

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM AGROECOLOGIA

RONES DOS SANTOS CASTRO

**GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE
MILHO SOB APLICAÇÃO DE BIOFERTILIZANTES
INOCULADOS COM *Azospirillum brasilense***

São Luís - MA

2017

RONES DOS SANTOS CASTRO
LICENCIADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE MILHO SOB APLICAÇÃO DE
BIOFERTILIZANTES INOCULADOS COM *Azospirillum brasilense***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, para obtenção do título de Mestre em Agroecologia.

Orientador: Prof. Dr. Altamiro Souza de Lima Ferraz Júnior

São Luís - MA

2017

Castro, Rones dos Santos.

Germinação e crescimento inicial de milho sob aplicação de biofertilizantes inoculados com *Azospirillum brasilense* / Rones dos Santos Castro. – São Luís, 2017.

60 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, Universidade Estadual do Maranhão, 2017.

Orientador: Prof. Dr. Altamiro Souza de Lima Ferraz Junior.

1. *Zea mays* L.. 2. Bactéria diazotrófica. 3. Esterco bovino.
4. Resíduos de pescado. I. Título.

CDU 633.15:631.86

RONES DOS SANTOS CASTRO

**GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE MILHO SOB APLICAÇÃO DE
BIOFERTILIZANTES INOCULADOS COM *Azospirillum brasilense***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, para obtenção do título de Mestre em Agroecologia.

Aprovado em: 08/03/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Altamiro Souza de Lima Ferraz Júnior - Orientador

Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

Prof. Dr. Marlon Gomes da Costa

Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

Prof. Dr. Paulo Medeiros dos Santos

Instituto Federal do Maranhão - IFMA

AGRADECIMENTOS

Como é bom ter você
Me amparando, você
Hoje eu sou feliz
Você me ajuda a lutar, e vencer

Onde quer que eu ande
No caminho está você
Onde quer que eu vá
Tenho uma palavra amiga pra me acompanhar
Como eu sou feliz!
Toda essa felicidade agradeço a você - você!

Letra da música “Agradecimento”, do cantor Benito di Paula.

Meus agradecimentos a:

Maria dos Angelo dos Santos Castro (mãe).
Francisco dos Reis Barros Castro (pai).
Marcelo dos Santos Castro (irmão).
Ana Carolina Torrente Pereira (companheira).
Rayanne Cristine Cardoso Ewerton Ferreira (secretária PPGA).
Antonia Alice Costa Rodrigues (professora PPGA).
Altamiro Souza de Lima Ferraz Júnior (professor PPGA).

“Eu gosto de catar o mínimo e o escondido. Onde ninguém mete o nariz, aí entra o meu, com a curiosidade estreita e aguda que descobre o encoberto”.

Machado de Assis

RESUMO

Os resíduos de pescado são muitas vezes depositados indiscriminadamente no meio ambiente. Esses resíduos podem ser utilizados na produção de biofertilizantes, facilmente produzidos pelo agricultor. Além de fornecer nutrientes, os biofertilizantes podem disponibilizar microrganismos. O *Azospirillum brasilense* é uma bactéria diazotrófica capaz de possibilitar a economia de fertilizantes nitrogenados e melhorar o crescimento e desenvolvimento de plantas de milho (*Zea mays* L). O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de biofertilizantes produzidos com resíduos de pescado inoculados com *A. brasilense* sobre o crescimento inicial de plantas de milho. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado seguindo o arranjo fatorial $2 \times 5 + 1$, com quatro repetições. Os tratamentos consistiram da combinação da ausência ou presença de *A. brasilense* em biofertilizantes produzidos com cinco substituições do componente esterco bovino por resíduos de pescado: BIO 100EB:0RP; BIO 75EB:25RP; BIO 50EB:50RP; BIO 25EB:75RP; e BIO 0EB:100RP. Biofertilizantes à base exclusivamente de resíduos de pescado ou destes em associação com esterco bovino influenciaram negativamente a prevalência da bactéria *A. brasilense* e ao contrário para os biofertilizantes produzidos exclusivamente com esterco bovino. A germinação de sementes do híbrido de milho AG 1051 não foi afetada por solução a 10% de biofertilizantes, inoculados ou não com a bactéria *A. brasilense*. O crescimento de plantas do híbrido de milho AG 1051, avaliado aos 45 dias após a semeadura nas condições do presente trabalho, foi, de um modo geral, positivamente influenciado pela aplicação de solução a 20% de biofertilizantes exclusivamente à base de resíduos de pescado e pela inoculação da bactéria *A. brasilense*.

Palavras-chave: *Zea mays* L.. Bactéria diazotrófica. Esterco bovino. Resíduos de pescado.

ABSTRACT

Fish waste is often deposited indiscriminately in the environment. These wastes can be used in the production of biofertilizers, easily produced by the farmer. In addition to providing nutrients, biofertilizers can provide microorganisms. *Azospirillum brasilense* is a diazotrophic bacteria capable of saving nitrogenous fertilizers and improving the growth and development of maize plants (*Zea mays* L). The aim of this work was to evaluate the use of biofertilizers produced with fish waste inoculated with *A. brasilense* on the initial growth of maize plants. The experimental design was completely randomized according to the factorial arrangement 2 x 5 + 1, with four replications. The treatments consisted of the combination of the absence or presence of *A. brasilense* in biofertilizers produced with five substitutions of the bovine manure component for fish waste: BIO 100EB:0RP; BIO 75EB:25RP; BIO 50EB:50RP; BIO 25EB:75RP; and BIO 0EB:100RP. Biofertilizers based exclusively on fish waste or those in association with bovine manure had a negative influence on the prevalence of the *A. brasilense* bacteria and on the contrary for the biofertilizers produced exclusively with bovine manure. The germination of AG 1051 maize hybrid seeds was not affected by 10% solution of biofertilizers, inoculated or not with *A. brasilense* bacteria. The growth of AG 1051 maize hybrid, evaluated at 45 days after sowing in the conditions of the present study, was, in general, positively influenced by the application of a 20% solution of biofertilizers based exclusively on fish waste and inoculation of *A. brasilense* bacteria.

