conhecidas neste ambiente (BAKSHI e VARMA, 2011; KUJUR et al. 2012). Estas atividades ocorrem de maneira desuniforme e apresentam grandes diferenças espaço-temporais ao longo do perfil do solo, onde o acúmulo de matéria orgânica particulada, dejetos animais e deposições rizosféricas levam à existência de microhabitats com elevada atividade biológica e biodiversidade (*hot spots*) (GONZALEZ et al., 2012).

Devido a sua heterogeneidade física, química e biológica, o solo é um dos maiores reservatórios de biodiversidade microbiana, constituindo um importante recurso para a exploração biotecnológica. A diversidade bacteriana nestes ambientes é muito superior à observada para organismos eucariontes, podendo existir milhares de diferentes espécies de bactérias em apenas 1 cm<sup>3</sup> de solo (TORSVIK e ØVREÅS, 2002; MARON et al., 2011). Os microrganismos que habitam o solo constituem a base de processos ecológicos, como os ciclos biogeoquímicos e a cadeia trófica, mantendo relações vitais entre si e com os organismos superiores. Diversas funções de importância para a dinâmica funcional do solo são realizadas pelos microrganismos, como a decomposição da matéria orgânica que disponibiliza nutrientes às plantas e a degradação de substâncias

xenobióticas. Além disso, a microbiota do solo atua no controle biológico de patógenos, influencia a solubilização de minerais e contribui para a estruturação e agregação do solo (SCHLOTER et al., 2003; KUJUR et al., 2012). Vários gêneros bacterianos com potencial de promoção do crescimento de plantas têm sido descritos, entretanto a composição filogenética de comunidades bacterianas associadas a vegetais é relativamente limitada a poucos filos: Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria (BULGARELLI et al., 2013). Estimativas recentes apresentam a população de procariontos em solos entre  $10^8$ - $10^{10}$  bactérias por grama de solo, compreendendo entre 5000 a mais de um milhão de diferentes espécies (BURNS et al., 2013). Estes microrganismos podem ser classificados em grupos funcionais de acordo com suas atuações nos processos biológicos. Exemplos desses grupos são os microrganismos envolvidos no ciclo do carbono e nitrogênio (TORSVIK e ØVREÅS, 2002).

Apesar de sermos capazes de apreciar a importância da biodiversidade microbiana do solo, ainda temos pouca informação sobre o papel desta biodiversidade para o funcionamento deste ambiente (STARK et al., 2008) e sua influência na produtividade vegetal (VAN DER HEIJDEN et al., 2008). Bakshi e Varma (2011) estabelecem que a fertilidade e qualidade de solos não estão relacionadas somente com sua composição química, mas principalmente com a quantidade e diversidade dos microrganismos que os habitam. Considerando somente a fixação biológica de Nitrogênio (FBN), são introduzidos entre 40 a 100 Tg de N por ano aos sistemas terrestres (VITOUSEK et al., 2013). Em adição, o Fósforo pode ser mobilizado a partir dos minerais do solo – ou biodisponibilizado para os vegetais – pela ação de fungos micorrízicos e bactérias solubilizadoras de fosfato. Ampliar o conhecimento sobre esta biodiversidade permite o desenvolvimento de técnicas e/ou produtos e/ou processos de grande importância econômica, ambiental e social. Considerando a presença ubíqua de procariontos em qualquer habitat natural, bem como a diversidade de condições edafoclimáticas encontradas no Brasil, é possível visualizar a enorme diversidade microbiana ainda inexplorada. Por outro lado, o acesso à diversidade microbiana em solos é uma tarefa altamente complexa. Estima-se que menos de 10% dos microrganismos existentes nesses ambientes tenham sido caracterizados e descritos (DUBEY et al., 2006) e portanto o

desenvolvimento de métodos direcionados à exploração de grupos microbianos específicos são ainda uma grande necessidade.

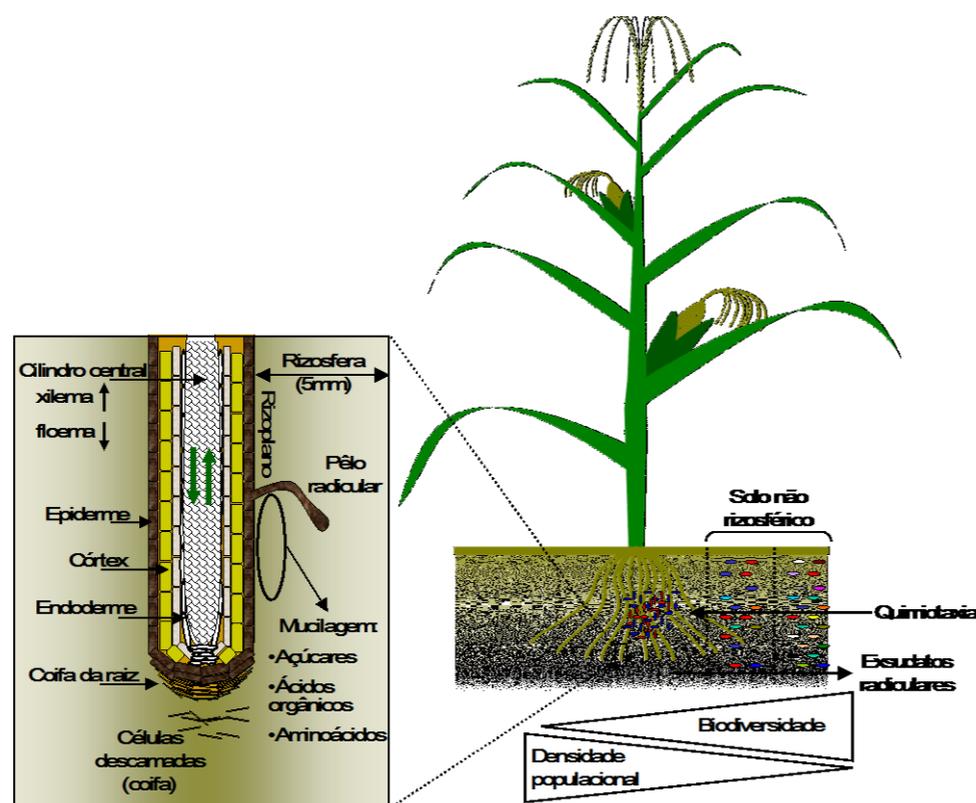
#### **Atividade microbiana na rizosfera**

O ambiente rizosférico compreende a porção do solo que envolve as raízes vegetais, apresentando características físico-químicas muito diferentes daquelas observadas para o solo não rizosférico. Esta região do solo compreende poucos milímetros além dos tecidos vegetais e está sob imediata influência do metabolismo radicular, acumulando grande quantidade de compostos orgânicos que são liberados (exsudatos) pelas raízes e que favorecem a manutenção de elevadas populações microbianas (DOBELLAERE et al., 2003; BERENDSEN et al., 2012). A rizosfera possui grande importância para o desenvolvimento vegetal, pois neste ambiente ocorre a absorção de água e de nutrientes pelas plantas, como também as diferentes relações ecológicas entre a micro, meso e macrofauna componentes deste habitat: mutualismo, parasitismo, protocooperação, comensalismo, competição, amensalismo (RYAN et al., 2008). Estas interações são dinâmicas e dependentes de fatores bióticos (composição da microbiota nativa do solo, qualidade e quantidade de exudatos radiculares, fatores antrópicos) e abióticos (características edafoclimáticas), cuja magnitude de cada efeito sobre a diversidade, função e interrelações existentes ainda são pouco compreendidas (BEVER et al., 2010).

A relativa abundância de recursos existente no ambiente rizosférico contrasta com a condição geral do solo, onde as populações microbianas existem em estado de carência nutricional constante. As populações microbianas na rizosfera não raro encontram-se em populações cerca de 10 a 1000 vezes maiores que aquelas encontradas no solo não rizosférico e sob intensa atividade metabólica. Estas populações são formadas por poucas espécies microbianas e que podem alcançar densidades acima de  $10^5$  células por grama de raiz (BERENDSEN et al., 2012). Percebe-se que a rizosfera é um ambiente pujante, mas restritivo: a qualidade/quantidade dos metabólitos excretados pelas raízes vegetais promove um efeito seletivo sobre grupos microbianos que apresentam compatibilidade metabólica aos exudatos radiculares. Este efeito do metabolismo vegetal sobre o solo vizinho às raízes é denominado de efeito rizosférico (ROVIRA,

1959; BERENDSEN et al., 2012), enquanto os microrganismos que se destacam na colonização da rizosfera de uma espécie vegetal qualquer são denominados de rizocompetentes. Como qualquer relação biótica existente na rizosfera, a rizocompetência é dinâmica e relativa aos pares envolvidos. Fatores genotípicos, fisiológicos e edafoclimáticos, em conjunto, determinam a capacidade de colonização da rizosfera por uma espécie bacteriana do solo (DANHORN e FUQUA, 2007). A rizocompetência possibilita a colonização do ambiente rizosférico pelas espécies microbianas mais competitivas, que deslocam deste habitat os grupos incompatíveis – ou de menor competitividade, por serem as primeiras mais adaptadas e eficientes na utilização dos recursos disponibilizados pelos exsudatos radiculares de determinada espécie vegetal (Figura 2).

**Figura 2** Estrutura geral da raiz, ambiente rizosférico e o efeito rizosférico.



Fonte: Adaptado de Maier et al. (2000).

Sendo o solo o repositório da diversidade microbiana, a seleção de grupos específicos pelo efeito rizosférico, em resposta ao metabolismo vegetal, promove alterações qualitativas e quantitativas na comunidade microbiana do solo. Acredita-se que esta seleção não ocorra de maneira aleatória e que a planta consiga modular a qualidade/quantidade de material excretado pelas raízes de forma a selecionar microrganismos que vão atuar na rizosfera a seu favor (DOORNBOS et al., 2012). Na verdade, surgem evidências de que as raízes vegetais e a estrutura da comunidade microbiana a ela associada, como em qualquer outro ambiente natural, estejam atuando de forma interdependente em um sistema único, complexo e auto-regulado, sob influência de variáveis bióticas e abióticas (DEUTSCHBAUER et al., 2006; THRALL et al., 2011). Estes conceitos estão modificando as definições de sanidade vegetal e do papel da microbiota do solo para o desenvolvimento e a produtividade agrícola. É possível inferir que um conhecimento mais profundo sobre o diálogo molecular que ocorre entre os vegetais e a microbiota a eles associada poderá levar a inovações nas formas de manejo agrícola para que o estabelecimento de espécies microbianas promotoras do crescimento vegetal sejam favorecidas.

### Importância dos Microrganismos na Sustentabilidade Agrícola

Os principais instrumentos disponíveis para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos são os organismos e sua diversidade metabólica. As pesquisas e descobertas em biotecnologia iniciam-se com a utilização de material biológico apropriado, segue pela triagem de atributos desejáveis e a identificação e seleção dos melhores candidatos, culminando com o desenvolvimento de um produto ou processo (BULL et al., 2000). A microbiota do solo compreende organismos adaptados a diferentes condições de temperatura, salinidade, condições nutricionais e hídricas, que por sua vez refletem uma grande diversidade metabólica. Em função desta diversidade, da relativa facilidade de isolamento e cultivo em meios de baixo custo e da susceptibilidade para manipulação (genética ou ambiental), estes organismos podem ser explorados como fonte de processos de interesse para o ser humano (SHARMA et al, 2002; MÜLLER et al., 2010).