Key words: *Zea mays* L.. Diazotrophic bacteria. Bovine manure. Fish waste.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) nos biofertilizantes inoculados (médias seguidas da mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey)..... 39
- Figura 2.** Valores médios para o comprimento da parte aérea de plântulas de milho em função da aplicação de diferentes tipos de biofertilizantes, sem e com adição de *A. brasilense* (médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, com letras minúsculas para bactéria e maiúsculas para tipo de biofertilizante)..... 40
- Figura 3.** Valores médios para o comprimento de raiz de plântulas de milho em função da aplicação de diferentes tipos de biofertilizantes (a) e da adição ou não de *A. brasilense* (b) (médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey)..... 41
- Figura 4.** Valores médios para o número de sítios de mitose (NSM) em raízes de plântulas de milho em função da aplicação de diferentes tipos de biofertilizantes (médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey). 42
- Figura 5.** Valores médios para o teor de clorofila (SPAD) em plantas de milho em função da aplicação de diferentes tipos de biofertilizantes (médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey). 44
- Figura 6.** Valores médios para o diâmetro de caule em plantas de milho em função da aplicação de diferentes tipos de biofertilizantes (médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey). 44
- Figura 7.** Valores médios para a área foliar de plântulas de milho em função da aplicação de diferentes tipos de biofertilizantes (a) e da adição ou não de *A. brasilense* (b) (médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey). 45
- Figura 8.** Valores médios para o nitrogênio total em plantas de milho em função da aplicação de diferentes tipos de biofertilizantes, sem e com adição de *A. brasilense* (médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, com letras minúsculas para bactéria e maiúsculas para tipos de biofertilizantes). 46

Figura 9. Valores médios para a matéria fresca (a) e seca (b) de plantas de milho em função da aplicação de diferentes tipos de biofertilizantes (médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey).47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química dos biofertilizantes, com (CB) e sem (SB) bactéria.....	36
Tabela 2. Caracterização química do solo utilizado no experimento de milho em vasos.	38
Tabela 3. Resumo da análise de variância dos parâmetros relacionados à germinação de plântulas de milho e número de sítios de mitose, mais tratamento controle.	40
Tabela 4. Resumo da análise de variância dos parâmetros relacionados ao crescimento inicial de plantas de milho, mais tratamento controle.	43

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	11
1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1. Resíduos de pescado	14
2.2. Biofertilizante	15
2.3. Uso de biofertilizante na agricultura.....	19
2.4. Bactérias diazotróficas	20
2.5. Nitrogênio na agricultura	22
REFERÊNCIAS	24
CAPÍTULO II.....	31
RESUMO	32
ABSTRACT	32
INTRODUÇÃO.....	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
CONCLUSÕES	47
AGRADECIMENTOS	48
REFERÊNCIAS	48
ANEXO	52

REFERENCIAL TEÓRICO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

O fornecimento de nutrientes é uma etapa importante da atividade agrícola, pois dela depende o sucesso da agricultura, principalmente na cultura do milho. Normalmente, são utilizados fertilizantes químicos nessa prática, que são mais onerosos e podem gerar poluição ambiental. Sendo assim, formas alternativas de adubação podem ajudar a reduzir o custo de produção e proporcionar benefícios econômicos e ambientais. Dentre essas possibilidades destacam-se a produção de biofertilizante, produzido a partir de resíduos orgânicos, e a utilização de bactérias diazotróficas.

Com o aumento da produção pesqueira, as agroindústrias de beneficiamento de pescado vêm crescendo, gerando grande quantidade de resíduos, que muitas vezes não são reaproveitados. No processo de produção de filé de pescado é comum o descarte de 65% do peso vivo de pescado, com aproveitamento de apenas 35% (VALENTE *et al.*, 2014). Com elevado potencial poluente, se depositados de forma inadequada, esses resíduos podem gerar impacto ambiental. Nesse sentido, sua utilização na produção de biofertilizante, um tipo de adubo orgânico, é uma forma correta de destinação, reduzindo o risco de poluição orgânica.

O biofertilizante é um material estabilizado que representa um estímulo para a agricultura por possuir vários nutrientes importantes para adubação das culturas (MIRANDA *et al.*, 2012). Esse composto é o resultado da biodigestão de resíduos orgânicos, na qual podem ser utilizados resíduos tais como matéria orgânica de origem animal, resíduos em geral provenientes de colheita, rochas moídas, melaço e leite, que ocorre na presença ou na ausência de oxigênio. De baixo custo, esse composto tem a vantagem de poder ser produzido dentro da propriedade, utilizando matérias-primas locais.

Outra alternativa de fornecimento de nutrientes é a utilização de bactérias diazotróficas, que são aquelas que têm a capacidade de realizar a fixação biológica de nitrogênio, um dos principais nutrientes demandados pela agricultura, e que muitas vezes limita a produção agrícola. Esses microrganismos convertem o nitrogênio atmosférico, que está em uma forma não assimilável pelas plantas (N_2), em formas que podem ser absorvidas, como a amônia (NH_3). Um importante grupo de bactérias diazotróficas é o gênero *Azospirillum*.

Muitas pesquisas vêm sendo realizadas com os organismos desse gênero, principalmente da espécie *Azospirillum brasilense*. Além de fornecer nutrientes às plantas, eles podem estimular a produção de fitohormônios de crescimento. De acordo com Silva

(2014), bactérias como essas podem sintetizar fitohormônios, principalmente as auxinas, afetando a morfologia das raízes, aumentando seu comprimento, número de pêlos radiculares e melhorando a absorção de nutrientes. Como consequência, a planta tem melhor desenvolvimento.

Neste trabalho, foram consideradas as hipóteses de que o biofertilizante produzido com resíduos de pescado em substituição ao esterco bovino funciona como veículo de aplicação de *A. brasilense* e que os biofertilizantes inoculados com *A. brasilense* melhoram os índices de germinação das sementes, a qualidade das plantas, a absorção de N pelas plantas de milho. O objetivo do trabalho foi avaliar o uso de biofertilizantes produzidos com resíduos de pescado inoculados com *A. brasilense* sobre o crescimento inicial de plantas de milho.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Resíduos de pescado

O aproveitamento agrícola de resíduos agroindustriais na produção de adubos orgânicos promove a sustentabilidade dos sistemas agrícolas por possibilitar a reciclagem de nutrientes no sistema e redução da contaminação ambiental, decorrente de uma disposição inadequada (PRIMO *et al.*, 2010).

A reciclagem de resíduos orgânicos produzidos pela cadeia produtiva do pescado é uma alternativa para a produção de fertilizantes orgânicos, já que poderiam ser descartados inadequadamente e assim impactar o meio ambiente (SANES *et al.*, 2015).

Os resíduos de pescado são muitas vezes depositados de forma indiscriminada no meio ambiente, gerando poluição orgânica. De acordo com Lima *et al.* (2014), as indústrias brasileiras que processam pescado produzem grande quantidade de resíduos, que são pouco reaproveitados. No processo de produção de filé são descartados 65% do peso vivo de pescado, com aproveitamento de apenas 35% (VALENTE *et al.*, 2014). Em razão disso, um problema sanitário e ambiental é criado, sendo de responsabilidade de produtores e indústrias (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Esses resíduos são constituídos em grande parte por cabeça, vísceras, nadadeiras e espinhaço (PETENUCCI *et al.*, 2010), além de cauda, barbatana, escamas e restos de carne (VALENTE *et al.*, 2016). Conforme Rodrigues (2016), resíduos de pescado são produzidos em toda cadeia produtiva pesqueira, da captura até a comercialização.

Resíduos de pescado podem ser utilizados na produção de subprodutos com valor agregado, o que pode ser uma alternativa de reaproveitamento desse tipo de material (FELTES *et al.*, 2009). Segundo Rodrigues (2016), os resíduos de pescados podem ser processados para obtenção de óleo, farinha ou silagem, que podem ser utilizados na produção animal. Além disso, novas tecnologias podem ser aplicadas de forma a possibilitar a utilização desse tipo de resíduo em outras áreas, sendo seu emprego na agricultura uma possibilidade. Conforme Valente *et al.* (2016), a exploração de outras potencialidades é importante para a cadeia produtiva do pescado, o que torna a produção de adubos orgânicos a partir de resíduos de pescado uma alternativa.

A indisponibilidade de fertilizantes que atendam às exigências dos sistemas de produção orgânica é um fator limitante a massificação desses sistemas (SANES *et al.*, 2015). Considerando isso, resíduos de pescado podem ser utilizados na produção de adubos

orgânicos, como o composto orgânico e o biofertilizante. Segundo Valente *et al.* (2016), a compostagem é uma ferramenta importante na gestão de resíduos da cadeia produtiva pesqueira. Ela é uma das formas mais empregadas no tratamento de resíduos (SANES *et al.*, 2015), que resulta em um produto que fornece os nutrientes necessários ao crescimento das culturas (LEAL *et al.*, 2007). Com a compostagem de resíduos de pescado, pode ser disponibilizado um adubo de qualidade, com baixo custo de aquisição e que atenda às exigências dos sistemas orgânicos de produção.

Além da compostagem, a produção de biofertilizante é uma alternativa para a disposição menos impactante de resíduos de pescado e produção de adubo orgânico.

2.2. Biofertilizante

Na década de 80, a utilização de biodigestores para a produção de energia alternativa resultou na descoberta do biofertilizante, um composto líquido que vem mostrando bons resultados na adubação orgânica. De acordo com o Decreto 4.954 (BRASIL, 2004, art. 2), o biofertilizante é o “produto que contém princípio ativo ou agente orgânico, isento de substâncias agrotóxicas, capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre o todo ou parte das plantas cultivadas, elevando a sua produtividade, sem ter em conta o seu valor hormonal ou estimulante”. Sua aplicação é uma prática útil e de baixo custo (OLIVEIRA *et al.*, 2007), cujo uso vem crescendo em todo Brasil (MEDEIROS *et al.*, 2007).