A atividade agrícola pode ser grandemente beneficiada pela utilização da diversidade microbiana em novos processos biotecnológicos. O modelo agrícola vigente distancia-se da sustentabilidade por estar estruturado no grande volume de insumos externos, que são aportados continuamente (fertilizantes, agroquímicos e combustíveis), modificando o equilíbrio dos ambientes naturais e levando à alteração da composição química, física e biológica do solo e do ambiente sob influência desta atividade. Aliado a isto, existe a necessidade de aumentar a oferta de alimentos, em quantidade e qualidade, para suprir a crescente demanda mundial impulsionada pelo crescimento demográfico. As projeções para o agronegócio brasileiro, realizadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2013), destacam um crescente aumento dos preços dos alimentos para os próximos 40 anos em função das mudanças climáticas, da diminuição dos estoques mundiais, do crescimento da produção de biocombustíveis e do aumento da população mundial e renda per capita. O crescimento da produção agrícola deverá ocorrer fundamentado no aumento da produtividade e não na ampliação das áreas de cultivo, sendo este um dos principais desafios que se apresentam para a agricultura.

O aumento da produtividade agrícola vem sendo alcançado por um conjunto de fatores tecnológicos (manejo de solos e culturas, melhoramento genético e zoneamento agrícola, por exemplo). Entretanto, é possível observar que o modelo vigente está sofrendo grandes transformações, incorporando conceitos de sustentabilidade e equilíbrio de ecossistemas e buscando a minimização e mitigação de seus impactos no ambiente natural. Existe assim a necessidade de suprir as demandas globais por alimentos, sem o comprometimento dos serviços essenciais entregues ao homem pelos ecossistemas. O desafio que se apresenta para a atividade agrícola envolve a gestão bem sucedida dos recursos naturais para satisfazer as necessidades humanas, mantendo a qualidade ambiental e conservando riquezas naturais para o futuro (SINGH et al., 2011). Neste contexto, a nutrição adequada das culturas é um fator de extrema importância para o aumento da produção e produtividade e um dos fatores de maior peso no custo de produção (econômico e ambiental) da maioria das lavouras. A remoção de nutrientes pelos vegetais e sua exportação para

além dos limites da propriedade agrícola requer que quantidades significativas de fertilizantes sejam adicionadas aos cultivos, sob pena de diminuição severa da produtividade. Dentre os nutrientes vegetais de maior importância e cujos aspectos a serem pesquisados são imperativos, estão o fornecimento de Nitrogênio e Fósforo (JONES et al., 2013). Estes elementos apresentam baixa disponibilidade nos solos tropicais e baixo aproveitamento pelas plantas cultivadas quando adicionado como fertilizante. Fenômenos de volatilização, desnitrificação e lixiviação são responsáveis por perdas que variam de 25 a 50% do N-fertilizante aplicado (TRIVELIN et al., 2002; GAVA et al., 2006). A imobilização do Fósforo resultante das interações com óxidos de ferro e alumínio, comuns em solos tropicais, também pode limitar o aproveitamento deste nutriente adicionado como fertilizante (MOTTA et al., 2002).

A utilização de fertilizantes nitrogenados pela atividade agrícola pode ser substituída parcial ou completamente pelo uso de biofertilizantes contendo BPCVs eficientes na fixação biológica do nitrogênio (FBN). A FBN é um processo enzimático, onde ocorre a redução do dinitrogênio gasoso ( $N_2$ ) em amônia ( $NH_3$ ), o que possibilita a assimilação deste nutriente em biomoléculas (FIGUEIREDO et al., 2008). O complexo enzimático denominado nitrogenase catalisa a reação de redução de  $N_2$  em  $NH_3$  e ocorre somente em organismos procariotos (Bacteria e Archaea). Em adição, a FBN constitui o principal mecanismo de disponibilização do nitrogênio para os seres vivos, sendo responsável por pelo menos dois terços do aporte anual de Nitrogênio na biosfera (FOWLER et al., 2013). Estimativas da contribuição média da FBN para sistemas agrícolas (HERRIDGE et al., 2008) apresentam valores de  $25 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$  para associações não simbióticas (cana-de-açúcar), até  $176 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$  para associações simbióticas (soja). Apesar da importância da FBN no suprimento de N para os seres vivos e da existência de muitas espécies diazotróficas (capazes de realizar a FBN) nos solos e em associação com espécies vegetais de interesse agrônomo, os insumos biotecnológicos com base neste processo estão disponíveis somente para algumas culturas e o uso de fertilizantes nitrogenados industriais ainda constitui a principal forma de aporte deste nutriente em sistemas agrícolas. Estimativas indicam que a emissão de gases de efeito estufa para a produção, distribuição e

aplicação de 1 kg de N-fertilizante corresponde a 4,5 kg de equivalentes de CO<sub>2</sub> emitidos na atmosfera (HUNGRIA et al., 2013). Assim, todas as possibilidades de incremento da FBN na agricultura devem ser exploradas, não somente como alternativa econômica, mas também para garantir a sustentabilidade da atividade agrícola no longo prazo.

Diferentemente do Nitrogênio, o Fósforo é um recurso não renovável e escasso em nosso planeta e as estimativas apresentam o esgotamento de suas reservas em 50-100 anos. Apesar da relativa abundância de formas orgânica e inorgânicas de P nos solos, sua concentração na forma solúvel é normalmente menor que 10 µM em pH 6.5 (BARROTI e NAHAS, 2000). A matéria orgânica do solo contribui com 30 a 50%, em média, do total de fósforo solúvel na maioria dos solos, onde o fosfato de inositol (fitato) pode representar até 50% do P-orgânico (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999; RICHARDSON et al., 2009). Na forma inorgânica, as maiores reservas de P estão presentes como constituintes de rochas e minerais primários como as apatitas, hidroxiapatitas e oxiapatitas. Porém a mobilização deste nutriente a partir de minerais é um processo lento e a quantidade mobilizada geralmente é insuficiente para suprir as necessidades de um cultivo agrícola (SCHNEIDER et al., 2010). Além disso, uma quantidade considerável dos fertilizantes fosfatados aplicados é rapidamente imobilizado nos solos agrícolas, pela sua reação com minerais de ferro, alumínio ou cálcio, formando fosfatos insolúveis e indisponíveis para assimilação pelas plantas. Os microrganismos, bactérias e fungos, têm um papel essencial no ciclo do P na natureza, atuando na mineralização do fosfatos orgânicos ou na solubilização de fosfatos inorgânicos. De maneira geral, a solubilização de substratos inorgânicos ocorre pela biossíntese de ácidos orgânicos ou inorgânicos, enquanto o P presente em substratos orgânicos é mineralizado (hidrolisado para a forma inorgânica) pela ação de enzimas hidrolíticas, como as fosfatases (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999; RICHARDSON et al., 2011). Considerando que a disponibilidade de P é uma etapa limitante para a nutrição da planta, a habilidade em solubilizar fosfato inorgânico por bactérias associativas representa um grande potencial para a promoção do crescimento vegetal.

Além do fornecimento direto de nutrientes aos vegetais por mecanismos como a FBN e a capacidade de mobilização de P, a biossíntese de

fitormônios pelos microrganismos do solo e outras moléculas com ação hormonal podem influenciar indiretamente o status nutricional das plantas. A síntese de fitormônios, principalmente auxinas e giberelinas, é provavelmente um dos mecanismos mais importantes utilizados por BPCVs para influenciar positivamente o desenvolvimento vegetal (CASSÁN et al., 2014). Outras moléculas produzidas por microrganismos e que possuem ação hormonal sobre o desenvolvimento vegetal incluem citocininas (TIEN et al., 1979), etileno (STRZELCZYK et al., 1994), ácido abscísico (COHEN et al., 2008), óxido nítrico (CREUS et al., 2005) e poliaminas (CASSÁN et al., 2009). A produção destes reguladores de crescimento faz parte do metabolismo de diversas espécies de bactérias associadas aos vegetais e em muitos casos estão envolvidos nas respostas de promoção do crescimento e do desenvolvimento vegetal. Dentre os fitormônios citados, a auxina (ácido indol-3-acético ou AIA) é a mais estudada, sendo a capacidade de síntese deste fitormônio amplamente distribuída entre bactérias associativas. Acredita-se que cerca de 80% das espécies de bactérias isoladas da rizosfera produzem auxinas (PATTEN e GLICK, 1996), que provavelmente atuam como sinais moleculares envolvidos tanto em interações patogênicas como benéficas entre a planta e a bactéria (LAMBRECHT et al., 2000). Os principais efeitos relacionados com a ação de fitormônios produzidos por microrganismos sobre o desenvolvimento vegetal consistem de alterações morfológicas no sistema radicular, incluindo aumentos no comprimento e volume radicular, número e comprimento das raízes laterais, massa seca radicular e número e densidade dos pêlos radiculares (BASHAN e BASHAN, 2010; CASSÁN et al., 2014). Estes efeitos têm sido associados ao aumento da resistência vegetal contra estresses hídricos e nutricionais e ao aumento da eficiência de uso da água e de fertilizantes (FIGUEIREDO et al., 2008; ADESEMOYE e KLOPPER, 2009; CARVALHAIS et al., 2013).

#### **Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal**

Bactérias do solo que possuem a capacidade de colonizar a superfície de raízes, a rizosfera e a filosfera, bem como os tecidos vegetais internos (DAVISON, 1988; KLOPPER et al., 1989; ZHANG et al., 2006), modulando o metabolismo da planta e estimulando seu crescimento e produtividade por

efeitos diretos e/ou indiretos, são denominadas bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV). Estas bactérias representam uma parcela funcionalmente ativa da biota do solo rizosférico, do rizoplane e no interior da planta como endófitos (OLIVARES, 2009; GLICK, 2012; GAIERO et al; 2013). Estas interações são sempre dinâmicas e estão sob controle de uma miríade de fatores bióticos e abióticos, de maneira que uma BPCV não atua incondicionalmente sobre qualquer vegetal. Considerando-se que a expressão de um gene resulta em um custo metabólico e que a expressão de genes está sob controle de sinais endógenos e exógenos (SALEEM et al. 2010), a utilização de biofertilizantes contendo BPCVs somente poderá resultar em incrementos produtivos se a relação custo-benefício para a manutenção da interação planta-BPCV estiver adequadamente balanceada para sustentar esta interação (PARTIDA-MARTÍNEZ e HEIL, 2011). Neste contexto, um biofertilizante contendo uma BPCV eficiente no suprimento de nutrientes (Nitrogênio ou Fósforo, por exemplo) e que mantenha elevada população colonizando os tecidos vegetais durante o período de desenvolvimento, provavelmente não irá apresentar efeitos benéficos caso o ambiente de cultivo apresente condições de plena nutrição para a planta. Nestes casos, é mais provável que o biofertilizante resulte em efeito neutro ou mesmo negativo, uma vez que BPCVs são organismos heterotróficos e demandam energia da planta para manterem-se ativos e sob populações elevadas (HARTMANN et al., 2009).