Segundo Miranda *et al.* (2012), o biofertilizante é um material estabilizado produzido em biodigestores, que representa um estímulo para a agricultura por possuir vários nutrientes importantes para adubação das culturas. O biofertilizante é um resíduo que se apresenta na forma líquida e que possui composição complexa de nutrientes (COSTA, 2014), contendo nutrientes essenciais às plantas. Pode ser produzido pelo próprio agricultor, o que propicia a economia de insumos importados e contribui para melhoria do saneamento ambiental (MEDEIROS *et al.*, 2007).

É um produto rico em várias substâncias e microrganismos devido aos materiais utilizados na sua produção. Possui em sua constituição compostos bioativos que resultam do processo de biodigestão de compostos orgânicos, contém também células vivas ou latentes de microrganismos (bactérias, leveduras, algas e fungos filamentosos), além de seus metabólitos e quelatos organominerais (ALVES *et al.*, 2001). Segundo os mesmos autores, os

biofertilizantes são ricos em enzimas, antibióticos, vitaminas, toxinas, fenóis, ésteres e ácidos, tende possuir também ação fitohormonal.

Não existe formulação padrão na produção de biofertilizante, pois é produzido por meio de receitas variadas, que são testadas e utilizadas para diversos fins (MARROCOS *et al.*, 2012). Na sua produção podem ser utilizados resíduos de origem animal, resíduos em geral provenientes de colheita, rochas moídas, melão e leite, com adição ou não de minerais. De acordo com Sékula (2011), pode-se utilizar apenas restos vegetais no processo de biodigestão, mas normalmente são empregados esterco, principalmente o bovino, por fermentar mais rapidamente e conter bactérias decompositoras muito eficientes. Nesse sentido, a reciclagem de resíduos orgânicos para a produção de fertilizantes alternativos, como os biofertilizantes, é uma medida estratégica, já que é ambientalmente correta e economicamente viável (SILVA *et al.*, 2011).

Existem vários tipos de biofertilizante, que são denominados comuns e enriquecidos (CAVALCANTE *et al.*, 2007). Os biofertilizantes comuns, que também são conhecidos como puros, não são enriquecidos quando da sua produção, sendo um tipo de biofertilizante mais simples. Já os enriquecidos, a exemplo do biofertilizante Supermagro e do Agrobio, têm a adição de macro e micronutrientes, além de uma mistura proteica. Uma das fórmulas mais simples para a produção de biofertilizantes utiliza água e esterco bovino fresco, colocados em volumes iguais, que é conhecido como Vairo, um biofertilizante do tipo comum (SILVA *et al.*, 2007). Diferentes biofertilizantes são testados a fim de se encontrar uma formulação que disponibilize o máximo de nutrientes às plantas (SANTOS *et al.*, 2014).

A composição química dos biofertilizantes é influenciada por diferentes fatores. Segundo Marrocos *et al.* (2012), a composição química dos biofertilizantes é influenciada pelo método de preparo, tempo de decomposição, população microbológica, temperatura e o pH do composto, além do material de origem. O tipo de material orgânico empregado, ou seja, a biomassa utilizada na produção do biofertilizante, também tem influência (BARICHELLO, 2015), sendo preferível utilizar fontes variadas de biomassa, pois a diversidade de materiais contribui para a maior disponibilização de nutrientes e compostos benéficos às plantas.

O biofertilizante é produzido a partir da digestão anaeróbia (sistema fechado) ou aeróbia (sistema aberto) de materiais orgânicos e minerais, para disponibilização de nutrientes e microrganismos (MARROCOS *et al.*, 2012). O processo de biodigestão anaeróbia possui vantagens em relação aos processos aeróbios, que são a redução de microrganismos

patogênicos e odores, utilização de pequeno espaço físico para o tratamento dos resíduos e o controle da liberação de gases e efluentes resultantes do processo (ORRICO JÚNIOR; ORRICO; LUCAS JÚNIOR, 2010). Esse tipo de digestão vem sendo empregado para o tratamento de resíduos, com o objetivo de reduzir o teor orgânico do material, somado a produção simultânea de energia (BARICHELLO, 2015).

Um ponto importante no processo de biodigestão anaeróbia, quando comparado a processos aeróbios, é a maior retenção de nitrogênio, uma vez que ele é menos utilizado pelas bactérias anaeróbias, devido esses microrganismos utilizarem pequena quantidade desse elemento na síntese de proteínas (INOUE, 2008). Como consequência, o biofertilizante possui maior teor de nitrogênio, podendo disponibilizá-lo em maior quantidade às culturas. Segundo Oliveira Júnior (2013), no processo de biodigestão, a matéria orgânica (biomassa), perde exclusivamente carbono, que é transformado em gás metano (CH_4) e gás carbônico (CO_2), com aumento da concentração de nitrogênio e outros nutrientes.

Segundo Chernicharo (2007), durante o processo de biodigestão anaeróbia, diferentes populações de microrganismos desempenham funções especializadas na degradação dos compostos orgânicos, o que ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, um grupo de bactérias facultativas e anaeróbias converte compostos orgânicos complexos (carboidratos, proteínas e lipídeos), por meio de hidrólise e fermentação, em materiais orgânicos mais simples, principalmente, ácidos graxos voláteis, bem como em dióxido de carbono e hidrogênio. Já na segunda etapa, ácidos orgânicos e hidrogênio são convertidos em metano e dióxido de carbono, por microrganismos metanogênicos. Ainda segundo o autor, essas duas etapas do processo de biodigestão anaeróbia podem ser subdivididas nas seguintes fases.

Hidrólise - Essa fase inicia-se caso os microrganismos não sejam capazes de assimilar materiais orgânicos particulados. Nela, materiais particulados complexos, os polímeros, passam por processo de hidrólise, convertendo-se em materiais dissolvidos mais simples, moléculas menores, que podem atravessar a membrana plasmática das células das bactérias fermentativas. Os materiais particulados são convertidos em materiais dissolvidos pela ação de exoenzimas excretadas pelas bactérias fermentativas hidrolíticas.

Acidogênese - Um grande e diverso grupo de bactérias fermentativas é responsável por realizar essa fase, principalmente espécies pertencentes ao grupo clostridia e bactérias da família *Bacteroidaceae*. Os produtos solúveis produzidos na fase de hidrólise são metabolizados dentro das células de bactérias fermentativas. Essas bactérias convertem essas substâncias, transformando-as em compostos mais simples, que em seguida são excretados

pelas células. Dentre eles estão ácidos graxos voláteis, álcoois, ácido láctico, dióxido de carbono, hidrogênio, amônia e sulfeto de hidrogênio, além de novas bactérias.

Acetogênese - Os produtos gerados durante a fase acidogênica são oxidados pelas bactérias acetogênicas, resultando na produção de ácido acético, hidrogênio e dióxido de carbono. Essas bactérias são um grupo metabólico intermediário de microrganismos que produz substrato para a ação dos microrganismos metanogênicos. Estes últimos só podem usar diretamente o acetato e o hidrogênio, produzidos pelas bactérias acidogênicas.

Metanogênese - Esta é a fase final do processo global de degradação anaeróbia de compostos orgânicos, realizada por microrganismos metanogênicos, produzindo metano e dióxido de carbono. Esses microrganismos atuam sobre um número limitado de substratos, que são o ácido acético, hidrogênio/dióxido de carbono, ácido fórmico, metanol, melitaminas e monóxido de carbono. Em razão da afinidade por substrato e da magnitude da produção de metano, os microrganismos responsáveis por essa fase são divididos em dois principais grupos. Um grupo que forma metano a partir de ácido acético ou metanol, as bactérias acetoclásticas, e outro que produz metano a partir de hidrogênio e dióxido de carbono, que são as bactérias hidrogenotróficas.

Redução de sulfato - Esta última fase pode ocorrer quando são utilizadas águas residuais que contenham sulfato e sulfito. Nela, bactérias redutoras de sulfato (BRS) atuam produzindo sulfeto de hidrogênio. O grupo de bactérias responsável pela BRS é considerado um grupo versátil de microrganismos, capaz de usar uma ampla gama de substratos, incluindo toda a cadeia de ácidos graxos voláteis, vários ácidos aromáticos, hidrogênio, metanol, glicerol, açúcares, aminoácidos e vários compostos fenólicos. O metabolismo dessas bactérias é importante para o processo anaeróbio devido à produção de sulfeto de hidrogênio.

Se a biodigestão anaeróbia ocorrer de forma balanceada, os produtos metabólicos da fase anterior são utilizados na fase seguinte, não havendo o acúmulo significativo de produtos intermediários (LAUFER, 2008). Sendo assim, satisfeitas as condições para a realização do processo, ao final de poucos dias o agricultor terá a disposição um fertilizante orgânico de boa qualidade para uso na agricultura. Segundo Gondim (2010), o tempo necessário para finalizar o processo de biodigestão é de 30 dias no verão e de 45 dias no inverno. Esse é um ponto positivo da produção de biofertilizante, pois permite a obtenção de um insumo importante em um período curto de tempo.

2.3. Uso de biofertilizante na agricultura

O biofertilizante é um produto orgânico que pode ser empregado de forma versátil na agricultura. Pode ser adotado de várias formas, com destaque para a aplicação por meio da pulverização das folhas, devido possuir ação mais rápida (PICHLER, 2011). É usado em várias culturas e sistemas de produção, principalmente nos sistemas orgânicos, em hortas e pomares, com emprego na adubação foliar, hidroponia, tratamento de sementes e aplicação direta sobre o solo (MOREIRA, 2012), além de ser utilizado no controle de pragas e doenças.

A importância do biofertilizante no crescimento de plantas não está relacionada com o quantitativo de nutrientes que contém, uma vez que esse quantitativo é em geral baixo, mas no aspecto qualitativo, devido à diversidade química de seus componentes (DINIZ *et al.*, 2011). O biofertilizante possui macro e micronutrientes que podem ser assimilados pelas plantas, tais como nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, sódio, ferro, cloro, sílica, molibdênio, boro, cobre, zinco e manganês (BERTOLLO, 2015). Em comparação a outros adubos orgânicos, o biofertilizante possui nutrientes mais facilmente disponíveis (ALVES *et al.*, 2009).

O biofertilizante normalmente é diluído em água quando da sua aplicação, sendo utilizadas doses de 1 a 10%, aplicadas via solo, via sistemas de irrigação ou pulverizadas sobre as plantas (MORAES, 2009). É importante que no momento da aplicação existam condições ambientais que favoreçam a atuação do biofertilizante. Em razão disso, aconselha-se que aplicação ocorra após a irrigação ou em dias chuvosos e que sejam evitados dias e períodos secos ou quentes (NASCIMENTO, 2016). Uma vez aplicado, pode ser observado grande desenvolvimento vegetativo e, conseqüentemente, aumento significativo da área foliar (OLIVEIRA, 2012), das células vegetais em quantidade e volume, bem como do espessamento das paredes das células na camada da epiderme vegetal (ARAÚJO, 2004).