Mesmo que a expressão dos efeitos de promoção do crescimento vegetal por BPCVs sejam dependentes do contexto relacionado às condições do ambiente em que a planta está inserida, os biofertilizantes são desenvolvidos para que a(s) BPCV(s) colonize(m) os tecidos vegetais ou o ambiente rizosférico com densidades populacionais elevadas (COMPANT et al., 2010). Como os habitats que estes microrganismos ocupam quando em associação com as plantas são heterogêneos e descontínuos, o estabelecimento de uma espécie bacteriana introduzida via biofertilizante fica condicionado à sua capacidade de competir com os microrganismos nativos (portanto melhores adaptados) pelos nutrientes disponíveis, de sobrepujar os predadores e antagonistas e de resistir a possíveis estresses abióticos. Esta capacidade de estabelecimento de uma espécie bacteriana em associação com uma espécie vegetal – ou seja, a rizocompetência –

envolve fatores bioquímicos de compatibilidade entre os genótipos vegetal e bacteriano. Estes fatores são determinantes na eficiência da associação e a ausência de rizocompetência resulta em declínio progressivo na densidade populacional dos microrganismos introduzidos, levando ao insucesso na eliciação das respostas de promoção do crescimento (KIM et al, 1997; BASHAN, 1998; O'CALLAGHAN et al., 2001; STRIGUL e KRAVCHENKO, 2006). Por outro lado, a compatibilidade associativa entre planta-BPCV proporciona o estabelecimento e a perpetuação do microrganismo. Nestas condições, o diálogo molecular entre o par é bem sucedido e culmina na expressão dos mecanismos de promoção do crescimento pela BPCV, em resposta ao uso eficiente dos nutrientes e compostos orgânicos disponibilizados pela planta.

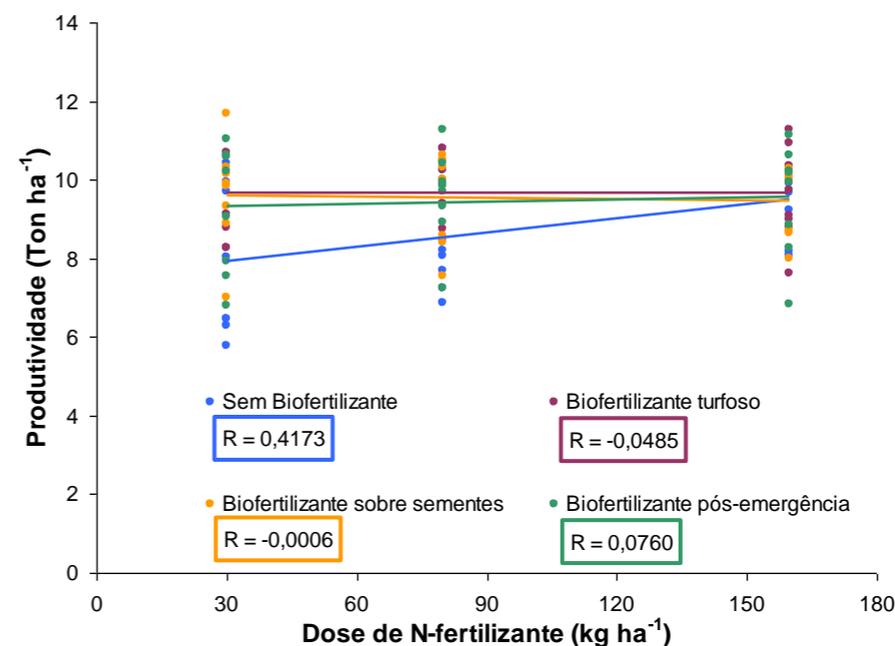
A rizocompetência e seus fatores determinantes são raramente estudados, apesar de serem fundamentais para proporcionar a máxima expressão dos efeitos promotores do crescimento por BPCVs. Na maioria dos casos, a compatibilidade entre pares associativos é deduzida a partir de ensaios de interação planta-bactéria (inoculação) realizados em diferentes condições e que sucedem a exploração de associações naturalmente existentes entre BPCVs e espécies de interesse agrícola. Incrementos de produtividade e de acúmulo de nutrientes em plantas que receberam inoculação com BPCV são vastamente relatados pela literatura. Mesmo considerando o pouco entendimento de como as relações benéficas entre planta e bactéria são firmadas, uma grande diversidade de produtos contendo BPCVs são comercializados como insumo para a agricultura: *Agrobacterium radiobacter*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus fimus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mucilaginosus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus spp.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens*, *Burkholderia cepacia*, *Delftia acidovorans*, *Paenobacillus macerans*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas spp.*, *Pseudomonas syringae*, *Serratia entomophila*, *Streptomyces griseoviridis*, *Streptomyces spp.*, *Streptomyces lydicus* e vários *Rhizobia* spp (GLICK, 2012). No Brasil, poucas estirpes de BPCVs estão registradas no MAPA (IN 13 de 24/03/2011) para uso em formulações comerciais e compreendem:

*Bacillus subtilis* (estirpes UFV 3918, UFV S1 e UFV S2); *Frauteria aurantia* (estirpe UFV R1); *Azospirillum brasilense* (estirpes Ab-V1, Ab-V4, Ab-V5, Ab-V6, Ab-V7 e Ab-V8), além de 116 estirpes de rizóbios indicados para diferentes espécies de leguminosas. Não é difícil perceber que a tecnologia de inoculação de cultivos comerciais de plantas não-leguminosas com bactérias promotoras do crescimento vegetal ainda incipiente no Brasil e está longe de ter todo o seu potencial conhecido e explorado, ainda mais se considerada a biodiversidade natural dos biomas brasileiros.

A prática de inoculação com BPCVs em cultivos agrícolas de plantas não-leguminosas vem sendo adotada, de maneira crescente no Brasil, como prática de rotina para culturas como milho e trigo, mesmo considerando o número restrito de microrganismos registrados para a produção de biofertilizantes comerciais. No entanto, a biotecnologia de inoculação vem sendo preconizada como uma prática adicional ao manejo tradicional, visto que na maioria das propriedades os biofertilizantes são aplicados adicionalmente ao uso de fertilizantes minerais. A variabilidade na resposta dos cultivos agrícolas ao uso de biofertilizantes é o principal argumento para a adoção da biotecnologia de inoculação como prática adicional e não como uma prática alternativa. Por outro lado, os incrementos na produtividade em decorrência do uso de biofertilizantes são historicamente maiores quando na ausência ou sobre doses diminuídas de fertilizantes, principalmente dos nitrogenados (VERESOGLOU e MENEXES, 2010). Ensaio de inoculação realizados na cultura do milho pelo grupo de pesquisa sobre o desenvolvimento e a aplicação de biofertilizantes da Universidade Estadual de Londrina, vem demonstrando seguidamente que é possível obter elevadas produtividades sob menores dosagens de fertilizantes nitrogenados. Além disso, os resultados obtidos nos ensaios conduzidos pelo grupo não indicam a ocorrência de possíveis efeitos aditivos relacionados ao uso de biofertilizantes e dosagens regulares de N-fertilizante. Ao contrário, as parcelas que receberam biofertilizante, independentemente do tipo de formulação, não apresentaram resposta à adubação nitrogenada (Figura 3). Os biofertilizantes apresentam uma grande oportunidade para direcionar a atividade agrícola no sentido da sustentabilidade, mas deve-se considerar que muitos produtos disponíveis atualmente no mercado mundial carecem de qualidade e levam a perda da

confiança do setor produtivo nesta biotecnologia (HERRMANN e LESUEUR, 2013). Nós reforçamos que é possível e viável substituir, ao menos parcialmente, os insumos agrícolas industrializados (fertilizantes e agroquímicos) por tecnologias de base biológica. Avanços no conhecimento das relações naturais entre planta-BPCV, como também sobre os fatores que influenciam estas associações, são imprescindíveis e devem ser considerados no desenvolvimento de bioprodutos com alta eficiência.

Figura 3. Curva de tendência e coeficiente de correlação de Pearson entre a produtividade de milho (híbridos AG2040 e 2B512Hx) e o uso de fertilizantes nitrogenados, na ausência e presença de diferentes formulações de biofertilizante contendo a bactéria *Azospirillum brasilense* Ab-V5. Os resultados correspondem a dois anos agrícolas (2010/11 e 2012/13).



Fonte: os autores.

### Isolamento de BPCVs

Diferentemente dos estudos de diversidade e ecologia microbiana, a prospecção de bactérias que sejam eficientes na promoção do crescimento vegetal é necessariamente realizada pelo isolamento de representantes da

comunidade. Anteriormente foi discutido sobre a heterogeneidade física, química e biológica do solo e do efeito rizosférico atuando na modificação deste ecossistema. Esta diversidade de ambientes está refletida na diversidade microbiana associada aos vegetais, muito mais ampla do que se supunha e capaz de influenciar de forma incisiva a produtividade, diversidade e composição de comunidades vegetais (VAN DER HEIJDEN et al., 2008; RODRIGUEZ e REDMAN, 2008; YANG et al., 2009; HOL et al., 2010). Apesar da importância para o desenvolvimento de insumos biotecnológicos essenciais na construção de novos modelos sustentáveis de produção agrícola, o número de grupos microbianos conhecidos e descritos representa apenas uma pequena fração da diversidade microbiana naturalmente existente em associação com os vegetais. Em adição, considerando que diferentes grupos bacterianos necessariamente terão requerimentos nutricionais e condições de cultivo distintas, pode-se concluir que a identificação de BPCVs eficientes e com potencial para o desenvolvimento de insumos biotecnológicos é uma tarefa laboriosa e demorada, uma vez que não existe uma metodologia universalmente aplicável para esta finalidade.

Considerando o ambiente tropical, a estrutura e a função dos microrganismos associados às plantas é ainda mais incipiente, apesar do Brasil possuir grande importância mundial com relação às pesquisas em fixação biológica de nitrogênio, tanto nas interações simbióticas entre leguminosas e rizóbios, como nas relações não-simbióticas entre gramíneas e bactérias associativas, como as do gênero *Azospirillum*. O resgate dos estudos que levaram o Brasil a possuir este reconhecimento demonstra a grande importância das estratégias aplicadas ao isolamento e ao cultivo de novos grupos bacterianos (FREIRE, 1953; DOBEREINER, 1953; GALLI, 1958; DOBEREINER 1966; DOBEREINER et al., 1970, BALDANI e BALDANI, 2005).

Algumas estratégias para o isolamento de bactérias promotoras do crescimento vegetal vêm sendo aplicadas com sucesso em estudos básicos e aplicados, entretanto não existem protocolos para a prospecção de BPCVs que sejam direcionados para a obtenção de isolados de alta eficiência. Na prática, o isolamento destas bactérias é feito a partir de abordagens generalistas e massivas, prospectando-se amostras de solo ou de tecidos vegetais como as raízes, que são coletadas nas mais diferentes