Conforme Marrocos (2011), os biofertilizantes causam efeitos favoráveis à composição mineral do solo, além de elevar o pH, diminuindo sua acidez. Segundo Pichler (2011), esse produto pode promover o aumento dos teores de potássio, cálcio e magnésio e propiciar a melhoria das características químicas, físicas e biológicas do solo. Quando aplicado ao solo, o biofertilizante pode melhorar atributos físicos como velocidade de infiltração, aeração, armazenagem de água, além de acelerar a atividade microbiana (ARAÚJO, 2012).

O biofertilizante atua de várias formas no solo, contribuindo para as reações que ocorrem em seu interior e no fornecimento de microrganismos benéficos. Segundo Sékula (2011), o biofertilizante é normalmente um composto orgânico que pode fornecer nutrientes, mas que possui também organismos vivos, com a possibilidade de servir de inoculante destes. Em sua composição microbiológica constata-se um número elevado de bactérias, como *Bacillus* e *Pseudomonas*, que são as mesmas utilizadas em estudos para o controle biológico de diversas doenças de plantas (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

A utilização de biofertilizantes na agricultura orgânica é uma forma de manejo trofobiótico de pragas e doenças em plantas (ALVES *et al.*, 2009), pois podem induzir a resistência de plantas por possuírem propriedades fungicidas, antibactericidas, repelentes, inseticidas e acaricidas, em relação a diversos organismos alvo (NASCIMENTO, 2011), e ainda ação fagodeterrente (inibidores de alimentação) ou afetando seu desenvolvimento e reprodução (SANTOS, 2008). Quando pulverizados sobre insetos, os biofertilizantes provocam a aderência desses organismos sobre a superfície dos vegetais, devido possuir propriedade adesiva, impedindo sua locomoção e alimentação, causando morte por inanição (MEDEIROS, 2002).

Além da utilização de biofertilizantes na prática da adubação e no controle de pragas e doenças, outras possibilidades de uso podem ser vislumbradas, como o tratamento de sementes. Os biofertilizantes podem ser empregados no tratamento de sementes selecionadas no campo, devendo ser mergulhadas em biofertilizante concentrado, por dez minutos, passando por posterior secagem à sombra por um período de duas horas, sendo em seguida plantadas no campo (PICHLER, 2011).

2.4. Bactérias diazotróficas

A baixa disponibilidade de nitrogênio nos solos é um fator limitante à produtividade agrícola, apesar desse elemento ser abundante na atmosfera, representando em torno de 78% de sua constituição (VIDEIRA, 2012). Nesse contexto, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) é uma alternativa para a disponibilização desse nutriente às culturas. A fixação biológica de nitrogênio é um processo de transformação do N_2 para a forma inorgânica combinada NH_3 , que posteriormente é transformada em formas orgânicas e inorgânicas (NOVAKOWISKI *et al.*, 2011). Esse processo é realizado por microrganismos diazotróficos que compreendem uma ampla variedade de procariotos, que incluem arqueobactérias,

cianobactérias, bactérias Gram positivas e Gram negativas, com grande diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética (SANTOS, 2013).

As bactérias diazotróficas são um grupo de bactérias fixadoras de nitrogênio capazes de reduzir a molécula de N_2 para amônia (NH_3), sendo consideradas bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) (SILVA, 2013). De acordo com Sangoi *et al.* (2015), esses microrganismos quebram a ligação tríplice do nitrogênio, reduzem o nitrogênio molecular ($N\equiv N$) à amônia, devido à ação da enzima nitrogenase, com alto consumo de energia na forma de ATP. Ainda segundo o mesmo autor, após a reação de redução, ocorre a conversão da amônia em amônio (NH_4^+), que pode ser assimilado pela célula vegetal em forma de glutamina. Conforme Silva (2014), a enzima nitrogenase é muito versátil, pois catalisa também a redução de muitas outras substâncias, como o acetileno.

Os microrganismos responsáveis pela FBN também possuem outras características importantes para o desenvolvimento vegetal. De acordo com Silva (2014), as bactérias responsáveis por esse processo podem sintetizar fitohormônios, principalmente as auxinas, afetando a morfologia das raízes, aumentando o seu comprimento, número de pêlos radiculares e melhorando a absorção de nutrientes. Segundo Moreira *et al.* (2010), além da capacidade de fixar nitrogênio, essas bactérias têm a capacidade de solubilizar fosfatos inorgânicos, sintetizar compostos que promovam o crescimento radicular ou que apresentam efeito antagônico contra fitopatógenos.

As bactérias diazotróficas podem ser divididas em três grupos. Podem ser de vida livre, ou estar associadas a espécies vegetais, ou ainda estabelecer simbiose com leguminosas (MOREIRA *et al.*, 2010). As diazotróficas de vida livre não se associam a plantas ou outros organismos, podendo viver em ambientes como o solo, águas dulcícolas e marinhas; as diazotróficas associativas não formam nódulos, como os que ocorrem nas leguminosas, podendo estar em diferentes tecidos do hospedeiro, como xilema, protoxilema, parênquima lacunar e córtex radicular, e em diferentes órgãos, como colmo, raízes e folhas; as bactérias simbióticas produzem estruturas especializadas para a fixação biológica de nitrogênio em leguminosas, chamadas nódulos (FERNANDES JÚNIOR; REIS, 2008).