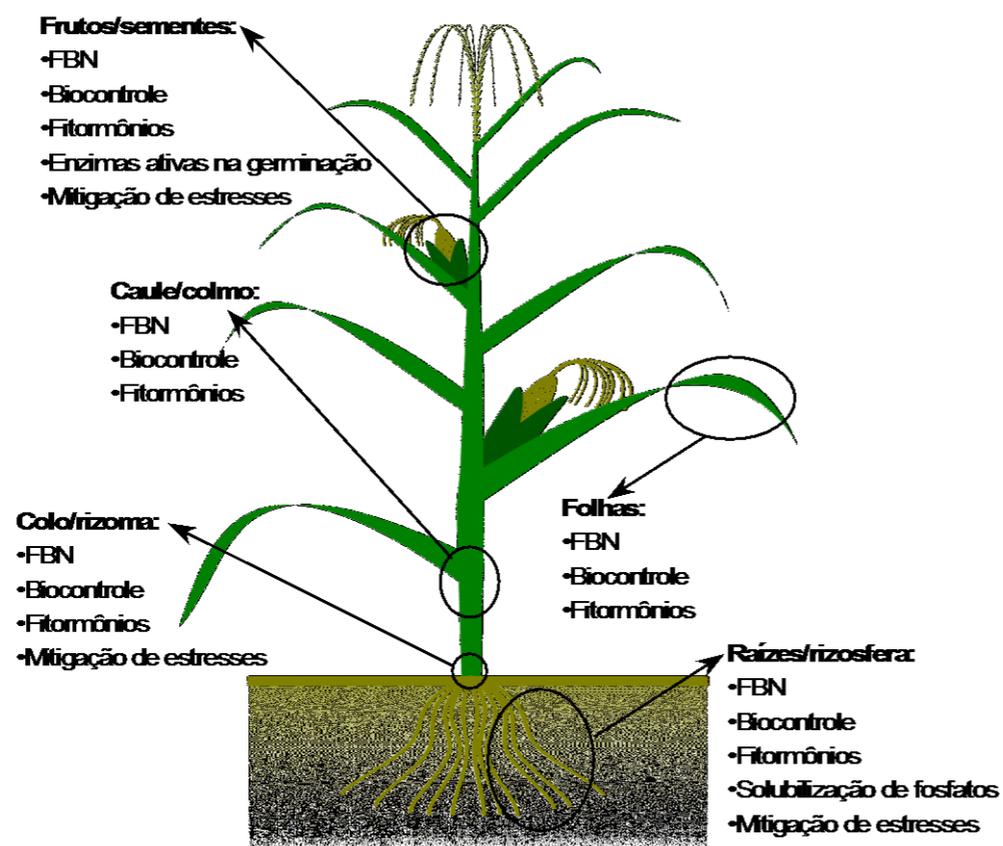
condições (BASHAN et al., 1996; SAHARAN e NEHRA, 2011). A coleção de isolados assim obtida segue para a identificação, caracterização e seleção dos indivíduos promissores. Estas abordagens muitas vezes resultam no isolamento de centenas de indivíduos, dos quais somente alguns possuem características de interesse para o desenvolvimento de bioprodutos (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; AMBROSINI e t al., 2012; SON et al., 2014; JI et al., 2014). Estudos direcionados à obtenção de grupos específicos de bactérias promotoras do crescimento (endofíticos, mais abundantes, diazotróficos, solubilizadores de fosfato, mitigadores de estresses) vem se tornando uma alternativa, uma vez que restringem o isolamento aos indivíduos que possuem a característica de interesse (MIRZA et al., 2001; PENROSE e GLICK, 2003; GOES et al., 2012; SINGH et al., 2014). Nestes trabalhos, os meios de cultivo utilizados são considerados seletivos, semi-seletivos e mesmo indicadores de alguma atividade ou mecanismo de promoção do crescimento vegetal. A opção por tais meios de cultivo se apresenta como principal vantagem para a obtenção de grupos microbianos específicos, como os diazotróficos, solubilizadores de fosfato, produtores de sideróforos, entre outros. (PENROSE e GLICK, 2003; TURNBULL et al., 2012). De qualquer modo, a maioria das estirpes utilizadas em formulações inoculantes comerciais foram obtidas a partir de estudos de bioprospecção, utilizando material vegetal coletado sob condição de cultivo comercial ou a partir da comunidade vegetal natural (ROSENBLUETH e MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). Considerando as características de rizocompetência e competitividade, existentes dentro da biodiversidade bacteriana do solo, é possível perceber que as abordagens geralmente utilizadas para a obtenção de isolados de BPCV limitam o acesso à microbiota presente em associação com a planta-alvo sob as condições de desenvolvimento e período ontogênico existentes no momento de sua coleta.

Não existe um tipo preferencial de tecido vegetal que possa ser utilizado para a bioprospecção de BPCVs, uma vez que os microrganismos associativos colonizam virtualmente qualquer tecido vegetal (Figura 4) e a sua dispersão entre os diferentes tecidos não apresenta um padrão conhecido (TURNER et al., 2013). Mesmo considerando as limitações das abordagens utilizadas para o isolamento de BPCVs, é possível sugerir

algumas estratégias para aumentar a chance de sucesso na obtenção de isolados com potencial aplicação para o desenvolvimento de biofertilizantes:

a) Identificar qual o mecanismo de promoção de crescimento vegetal de interesse. A determinação prévia de um mecanismo específico de promoção do crescimento permite restringir a etapa de bioprospecção aos tecidos vegetais onde tais mecanismos são expressos de maneira significativa e possibilita a utilização de meios de cultivo seletivos e/ou indicadores da atividade de interesse.

Figura 4 Tecidos vegetais com potencial para a prospecção de BPCVs e respectivos mecanismos mais prováveis de promoção do crescimento.



Fonte: os autores

b) Realizar a bioprospecção priorizando representantes da comunidade associativa presentes em elevadas populações. A diluição seriada dos homogenatos de tecido vegetal ou de solo rizosférico possibilita o acesso às BPCVs rizocompetentes, presentes nos tecidos vegetais em populações elevadas (acima de  $1 \times 10^4$  células/g tecido vegetal) e diminui a chance de obtenção de espécies transientes e de pouca influência sobre o desenvolvimento vegetal.

c) Utilizar diferentes formulações de meios de cultivo. Os requerimentos nutricionais das BPCVs podem ser extremamente diversificados. A escolha dos meios de cultivo e dos procedimentos para o pré-tratamento das amostras (desinfestação superficial, p. ex.) deve considerar diferentes concentrações e fontes de nutrientes, mesmo quando meios de cultivo seletivos e/ou indicadores são utilizados.

d) Enriquecer a população do solo com organismos compatíveis com a espécie vegetal estudada. O efeito rizosférico provoca alterações qualitativas sobre a comunidade do solo, de maneira que a utilização de plantas-isca leva ao enriquecimento seletivo dos representantes da comunidade nativa do solo compatíveis com os exudatos disponibilizados pela planta-isca, favorecendo seu isolamento.

Após a obtenção dos isolados, seguem-se etapas de caracterização bioquímica e molecular, triagem e seleção das BPCVs de maior potencial para utilização como insumo biotecnológico (RANA et al., 2011). Os princípios que orientam a seleção de BPCVs devem objetivar a obtenção de estirpes compatíveis com a espécie vegetal-alvo, considerando sua adaptação às condições edafoclimáticas prevalentes no(s) local(is) de uso, sua competitividade frente às comunidades microbianas nativas e sua incapacidade em promover grandes alterações na estrutura destas comunidades. Além disso, deve ser dada preferência aos isolados bacterianos pertencentes a grupos filogenéticos que não possuam histórico de patogenicidade (ao homem, animais e plantas) e que apresentem facilidade de cultivo e de manipulação. Em adição, a identificação de diferentes mecanismos relacionados com a promoção de crescimento vegetal em um único isolado de BPCV não significa necessariamente a identificação de um isolado "elite", uma vez que inexiste até o momento

qualquer ensaio de laboratório que substitua uma avaliação criteriosa do desempenho produtivo de um par planta-BPCV por meio de ensaios conduzidos sob condição de campo (VERMA et al., 2001; GLICK, 2012). Ademais, a identificação da capacidade de expressão de características relacionadas à promoção do crescimento vegetal por BPCVs com base em ensaios realizados *in vitro*, não apresenta necessariamente correlação com a expressão destes efeitos nas interações *in vivo* (SMYTH et al, 2011).

Apesar da dificuldade na identificação de estirpes elite de BPCVs, com capacidade real de atuar positivamente sobre o desenvolvimento vegetal em condições de cultivo comercial, as etapas de isolamento, caracterização bioquímica e ensaios preliminares de inoculação não podem ser negligenciadas (Figura 5), devido ao grande número de isolados geralmente obtidos nos estudos de bioprospecção (BENEDUZI et al., 2008; GOES et al., 2012). Mesmo considerando a grande demanda de esforço e tempo para a identificação de estirpes bacterianas elite, a diversidade de formulações comerciais fundamentadas no sistema simbiótico rizóbios-leguminosas e a eficiência alcançada por estes bioprodutos para o suprimento de nitrogênio vem trazendo vantagens econômicas, ambientais e sociais que ocorrem pela substituição de agroquímicos por estes produtos biotecnológicos (BALA et al., 2001; DEEPA et al., 2010; NIEVAS et al., 2012). Para as espécies não leguminosas, onde não ocorrem relações simbióticas verdadeiras entre os pares envolvidos, dificilmente seja possível desenvolver uma única estratégia/produto apresentando elevada eficiência na promoção do crescimento para diferentes culturas sob diferentes condições edafoclimáticas. Entretanto, os potenciais benefícios obtidos pelo uso destes biofertilizantes para a diminuição do uso de insumos industriais em agrossistemas corroboram a necessidade de intensificação nos estudos relacionados a estas interações associativas (HUNGRIA et al., 2010; GLICK, 2012; GAIERO et al. 2013). Uma alternativa para incrementar a eficiência de biofertilizantes contendo BPCVs em cultivos de não-leguminosas seria a inoculação de culturas mistas, utilizando combinações de isolados especializados em mecanismos de promoção do crescimento vegetal complementares (ALAGAWADI e GAUR, 1992; RODRIGUEZ e FRAGA, 1999; OLIVEIRA et al., 2006; YU et al., 2012). O efeito sinérgico da co-inoculação de bactérias solubilizadoras e fungos micorrízicos (FMA) têm sido sugerido

como uma alternativa para a biofertilização, visto que algumas destas bactérias podem mobilizar íons fosfato presentes em fontes insolúveis, disponibilizando-os para absorção pelas hifas externas de FMAs e permitindo desta forma, uma maior exploração das fontes de P presentes nos minerais do solo (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999; DODD e RUIZ-LOZANO, 2012).

#### **Inoculantes agrícolas para plantas não leguminosas: biofertilizantes**

A prática da inoculação de plantas com BPCV remonta ao início do século XX, quando um produto contendo *Rhizobium* sp. foi patenteado (BASHAN, 1998). Da mesma forma, fungos micorrízicos são utilizados como biofertilizantes desde a década de 1950, promovendo o crescimento da planta pela maior absorção de nutrientes, com destaque para a nutrição fosfatada (MOSSE, 1957; SMITH e SMITH, 2012). Esforços de investigação relacionados ao entendimento das interações entre microrganismos e vegetais vêm ganhando importância crescente, pois resultam em mecanismos sustentáveis de incremento na produtividade agrícola. A importância econômica dos biofertilizantes é também explícita: a sua utilização pode diminuir ou mesmo eliminar a aplicação de fertilizantes minerais solúveis, que constitui um dos fatores de maior pressão sobre o custo dos produtos agrícolas. Inoculantes microbianos para uso agrícola representam uma tecnologia projetada para melhorar a produtividade dos agrossistemas no longo prazo, alinhada com os princípios da agricultura sustentável e da agroecologia, em oposição à utilização crescente de insumos industrializados (NAIMAN et al., 2009; DODD e RUIZ-LOZANO, 2012).

A recomendação para uso de inoculantes contendo BPCVs em cultivos agrícolas comerciais vem ganhando espaço, bem como a gama de formulações comerciais de biofertilizantes disponíveis nos mercados nacional e – principalmente – internacional. Na maioria dos casos existem estudos científicos corroborando os efeitos dos microrganismos presentes nas formulações comerciais sobre o crescimento e/ou desenvolvimento vegetal (RUSSO et al., 2005; NAIMAN et al., 2009; WALKER et al., 2011). Apesar da grande diversidade de espécies descritas pela capacidade de facilitar a nutrição vegetal (MALUSÁ et al, 2012; GLICK, 2012), a maioria das

formulações comerciais não-rizobianas disponíveis contém bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Bacillus* (HERRMANN e LESUEUR, 2013). Por outro lado, é também consenso que muitos dos produtos comercializados, historicamente, sofrem de baixa qualidade na formulação, o que pode diminuir a confiança do setor produtivo nesta tecnologia (BASHAN, 1998; HERRMANN e LESUEUR, 2013).

O desenvolvimento de formulações inoculantes é a etapa final e provavelmente a mais importante, do ciclo de vida de um biofertilizante. Uma formulação inoculante de excelente qualidade é o resultado de um processo polifásico e multidisciplinar, que resulta em um veículo carreador adequado para garantir a longevidade e rizocompetência de uma ou mais estirpes selecionadas, de maneira a cumprir os requerimentos legais e funcionais de sua aplicação. Formulações inadequadas são frequentemente as barreiras mais comuns para a comercialização dos mesmos (MILANI et al., 2013). Para que se possam formular e produzir comercialmente os inoculantes, existe a necessidade de integração dos parâmetros físicos, químicos e biológicos nestes produtos, permitindo assim a manutenção de elevadas populações do microrganismo alvo e um maior tempo de sobrevivência em prateleira e no campo (ANANDHAM et al., 2007). O desenvolvimento destas novas formulações deve necessariamente estar fundamentado em estudos sobre fisiologia de microrganismos, desenvolvimento e compatibilidade de materiais e estratégias de veiculação de células. Além disso, novos produtos devem necessariamente atender as exigências legais e neste sentido as colaborações e parcerias entre pesquisa, desenvolvimento e o setor produtivo são necessárias para a melhoria na qualidade final de um biofertilizante (Figura 5).

A tecnologia de inoculação de cultivos comerciais com bactérias promotoras do crescimento vegetal ainda é subaproveitada no Brasil e está longe de ter todo o seu potencial utilizado pelo setor agropecuário nacional. A inércia do mercado em adotar a tecnologia de inoculação em substituição ao uso de fertilizantes minerais pode ser parcialmente explicada pelos seguintes fatores:

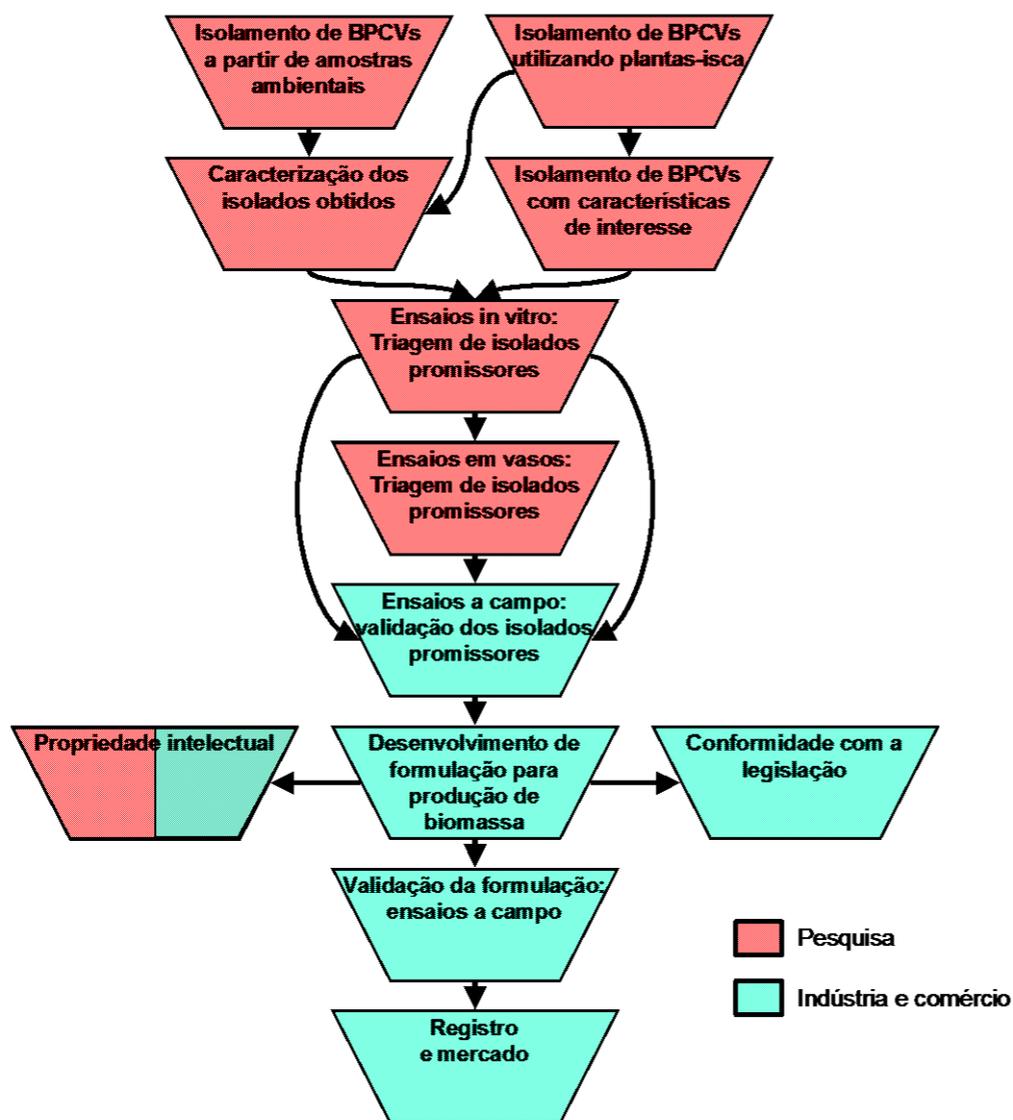
1) Ausência de estudos relacionados a alternativas de manejo para condução de cultivos utilizando a tecnologia de inoculação.

- 2) Ausência de um programa de melhoramento que considere como parâmetro de seleção, genótipos vegetais de alta compatibilidade para associação com BPCVs.
- 3) Inexistência de metodologias ágeis para a identificação, seleção e validação de estirpes bacterianas de alto potencial para uso como inoculante, permitindo uma ampliação da coleção de estirpes registradas para aplicação nas diferentes condições edafoclimáticas brasileiras.
- 4) Variabilidade na qualidade dos inoculantes contendo BPCVs, refletida na heterogeneidade de resposta à inoculação para uma mesma estirpe inoculante, muitas vezes sob as mesmas condições edafoclimáticas.

No Brasil, os biofertilizantes são produzidos utilizando estirpes registradas no MAPA, todas consideradas de elevada eficiência. Estes biofertilizantes são comercializados em basicamente duas formulações: líquidas e sólidas (esta última geralmente com base na turfa). Este mercado é bastante seletivo, concentrando cerca de 99% das doses comercializadas para a cultura da soja (MAPA). Porém, a máxima eficiência dos inoculantes comercializados no Brasil nem sempre é obtida. Formulações líquidas, por exemplo, podem apresentar diminuição na eficiência quando utilizadas em cultivos realizados no cerrado, uma vez que muitas das formulações líquidas não possuem substâncias protetoras em sua composição. Estas substâncias possuem a função de proteger as células bacterianas veiculadas contra dessecação e degradação oxidativa e são de ocorrência intrínseca na turfa utilizada em formulações sólidas (HUNGRIA et al., 2005). O desenvolvimento de novas formulações vem sendo sugerido por diversos autores como uma das necessidades para o aperfeiçoamento da tecnologia de inoculação (DENARDIN e FREIRE, 2000; TRIVEDI et al., 2005; YOUNG et al., 2006; HERRMANN e LESUEUR, 2013).

Pode-se perceber que o veículo inoculante possui grande importância na capacidade de expressão dos efeitos promotores de crescimento vegetal pela estirpe bacteriana à ela veiculada. Poucas informações a este respeito são disponíveis na literatura e o setor produtivo trata como segredos industriais as formulações utilizadas para a produção de biomassa celular e para a produção de biofertilizantes. Entretanto as características desejáveis

**Figura 5** Fluxograma ilustrativo das etapas necessárias ao desenvolvimento de biofertilizantes e proposta de integração entre pesquisa, desenvolvimento e o setor produtivo para o desenvolvimento de biofertilizantes de alta eficiência.



Fonte: Adaptado de Bashan et al. (2014).

em uma formulação biofertilizante podem ser enumeradas e são bem discutidas na literatura. Dentre estas características, destacam-se: baixo custo de produção; uniformidade quanto às características físicas e químicas do produto (pH, umidade, granulometria, nutrientes); regularidade na qualidade e na aquisição das matérias primas utilizadas; facilidade de manipulação, transporte e armazenamento; ausência de toxidez ao homem e ao ambiente; afinidade pela água; biodegradabilidade; capacidade de sustentar uma alta concentração de células pelo período de armazenamento e no sítio de aplicação (ambiente do solo, ambiente da rizosfera, ambiente da filosfera); flexibilidade quanto às condições edafoclimáticas de uso e quanto às espécies microbianas veiculadas (BASHAN 1998; ALBAREDA et al., 2008). O desenvolvimento de uma formulação inoculante que apresente todas as características desejáveis não é uma tarefa trivial e provavelmente constitui o maior desafio para a consolidação desta tecnologia.

Uma das formas de se alcançar o desenvolvimento de uma formulação inoculante próxima do ideal é a utilização de misturas de materiais, considerando que a existência de todas as características desejáveis em uma única substância, sem que isto acarrete impedimentos econômicos para o desenvolvimento do produto, é reduzida. A mistura em proporções adequadas de diferentes materiais que possam apresentar propriedades aditivas quanto às características desejáveis em uma formulação inoculante, pode levar ao desenvolvimento de um produto de baixo custo. As propriedades sinérgicas resultantes da mistura dos materiais participantes da mistura podem favorecer uma maior eficiência funcional ao biofertilizante, e conseqüentemente a melhoria dos efeitos promotores do crescimento vegetal pelo uso de insumos microbianos (VAN ELSAS e HEIJNEN, 1990; HERRMANN e LESUEUR, 2013). Por outro lado, a utilização de diferentes substâncias para a produção de uma mistura homogênea pode apresentar dificuldades inerentes às características físico-químicas das substâncias envolvidas, o que pode resultar na instabilidade da mistura obtida decorrente de interações parciais (ou mesmo inexistentes) entre os componentes da mistura (MALUSÁ et al., 2012).

Alternativas recentes vêm sendo apresentadas ao uso de inoculantes líquidos e turfosos, fundamentadas no uso de misturas poliméricas

(BASHAN e GONZALEZ, 1999; DENARDIN e FREIRE, 2000; SILVA et al., 2012). Dentre os biopolímeros apresentados, estão carboximetilcelulose, alginato e amido. Estes polímeros são utilizados para a formação de microcápsulas, por diferentes processos, incluindo a extrusão a frio. A imobilização de células microbianas em uma matriz polimérica apresenta vantagens consideráveis sobre a inoculação direta no solo ou nas sementes, entretanto alguns fatores devem ser considerados, principalmente aqueles relacionados ao custo da formulação (BASHAN et al., 2008; SCHOEBITZ et al., 2013). O principal objetivo a ser alcançado pela encapsulação de BPCVs é a proteção das células contra um ambiente desfavorável como o solo, reduzindo a predação e a competição com os microrganismos nativos, promovendo a sua liberação gradual e contínua, consequentemente facilitando a colonização das raízes das plantas cultivadas (BASHAN, 1986; YOUNG et al., 2006; SCHOEBITZ et al., 2013). Qualquer que seja a formulação pretendida, líquida ou sólida, o desenvolvimento de um novo veículo inoculante deve considerar as mesmas características já comentadas, além de buscar funcionalidade para diferentes espécies microbianas, ser oriundo de uma fonte renovável e de baixo custo, ser atóxico e biodegradável, apresentando eficiência e versatilidade para diferentes condições de solo e clima, podendo ser transportado e armazenado sob temperatura ambiente.