Um importante grupo de bactérias diazotróficas encontrado em associação com gramíneas é o gênero *Azospirillum* (MORAIS *et al.*, 2015) e um dos mais estudados atualmente (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016). Essas bactérias são Gram negativas, possuem movimentos em espiral, medem de 0,8 a 1 μm de diâmetro, 2 a 4 μm de comprimento, com grânulos intracelulares de poli-hidroxibutirato (BERGAMASCHI, 2006). Segundo esse autor,

certas espécies do gênero *Azospirillum* possuem mecanismos específicos de interação com as raízes das plantas hospedeiras e podem colonizar o interior das raízes e outras a camada de mucilagem ou células do córtex de raízes danificadas. Esse gênero compreende bactérias diazotróficas associativas endofíticas, mas que podem sobreviver no solo na forma de cistos (MOREIRA *et al.*, 2010).

A utilização de bactérias do gênero *Azospirillum* como inoculante, principalmente *A. brasiliense*, tem sido realizada em diversas culturas, como cereais, algodão, tomate, banana, cana-de-açúcar, café e forrageiras (CORSINI, 2014). Essas bactérias têm a capacidade de promover o maior crescimento e desenvolvimento do sistema radicular, melhorando a absorção de água e nutrientes, o que ocasiona incrementos nos aspectos agrônômicos da planta (FONSECA, 2014). Em milho, a inoculação com *Azospirillum* resultou em plantas com maior produção de raízes, maior altura e coloração mais verde devido ao maior teor de clorofila (HUNGRIA, 2011).

2.5. Nitrogênio na agricultura

O nitrogênio é um nutriente de grande importância para a nutrição de plantas e cuja deficiência é limitante para a atividade agrícola devido participar de vários processos fisiológicos importantes. O nitrogênio está envolvido na síntese de proteínas estruturais e enzimáticas, clorofilas, ácidos nucleicos, coenzimas, fitormônios, vitaminas e alcaloides, que são importantes para o metabolismo vegetal (CARVALHO, 2015), assim como na fotossíntese, respiração, crescimento, produção de folhas, flores e frutos (OLIVEIRA, 2016). É um nutriente fundamental por fazer parte da constituição de componentes essenciais da célula vegetal e por ser determinante para o incremento da produtividade das culturas (DARTORA *et al.*, 2013).

No solo, o nitrogênio está disponível na forma de NH_4^+ , NO_3^- , aminoácidos e peptídeos solúveis (CARVALHO, 2015). Nele, a principal reserva de nitrogênio é a matéria orgânica, que contém 90% do nitrogênio total, em uma forma não diretamente disponível para as plantas, precisando ser mineralizado para ser aproveitado (DURLI, 2016). Os solos brasileiros apresentam baixo teor de N disponível, o que faz da aplicação de fertilizantes nitrogenados uma prática fundamental para a agricultura (DARTORA *et al.*, 2013). Portanto, fertilizantes nitrogenados devem ser aplicados em quantidades adequadas para o bom desenvolvimento das culturas, o que eleva o custo de produção.

Parte do nitrogênio que é aplicado no solo é perdida em razão de vários fatores. Segundo Mota *et al.* (2015), somente parte do nitrogênio mineral que é aplicado no solo é absorvido pelas plantas. A eficiência de utilização de nitrogênio na produção de alimentos é muito baixa (SILVA *et al.*, 2011), com aproveitamento entre 40% e 50%, devido a perdas por lixiviação, volatilização, desnitrificação e erosão (FRANCISCO, 2008). Em razão disso, estratégias que minimizem perdas são utilizadas com o objetivo de aumentar a eficiência de aproveitamento de nitrogênio. Algumas são: o controle da época de aplicação; o uso de revestimentos que controlam a liberação de nitrogênio nos fertilizantes e as melhorias dos métodos de aplicação e incorporação no solo (FRANCISCO, 2008).

Por ser um nutriente de grande importância, alternativas de disponibilização de nitrogênio são necessárias e devem ser buscadas a fim de garantir o desenvolvimento adequado dos cultivos. Segundo Dartora *et al.* (2013), o custo econômico e ambiental do processo industrial de fixação de nitrogênio e o aumento da demanda por alimentos criam a necessidade de incorporar alternativas que racionalizem a utilização de fertilizantes nitrogenados. Uma das alternativas é o emprego da adubação orgânica. Nesse sentido, técnicas que propiciam a produção de adubos orgânicos, como os biofertilizantes, são uma possibilidade de disponibilização de nitrogênio. Outra possibilidade é a utilização de bactérias diazotróficas como o *Azospirillum brasilense*.

REFERÊNCIAS

ALVES, S. B.; MEDEIROS, M. B. de; TAMAI, M. A.; LOPES, R. B. Trofobiose e microrganismos na proteção de plantas: biofertilizantes e entomopatógenos na citricultura orgânica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 21, p. 16-21, 2001.

ALVES, G. S.; SANTOS, D.; SILVA, J. A.; NASCIMENTO, J. A. M.; CAVALCANTE, L. F.; DANTAS, T. A. G. Estado nutricional do pimentão cultivado em solo tratado com diferentes tipos de biofertilizantes. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 4, p. 661-665, 2009.

ARAÚJO, J. B. S. **Composto orgânico e biofertilizante na nutrição do cafeeiro em formação no sistema orgânico**. 2004. 79 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, 2004.

ARAÚJO, J. dos S. S. **Eficiência de biofertilizantes no crescimento, produção e qualidade da produção da bananeira nanica em Neossolo Flúvico**. 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, 2012.