Diferentes substâncias possuem influência quanto ao comportamento e sobrevivência das células microbianas adicionadas aos veículos inoculantes (TRUJILLO-ROLDÁN et al., 2013). Dentre os aditivos mais comuns utilizados em formulações líquidas, destacam-se:

1. Glicerol; apresenta boa interação com a água, elevada estabilidade físico-química e atua como isolante térmico e agente hidratante, podendo ser usado como fonte de carbono durante o crescimento microbiano (BASHAN, TREJO e DE-BASHAN 2011).
2. Biopolímeros (polivinil álcool - PVA, polivinil pirrolidona - PVP, polietileno glicol - PEG, bem como o alginato, a goma xantana e o amido); são adicionados para neutralizar compostos tóxicos, como os compostos fenólicos liberados na rizosfera (TITABUTR et al., 2007). Também possuem uma boa ligação com a água e atuam como agente hidratante;

além de melhorar a adesão das células microbianas à semente (TEMPRANO et al., 2002).

3. Carboidratos (glicose, sacarose) e diferentes tipos de rocha moída; utilizados em veículos inoculantes com a função de fornecer nutrientes para as células bacterianas quando introduzidas no solo e durante o período de armazenamento (ANANDHAM et al., 2007).

Além da influência dos componentes do meio de cultivo sobre o crescimento e produção de biomassa por bactérias, as condições de cultivo (temperatura, aeração, duração) também possuem importância sobre a qualidade do inoculante produzido. Considerando a diversidade de espécies bacterianas com potencial aplicação na promoção do crescimento vegetal, é praticamente impossível o desenvolvimento de uma formulação que seja aplicada à produção de biomassa microbiana de maneira universal. Os requerimentos nutricionais que levam cada estirpe de BPCV a um estado fisiológico de alta rizocompetência provavelmente são particulares a cada uma (MALUSÁ et al., 2012). Por outro lado, as características celulares que indicam a rizocompetência, mesmo que pouco exploradas pela literatura, podem se apresentar comuns entre diferentes espécies microbianas permitindo seu estudo de maneira comparativa (BASHAN e DE-BASHAN, 2005; MARASCO et al., 2012). Muitas das substâncias presentes na formulação do meio de cultura serão utilizadas pelas estirpes inoculantes como base para a biossíntese de biomoléculas de extrema importância para a qualidade dos inoculantes produzidos, como exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos (OKON; ITZIGSOHN, 1992; BURDMAN et al., 2000; KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003; BAHAT-SAMET; CASTRO-SOWINSKI; OKON, 2004). Estes polímeros possuem grande importância para desenvolvimento de formulações inoculantes de alta qualidade, atuando como fator de proteção das células microbianas contra a dissecação e facilitando sua adesão a superfícies, melhorando a viabilidade e rizocompetência das formulações (HUNGRIA et al., 2005; MALUSÁ et al., 2012). Além disso, o tempo de cultivo é determinante para a quantidade de moléculas de reserva (poli-hidroxitirato, poli-hidroxicanoato) armazenadas pelas células bacterianas (KEFALOGIANNI e AGGELIS, 2002; DONOT et al., 2012), como também para a qualidade e

concentração de moléculas de sinalização (fitormônios, lipoquitoligossacarídeos) presentes nos meios de cultivo (DOUFRÊNE e ROUXHET, 1996; PATTEN et al., 2013). A presença destas biomoléculas na formulação pode servir como parâmetro para a presença de biomassa celular com alta qualidade fisiológica e alta rizocompetência, apesar da grande carência de estudos sobre este tema.

A melhoria da qualidade e da eficiência de formulações inoculantes pode ser obtida pela adição de suplementos às formulações inoculantes, como demonstrado para *Bradyrhizobium japonicum*, onde microesferas compostas por glicerol, glutamato, fosfatos e extrato de levedura adicionadas à formulação final promoveu incrementos na nodulação de soja sob condições de estresse hídrico (FOUILLEUX et al., 1996). A adição de óxidos, como zinco e magnésio, também apresenta efeitos positivos na sobrevivência das células microbianas em veículos inoculantes a base de carboximetilcelulose (FERNANDES JÚNIOR et al., 2009). Os ácidos húmicos adicionados em formulações inoculantes são descritos por favorecer a sobrevivência das células durante o período de armazenamento, bem como proporcionar melhorias na performance do inoculante (YOUNG et al., 2006; CANELLAS et al., 2013). O uso de leite em pó desnatado também é um aditivo utilizado em formulações inoculantes, porém o efeito positivo da adição desta substância não está confirmado (BASHAN, 1986; TRIVEDI et al., 2005). De qualquer maneira, considerando que as interações entre BPCVs e as plantas não são promíscuas e que requerimentos de compatibilidade e rizocompetência são imprescindíveis para o sucesso do uso da tecnologia de inoculação em cultivos comerciais, é de extrema importância verificar sempre a validade do produto utilizado, as recomendações técnicas do fabricante relativas à dosagem e cultura-alvo e utilizar somente produtos registrados no MAPA como forma de garantir parâmetros mínimos de eficiência da tecnologia de biofertilizantes.

A qualidade dos inoculantes presentes no mercado é essencial para a eficiência deste produto. No Brasil os inoculantes produzidos têm sua qualidade controlada pelo MAPA, que adota alguns parâmetros determinados por protocolos produzidos pela RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola). A RELARE é um fórum em

que os pesquisadores se reúnem a cada dois anos e, após análise dos resultados obtidos, uma lista com o nome das melhores estirpes selecionadas passam a ser recomendadas para registro junto ao MAPA, para que possam ser distribuídas para a produção de inoculantes. A determinação das estirpes recomendadas é complexa, pois deve considerar fatores como: a eficiência para diferentes cultivares disponíveis no mercado, capacidade de competir com os organismos do solo, adequação à fermentação industrial e, principalmente, ter a capacidade de se adaptar aos solos, sem nenhum prejuízo à microflora natural do mesmo (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). No Brasil, existem diferentes normativas para a regulamentação de biofertilizantes, de acordo com o grupo bacteriano presente na formulação (rizóbios, bactérias associativas e bactérias promotoras de crescimento), sendo este produtos tratados como inoculantes. Existem atualmente no Brasil registros de microrganismos autorizados para produção de inoculantes para as culturas da soja, feijão, ervilha, milho, trigo, arroz, amendoim, entre outros (MAPA, 2011).

#### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A existência de inúmeras associações naturalmente existentes entre os vegetais e a microbiota do solo apresenta-se como um campo vasto para o desenvolvimento de biofertilizantes e outros insumos agrícolas de caráter biotecnológico. Os fenômenos de epigenética, atualmente em destaque na literatura mundial, confirmam a influência do ambiente sobre a expressão de genes e desta maneira as relações planta-microrganismos são interdependentes e podem levar tanto ao aumento do estado produtivo e fitossanitário dos vegetais, como à sua diminuição. A heterogeneidade de fatores de difícil controle em condições experimentais próximas às observadas no ambiente de produção agrícola apresentam-se como grande desafio ao entendimento destas interações e o maior conhecimento destes fatores deverá levar à estratégias de manejo e utilização dos biofertilizantes e sua consolidação como prática agrícola.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação Araucária, ao CNPq, ao INCT-FBN e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- ADESEMOYE, A. O.; KLOPPER, J. W. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1-12, 2009.
- ALAGAWADI, A. R.; GAUR, A. C. Inoculation of *Azospirillum brasilense* and phosphate-solubilizing bacteria on yield of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) moench] in dry land. **Tropical Agriculture**, v. 69, p. 347-350, 1992.
- ALBAREDA, M.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. N.; CAMACHO, M. TEMPRANO, F. J. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: solid and liquid formulations. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 2771-2779, 2008.
- AMBROSINI, A.; BENEDUZI, A.; STEFANSKI, T.; PINHEIRO, F. G.; VARGAS, L. K.; PASSAGLIA, L. M. P. Screening of plant growth-promoting rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Plant and Soil**, v. 356, p. 245-246, 2012.
- ANANDHAM, R.; CHOI, K. H.; GANDHI, I. P.; YIM, W. J.; PARK, S. J.; KIM, K. A.; MADHAIYANM M.; SA, T. M. Evaluation of shelf life and rock phosphate solubilization of *Burkholderia sp.* in nutrient-amended clay, rice bran and rock phosphate-based granular formulation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1121-1129, 2007
- ANDA – **Associação Nacional para a Difusão De Adubos**. Disponível em: <<http://www.anda.org.br/index.php?mpg=03.00.00&ver=por>>.
- BAHAT-SAMET, E.; CASTRO-SOWINSKI, S.; OKON, Y. Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 237, p. 195-203, 2004.
- BAKSHI, M.; VARMA, A. Soil enzyme: the state-of-art. In: SHUKLA, G; VARMA, A. (eds). **Soil enzymology: soil biology**. 1ª. edição. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2011.
- BALA, A.; MURPHY, F.; GILLER, K. E. Genetic diversity of rhizobia from natural populations varies with the soil dilution sampled. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p. 841-843, 2001.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 549-579, 2005.
- BARROTI, G.; NAHAS, E. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 2043-2050, 2000.
- BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v. 16, p. 729-770, 1998.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, E. Bacteria. In: **Encyclopedia of Soils in the Environment**. Hilliel, D. (ed). Oxford. v.1, p. 103-115, 2005.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, p. 77-136, 2010.
- 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 and Soil**, v. 378, p. 1-33, 2014.
- BASHAN, Y.; GONZALEZ, L. E. Long-term survival of the plant growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate beads. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 262-266, 1999.
- BASHAN, Y.; BASHAN, L. E.; HERNÁNDEZ, J. P.; PUENTE, M. E.; BACILIO, M.; LEYVA, L. A. Inoculantes microbianos sintéticos: son el futuro? In: **La biofertilización como tecnología sostenible**. Díaz-Franco, A. e Mayek-Pérez, N. (ed.). México. p. 167-186, 2008.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; FERRERA-CERRATO, R. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. **Terra**, v.14, p. 159-192, 1996.
- BASHAN, Y. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, p. 1089-1098, 1986.
- BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v. 16, p. 729-770, 1998.
- BASHAN, Y; TREJO, A; DE-BASHAN, L. E. Development of two culture media for mass cultivation of *Azospirillum spp.* and for production of inoculants to enhance plant growth. **Biology and Fertility of Soils**, v.47, p. 963-969, 2011.
- BENEDUZI, A.; PERES, D.; VARGAS, L. K.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; PASSAGLIA, L. M. P. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in south Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 39, p. 311-320, 2008.
- BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. A. H. M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, v. 17, p. 478-486, 2012.
- BEVER, J. D.; DICKIE, I. A.; FACELLI, E.; FACELLI, J. M.; KLIROMONOS, J.; MOORA, M.; RILLING, M. C.; STOCK, W. D.; TIBBETT, M.; ZOBEL, M. Rooting theories of plant community ecology in microbial interactions. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 25, p. 468-478, 2010.
- BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. Identification of gibberelins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. **Plant Physiology**, v. 90, p. 45-47, 1989.
- BROWN, M. T.; ULGIATI, S. Emergy-based indices and ratios to evaluate sustainability: monitoring economies and technology toward environmentally sound innovation. **Ecological Engineering**, v. 9, p. 51-69, 1997.

- BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; VAN THEMAAT, E. V. L.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 807-838, 2013.
- BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 573-606, 2000.
- BURDMAN, S.; JURKEVITCH, E.; SORIA-DÍAZ, M. E.; SERRANO, A. M.; OKON, Y. Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 189, p. 259-64, 2000.
- BURNS, R. G.; DEFOREST, J.L.; MARXSEN, J.; SINSABAUGH, R. L.; STROMBERGER, M. E.; WALLENSTEIN, M.D.; WEINTRAUB, M.N.; ZOPPINI, A. Soil enzymes in a changing environment: current knowledge and future directions. **Soil Biology and Biochemistry**, v.58, p. 216-234, 2013.
- CANELLAS, L. P.; BALMOLRI, D. M.; MÉDICI, L. O.; AGUIAR, N. O.; CAMPOSTRINI, E.; ROSA, R. C. C.; FAÇANHA, A. R.; OLIVARES, F. L. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, v. 366, p. 119-132, 2013.
- CARVALHAIS, L. C.; DENNIS, P. G.; FAN, B.; FEDOSEYENKO, D.; KIERUL, K.; BECKER, A.; VON WIREN, N.; BORRISS, R. Linking plant nutritional status to plant-microbe interactions. **PLOS One**, 8:e68555, 2013.
- CASSÁN, F.; SGROY, V.; PERRIG, D.; MASCIARELLI, O.; LUNA, V. Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. In: ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Cassán, F. D.; Garcia de Salomone, I. (eds). Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires. p. 59-84, 2008.
- CASSÁN, F.; MAIALE, S.; MASCIARELLI, O.; VIDAL, A.; LUNA, V.; RUIZ, O. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. **European Journal of Soil Biology**, v 45, p. 12–19, 2009.
- CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, p. 440-459, 2014.
- COHEN, A. C., BOTTINI, R., AND PICCOLI, P. N. *Azospirillum brasilense* sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in Arabidopsis plants. **Plant Growth Regulation**, v. 54, p. 97–103, 2008.
- 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, p. 669–678, 2010.
- 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: ***Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Cassán, F. D.; Garcia de Salomone, I. (eds). Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, p. 85-94, 2008.
- CREUS, C. M.; GRAZIANO, M.; CASANOVAS, E. M.; PEREYRA, M. A.; SIMONTACCHI, M.; PUNTARULO, S.; BARASSI, C. A.; LAMATTINA, L. Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. **Planta**, v. 221, p. 297–303, 2005.
- DANHORN, T.; FUQUA, C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, p. 401-422, 2007.
- DAVISON, J. Plant beneficial bacteria. **Bio/technology**, v. 6, p. 282-286, 1988.
- DEEPA, C. K.; DASTAGER, S. G.; PANDEY, A. Isolation and characterization of plant growth-promoting bacteria from non-rhizospheric soil and their effect on cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seedling growth. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1233-1240, 2010.
- DENARDIN, N. D.; FREIRE, J. R. J. Assessment of polymers for the formulation of legume inoculants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 215-217, 2000.
- DEUTSCHBAUER, A. M.; CHIVIAN, D.; ARKIN, A. P. Genomics for environmental microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, p. 229-235, 2006.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, p. 107–149, 2003.
- DOBEREINER, J. *Azotobacter paspali*, sp. nov., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 3, p. 1-6, 1966.
- DOBEREINER, J.; FRANCO, A. A.; GUZMAN, I. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 5, p. 155-161, 1970.
- DOBEREINER, J. *Azotobacter* em solos ácidos. **Boletim do Instituto de Ecologia e Experimentação Agrícola**, v. 11, p. 1-36, 1953.
- DODD, I. C.; RUIZ-LOZANO, J. M. Microbial enhancement of crop resource use efficiency. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 236-242, 2012.
- DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 951-962, 2012.
- DOORNBOS, R. F.; VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, p. 227-243, 2012.
- DUBEY, S.K.; TRIPATHI, A. K.; UPADHYAY, S.N. Exploration of soil bacterial communities for their potential as bioresource. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2217–2224, 2006.
- DUFRÊNE, Y. F.; ROUXHET, P. G. Surface composition, surface properties, and adhesiveness of *Azospirillum brasilense* – variation during growth. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 548-556, 1996.

- FERNANDES JUNIOR, P. I.; ROHR, T.G.; OLIVEIRA, P.J.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. Polymers as carrier for rhizobial inoculant formulations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1184-1190, 2009.
- FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; MARTINEZ, C. R.; CHANWAY, C.P. Alleviation of water stress effects in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation *Paenibacillus* x *Rhizobium tropici*. **Applied Soil Ecology**, v. 40, p. 182–188, 2008.
- FOUILLEUX, G.; REVELLIN, C., HARTMANN, A., CATROUX, G. Increase of *Bradyrhizobium japonicum* numbers in soils and enhanced nodulation of soybean (*Glycine max* (L.) merr.) using granular inoculants amended with nutrients. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 20, p. 173-183, 1996.
- FOWLER, D.; COYLE, M.; SKIBA, U.; SUTTON, M. A.; CAPE, J. N.; REIS, S.; SHEPPARD, L. J.; JENKINS, A.; GRIZZETTI, B.; GALLOWAY, J. N.; VITOUSEK, P.; LEACH, A.; BOUWMAN, A. F.; BUTTERBACH-BAHL, K.; DENTENER, F.; STEVENSON, D.; AMANN, M.; VOSS, M. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, 368, 20130164, 2013. doi:10.1098/rstb.2013.0164.
- FREIRE, J. R. J. A inoculação artificial das leguminosas com bactérias radicícolas. Porto Alegre: **Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul, SIPA, Circular 5**, 1953.
- GAIERO, J. R.; MCCALL, C. A.; THOMPSON, K. A.; DAY, N. J.; BEST, A. S.; DUNFIELD, K. E. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. **American Journal of Botany**, v. 100, p. 1738-1750, 2013.
- GALLI, F. Inoculações cruzadas com bactérias dos nódulos de leguminosas tropicais. **Revista de Agricultura**, v. 33, p. 139-150, 1958.
- GAVA, G. J. C.; TRIVELIN, P. C. O.; OLIVEIRA, M. W.; HEINRICH, R.; SILVA, M. A. Balanço do Nitrogênio da uréia (<sup>15</sup>N) no sistema solo-planta na implantação da semeadura direta na cultura do milho. **Bragantia**, v. 65, p. 477-486, 2006.
- GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, article id 963401, 2012. doi:10.6064/2012/963401.
- GOES, K. C. G. P.; FISHER, M. L. C.; CATTELAN, A. J.; NOGUEIRA, M. A.; CARVALHO, C. G. P.; OLIVEIRA, A. L. M. Biochemical and molecular characterization of high population density bacteria isolated from sunflower. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 437-447, 2012.
- GOMES, E. G.; MELLO, J. C. C. B. S.; MANGABEIRA, J. A. C. Estudo da sustentabilidade agrícola em município amazônico com análise envoltória de dados. **Pesquisa Operacional**, v. 29, p. 23-42, 2009.
- GONZALEZ, A.; KING, A.; ROBESON II, M. S.; SONG, S.; SHADE, A.; METCALF, J. L.; KNIGHT, R. Characterizing microbial communities through space and time. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p.431-436, 2012.
- HARTMANN, A.; SCHIMD, M.; VAN TUINEN, D.; BERG, G. Plant-driven selection of microbes. **Plant and Soil**, v. 321, p. 235-257, 2009.
- HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, v. 311, p. 1-18, 2008.
- HERRMANN, L.; LESUEUR, D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 8859-8873, 2013.
- HOL, W. H. G.; DE BOER, W.; TERMORSHUIZEN, A. J.; MEYER, K. M.; SCHNEIDER, J. H. M.; VAN DAM, N. M.; VAN VEEN, J. A.; VAN DER PUTTEN, W. H. Reduction of rare soil microbes modifies plant-herbivore interactions. **Ecology Letters**, v. 13, p. 292–301, 2010.
- HUNGRIA, M.; LOUREIRO, M. F.; MENDES, I. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H. Inoculant preparation, production and application. In: **Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment**. Werner, D.; Newton, W. E. (eds). Kluwer, Dordrecht, p. 223-253, 2005.
- 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, p. 413–425, 2010.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, p. 791-801, 2013.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, Documentos 283, 80p., 2007
- JAMES, E. K.; BALDANI, J. I. The role of biological nitrogen fixation by non-legumes in the sustainable production of food and biofuels. **Plant and Soil**, v. 356, p. 1-3, 2012.
- JI, S. H.; GURURANI, M. A.; CHUN, S. C. Isolation and characterization of plant growth-promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. **Microbiological Research**, v. 169, p. 83-98, 2014.
- JONES, D. L.; CROSS, P.; WITHERS, P. J. A.; DELUCA T. H.; ROBINSON, D. A.; QUILLIAM, R. S.; HARRIS, I. M.; CHADWICK, D. R.; EDWARDS-JONES G. Nutrient stripping: the global disparity between food security and soil nutrient stocks. **Journal of Applied Ecology**, v. 50, p. 851-862, 2013.
- KADOURI, D.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Involvement of the reserve material poly-hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 3244-3250, 2003.
- KEFALOGIANNI, I.; AGGELIS, G. Modelling growth and biochemical activities of *Azospirillum* sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 352-357, 2002.
- KIM, D. S.; WELLER, D. M. E COOK, R. J. Population dynamics of *Bacillus* sp. L324-92R12 and *Pseudomonas fluorescens* 2-79RN10 in the rhizosphere of wheat. **Phytopathology**, v.87, p. 559-564, 1997.
- KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, v. 7, p. 39-43, 1989.

- KUJUR, M.; GARTIA, S.K.; PATEL, A.K. Quantifying the contribution of different soil properties on enzyme activities in dry tropical ecosystems. **ARPN Journal of Agricultural and Biological Science**, v.7, p. 763-772, 2012.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6, p. 1244-1251, 2004.
- LAMBRECHT, M.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. The use of GUS reporter system to study molecular aspects of interactions between bacteria and plants. In: **Tracking genetically-engineered microorganisms**. JANSSON, J. K.; VAN ELSAS, J. D.; BAILEY, M. J. (Eds). RG Landes Bioscience, Georgetown, p. 87-97, 2000.
- LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, p. 541-556, 2009.
- MAIER, R. M.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. **Environmental Microbiology**, 1a. edição. San Diego: Academic Press, 2000.
- MALUSÁ, E.; SAS-PASZT, L.; CIESIELSKA, J. Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. **The Scientific World Journal**, Article ID 491206, 12 p., 2012.
- MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, **Instrução Normativa Nº 13, de 24 de março de 2011**. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil.
- MAPA – **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Estatísticas e Dados Básicos de Economia Agrícola – Setembro/2013**. Disponível em <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/Pasta%20de%20Setembro%20\(1\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/Pasta%20de%20Setembro%20(1).pdf)>
- MARASCO, R.; ROLLI, E.; ETTOUMI, B.; VIGANI, G.; MAPELLI, F.; BORIN, S.; ABOU-HADID, A. F.; EL-BEHAIRY, U. A.; SORLINI, C.; CHERIF, A.; ZOCCHI, G.; DAFFONCHIO, D. A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming. **PLoS ONE**, v. 7, Article ID e48479, 14 p., 2012.
- MARON, P.-A.; MOUGEL, C.; RANJARD, L. Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. **Comptes Rendus Biologies**, v. 334, p. 403-411, 2011.
- MILANI, K. M. L.; SANTOS, O. J. A. P.; SILVA, M.; LEZIÉR, D.; BARREIRA, B.; OLIVEIRA, A. L. M. Influência do meio de cultivo sobre a população e produção de exopolissacarídeos por *Azospirillum brasilense* Ab-V5. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, p. 212–215, 2013.
- MIRZA, M. S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K. A. Isolation, partial characterization, and effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. **Plant and Soil**, v. 237, p. 47-54, 2001.
- MOSSE, B. Growth and chemical composition of mycorrhizal and non-mycorrhizal apples. **Natura**, v. 179, p. 922-924, 1957.
- MOTTA, P.E.F.; CURTI, N.; SIQUEIRA, J.O.; VAN RAIJ, B.; FURTINI NETO, A.E.; LIMA, J.M. Adsorção e formas de fósforo em Latossolos: influência da mineralogia e histórico de uso. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.26, p.349-359, 2002.
- MÜLLER, S.; HARMS, H.; BLEY, T. Origin and analysis of microbial population heterogeneity in bioprocesses. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 100-113, 2010.
- NAIMAN, A. D.; LATRÓNICO, A.; GARCÍA DE SALAMONE, I. E. Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact on the production and culturable rhizosphere microflora. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 44–51, 2009.
- NIEVAS, F.; BOGINO, P.; NOCELLI, N.; GIORDANO, W. Genotypic analysis of isolated peanut-nodulating rhizobial strains reveals differences among populations obtained from soils with different cropping histories. **Applied Soil Ecology**, v. 53, p. 74-82, 2012.
- O'CALLAGHAN, M.; GERARD, E. M.; JOHNSON, V. W. Effect of soil moisture and temperature on survival of microbial control agents. **New Zealand Plant Protection**, v. 54, p. 128-135, 2001.
- OKON, Y.; ITZIGSOHN, R. Poly-  $\beta$ - 3-hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* and the ecological role of PHB in the rhizosphere. **FEMS Microbiology reviews**, v. 103, p. 131-139, 1992.
- OLIVARES, F. Bactérias promotoras do crescimento vegetal. **Boletim Informativo da SBCE**, p. 33-34, 2009.
- 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 and Soil**, v. 284, p. 23-32, 2006.
- PARTIDA-MARTÍNEZ, L. P.; HEIL, M. The microbe-free plant: fact or artifact? **Frontiers in Plant Science**, v. 2, p. 1-16, 2011.
- PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 207–220, 1996.
- PATTEN, C. L.; BLAKNEY, A. J. C.; COULSON, T. J. D. Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 39, p. 395-415, 2013.
- PENROSE, D.M.; GLICK, B. R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. **Physiologia Plantarum**, v. 118, p. 10-15, 2003.
- PERRIG, D.; BOIERO, L.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; CASSÁN, F.; LUNA, V. Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 1143-1150, 2007.
- RANA, A.; SAHARAN, B.; JOSHI, M.; PRASANNA, R.; KUMAR, K.; NAIN, L. Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. **Annals of Microbiology**, v. 61, p. 893–900, 2011.
- REHM, B. H. A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 578-592, 2010.
- RICHARDSON, A. E.; HOCKING, P. J.; SIMPSON, R. J.; GEORGE, T. S. Plant mechanisms to optimize access to soil phosphorus. **Crop and Pasture Science**, v. 60, p. 124-143, 2009.

- RICHARDSON, A. E.; LYNCH, J. P.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; SMITH, F. A.; SMITH, S. E.; HARVEY, P. R.; RYAN, M. H.; VENEKLAAS, E. J.; LAMBERS, H.; OBERSON, A.; CULVENOR, R. A.; SIMPSON, R. J. Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. **Plant and Soil**, v. 349, p. 121-156, 2011.
- RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 319-339, 1999.
- RODRIGUEZ R, REDMAN R. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 1109-1114, 2008.
- RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, p. 552-555, 2004.
- ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 19, p. 827-837, 2006.
- ROVIRA, A. D. Root excretions in relation to the rhizosphere effect. **Plant and Soil**, v. 11, p. 53-64, 1959.
- RUSO, A.; FELICI, C.; TOFFANIN, A.; GÖTZ, M.; COLLADOS, C.; BAREA, J. M.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; SMALLA, K.; VANDERLEYDEN, J.; NUTI, M. Effect of *Azospirillum* inoculants on arbuscular mycorrhiza establishment in wheat and maize plants. **Biology and Fertility of Soils**, v. 41, p. 301-309, 2005.
- RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, p. 1-9, 2008.
- SAHARAN, B. S.; NEHRA, V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. **Life Sciences and Medicine Research**, v.21, p. 1-30, 2011.
- SALEEM, M.; LAMKEMEYER, T.; SCHÜTZENMEISTER, A.; MADLUNG, J.; SAKAI, H.; PIEPHO, H. P.; NORDHEIM, A.; HOCHHOLDINGER, F. Specification of cortical parenchyma and stele of maize primary roots by asymmetric levels of auxin, cytokinin, and cytokinin-regulated proteins. **Plant Physiology**, v. 152, p. 4-18, 2010.
- SCHLOTTER, M.; DILLY, O.; MUNCH, J. C. Indicators for evaluating soil quality, **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 98, p. 255-262, 2003.
- SCHNEIDER, K. D.; VAN STRAATEN, P.; DE ORDUÑA, R. M.; GLASAUER, S.; TREVORS, J.; FALLOW, D.; SMITH, P. S. Comparing phosphorus mobilization strategies using *Aspergillus niger* for the mineral dissolution of three phosphate rocks. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 266-274, 2010.
- SHARMA, R.; SONI, S. K.; VOHRA, R. M.; GUPTA, L. K.; GUPTA, J. K. Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1075-1084, 2002.
- SHOEBITZ, M.; LÓPEZ, M. D.; ROLDÁN, A. Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil-plant fertilization. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 33, p. 751-765, 2013.
- SILVA, M. F.; ANTÔNIO, C. S.; OLIVEIRA, P. J.; XAVIER, G. R.; RUMJANECK, N. G.; SOARES, L. H. B.; REIS, V. M. Survival of endophytic bacteria in polymer-based inoculants and efficiency of their application to sugarcane. **Plant and Soil**, v. 356, p. 231-243, 2012.
- SINGH, J. S.; PANDEY, V. C.; SINGH, D. P. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 140, p. 339-353, 2011.
- SINGH, P.; KUMAR, V.; AGRAWAL, S. Evaluation of phytase producing bacteria for their plant growth promoting activities. **International Journal of Microbiology**, v. 2014, Article ID 426483, 2014. doi:10.1155/2014/426483.
- SMITH, S. E.; SMITH, F. A. Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. **Mycologia**, v. 104, p. 1-13, 2012.
- SMYTH, E. M.; MCCARTHY, J.; NEVIN, R.; KHAN, M. R.; DOW, J. M.; O'GARA, F.; DOOHAN, F. M. *In vitro* analyses are not reliable predictors of the plant growth promotion capability of bacteria; a *Pseudomonas fluorescens* strain that promotes the growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 683-692, 2011.
- SON, J. S.; SUMAYO, M.; HWANG, Y. J.; KIM, B. S.; GHIM, S. Y. Screening of plant growth-promoting rhizobacteria as elicitor of systemic resistance against grey leaf spot disease in pepper. **Applied Soil Ecology**, v. 73, p. 1-8, 2014.
- STARK, C. H.; CONDRON, L. M.; O'CALLAGHAN, M.; STEWART, A.; DI, H. J. Differences in soil enzyme activities, microbial community structure and short-term nitrogen mineralisation resulting from farm management history and organic matter amendments, **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p.1352-1363, 2008.
- STRIGUL, N. S.; KRAVCHENKO, L. V. Mathematical modelling of PGPR inoculation into the rhizosphere. **Environmental Modelling and Software**, v.21, p. 1158-1171, 2006.
- STRZELCZYK, E.; KAMPER, M.; LI, C. Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. **Microbiological Research**, v. 149, p. 55-60, 1994.
- TEMPRANO, F.J; ALBAREDA, M; CAMACHO M; SANTAMARÍA, C; NOMBRE RODRÍGUEZ-NAVARRO, C. Survival of several *Rhizobium/Bradyrhizobium* strains on different inoculant formulations and inoculated seeds. **International Microbiology**. V. 5, p. 81-86, 2002.
- THRALL, P. H.; OAKESHOTT, J. G.; FITT, G.; SOUTHERTON, S.; BURDON, J. J.; SHEPPARD, A.; RUSSELL, R. J.; ZALUCKI, M.; HEINO, M.; DENISON, R. F. Evolution in agriculture: the application of evolutionary approaches to the management of biotic interactions in agro-ecosystems. **Evolutionary Applications**, v. 4, p. 200-215, 2011.
- TIEN, T. M.; GASKENS, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p.1016-1024, 1979.

TITTABUTR, P.; PAYAKAPONG, W.; TEAUMROONGA, N.; SINGLETON, P. W.; BOONKERDA, N. Growth, survival and field performance of bradyrhizobial liquid inoculants formulations with polymeric additives. **Science Asia**, v. 33, p. 69-77, 2007.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems, **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 240-245, 2002.

TRIVEDI, P.; PANDEY, A.; PALNI, L. M. S. Carrier-based preparations of plant growth-promoting bacterial inoculants suitable for use in cooler regions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 941-945, 2005.

TRIVELIN, P. C. O.; OLIVEIRA, M. W.; VITTI, A. C.; GAVA, G. J. C.; BENDASSOLLI, J. A. Perdas do nitrogênio da uréia no sistema solo planta em dois ciclos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 193-201, 2002.

TRUJILLO-ROLDÁN, M. A.; VALDEZ-CRUZ, N. A.; GONZALEZ-MONTERRUBIO, C. F.; ACEVEDO-SÁNCHEZ, E. V.; MARTÍNEZ-SALINAS, C.; GARCÍA-CABRERA, R. I.; GAMBOA-SUASNAVART, R. A.; MARÍN-PALACIO, L. D.; VILLEGAS, J.; BLANCAS-CABRERA, A. Scale-up from shake flasks to pilot-scale production of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* for preparing a liquid inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 9665-9674, 2013.

TURNBULL, A. L.; LIU, Y.; LAZAROVITS, G. Isolation of bacteria from the rhizosphere and rhizoplane of potato (*Solanum tuberosum*), grown in two distinct soils using semi selective media and characterization of their biological properties. **American Journal of Potato Research**, v. 89, p. 294-305, 2012.

TURNER, T. R.; JAMES, E. K.; POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome Biology**, v. 14, 209, 2013.

VAN DER HEIJDEN, M. G. A.; BARDGETT, R. D.; VAN STRAALLEN, N. M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial systems. **Ecology Letters**, v. 11, p. 296-310, 2008.

VAN ELSAS, J. D. E. HEIJNEN, C. E. Methods for the introduction of bacteria into soil: a review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 10, p. 127-133, 1990.

VERESOGLOU, S. D.; MENEXES, G. Impact of inoculation with *Azospirillum* spp. on growth properties and seed yield of wheat: a meta-analysis of studies in the ISI Web of Science from 1981 to 2008. **Plant and Soil**, v. 337, p. 469-480, 2010.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water Rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.

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

VITOUSEK, P. M.; MENGE, D. N. L.; REED, S. C.; CLEVELAND, C. C. Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 368, Article ID 20130119, 2013. doi: 10.1098/rstb.2013.0119.

WALKER, V.; COUILLEROT, O.; VON FELTEN, A.; BELLVERT, F.; JANSA, J.; MAURHOFER, M.; BALLY, R. MOËNNE-LOCCOZ, Y.; COMTE, G. Variation of secondary metabolite levels in maize seedling roots induced by inoculation with *Azospirillum*, *Pseudomonas* and *Glomus* consortium under field conditions. **Plant and Soil**, v. 356, p. 151-163, 2011.

YANG, J.; KLOPPER, J. W.; RYU, C. M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 1-4, 2009.

YOUNG, C. C.; REKHA, P. D. LAI, W. A.; ARUN, A. B. Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 95, p. 76-83, 2006.

YU, X.; LIU, X.; ZHU, T. H.; LIU, G. G.; MAO, C. Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. **European Journal of Soil Biology**, v. 50, p. 112-117, 2012.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, v. 23, p. 753-771, 2006.

RECEIVED 01 Jun 2014

ACCEPTED 22 Sep 2014