BARICHELLO, R. **Concepção de condomínios de agroenergia: análise e proposta de metodologia para aplicação em áreas de concentração da suinocultura**. 2015. 231 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

BERGAMASCHI, C. **Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a raízes e colmos de cultivares de sorgo**. 2006. 83 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

BERTOLLO, G. M. **Atributos biológicos e físicos do solo com o uso de biofertilizante**. 2015. 84 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Agricultura e Ambiente) - Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande do Sul, 2015.

BRASIL, Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004. Aprova o Regulamento da Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes ou biofertilizantes destinados à agricultura, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2004. Seção 1, p. 2.

CARVALHO, P. A. de. **Metabolismo do nitrogênio e carbono em plantas de seringueira submetidas à hipoxia e diferentes fontes de nitrogênio**. 2015. 168 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, 2015.

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

CAVALCANTE, L. F.; SANTOS, G. D. dos; OLIVEIRA, F. A. de; CAVALCANTE, Í. H. L.; GONDIM, S. C.; CAVALCANTE, M. Z. B. Crescimento e produção do maracujazeiro-amarelo em solo de baixa fertilidade tratado com biofertilizantes líquidos. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.2, n.1, p.15-19, 2007.

CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores Anaeróbios - princípios de tratamento biológico de águas residuárias**. vol 5. Belo Horizonte: DESA - UFMG, 1997. 246 p.

CORSINI, D. C. D. C. **Inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* e *Rhizobium tropici* e adubação nitrogenada em cobertura em feijoeiro de inverno irrigado em sistema plantio direto**. 2014. 77 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2014.

COSTA, A. M. T. de. **Codigestão Anaeróbia de Resíduos Bovinos e Suínos: Caracterização Química e Produção de Biofertilizante para uso em Cultura de Milho**. 2014. 157 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2014.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.17, n.10, p.1023-1029, 2013.

DINIZ, A. A.; CAVALCANTE, L. F.; REBEQUI, A. M.; NUNES, J. C.; BREHM, M. A. da S. Esterco líquido bovino e uréia no crescimento e produção de biomassa do maracujazeiro amarelo. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 3, p. 597-604, 2011.

DURLI, M. M. **Uso do regulador de crescimento etil trinexapac como alternativa para aumentar a resposta do milho à adubação nitrogenada em cobertura**. 2016. 111 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, 2016.

FELTES, M. M. C.; CORREIA, J. F. G.; BEIRÃO, L. H.; BLOCK, J. M.; NINOW, J. L.; SPILLER, V. R. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.6, p.669-677, 2010.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; REIS, V. M. **Algumas limitações à fixação biológica de nitrogênio em leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 252).

FONSECA, L. M. F da. **Inoculação com estirpes de *Azospirillum* e adubação nitrogenada no acúmulo de nutrientes e produtividade de milho**. 2014. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de São João Del Rei, 2014.

FRANCISCO, A. D. M. **Eficiência de fontes de nitrogênio e enxofre na composição químico-bromatológica e algumas características agronômicas da cultura de milho (*Zea mays* L.) em sistema de plantio direto**. 2008. 129 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade de São Paulo, 2008.

GONDIM, S. C. **Insumos orgânicos e qualidade da água no maracujazeiro amarelo e na fauna edáfica**. 2010. 178 f. Tese (Doutorado em Recursos Naturais) - Universidade Federal de Campina Grande, 2010.

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

INOUE, K. R. A. **Produção de biogás, caracterização e aproveitamento agrícola do biofertilizante obtido na digestão da manipueira**. 2008. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, 2008.

LAUFER, A. **Avaliação de processo alternativo de biodigestão para tratamento de resíduos sólidos orgânicos domésticos**. 2008. 128 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2008.

LEAL, M. A. de A.; GUERRA, J. G. M.; PEIXOTO, R. T. G.; ALMEIDA, D. L. de. Utilização de compostos orgânicos como substratos na produção de mudas de hortaliças. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 392-395, 2007.

LIMA, R. M. de; ENKE, D. B. S.; BRAUN, N.; FRACALOSSO, D. M. Redução do fósforo pela peneiragem da farinha de resíduos de peixes. **Ciência Rural**, v.44, n.10, p.1841-1844, 2014.

MARROCOS, S. de T. P. **Composição de Biofertilizante e sua utilização via fertirrigação em meloeiro**. 2011. 62 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, 2011.

MARROCOS, S. de T. P.; NOVO JUNIOR, J.; GRANGEIRO, L. C.; AMBROSIO, M. M. de Q.; CUNHA, A. P. A. da. Composição química e microbiológica de biofertilizantes em diferentes tempos de decomposição. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 4, p. 34-43, 2012.

MEDEIROS, M. B. de. **Ação de biofertilizantes líquidos sobre a bioecologia do ácaro *Brevipalpus phoenicis***. 2002. 110 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.

MEDEIROS, D. C. de; LIMA, B. A. B. de; BARBOSA, M. R.; ANJOS, R. S. B. dos; BORGES, R. D.; CAVALCANTE NETO, J. G.; MARQUES, L. F. Produção de mudas de alface com biofertilizantes e substratos. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 433-436, 2007.

MIRANDA, A. P.; LUCAS JÚNIOR, J. de; THOMAZ, M. C.; PEREIRA, G. T.; FUKAYAMA, E. H. Anaerobic biodigestion of pigs feces in the initial, growing and finishing stages fed with diets formulated with corn or sorghum. **Engenharia Agrícola**, v. 32, n. 1, p. 47-59, 2012.

MORAES, R. M. D. **Produção orgânica de cebola**. 2009. 57 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Pelotas, 2009.

MORAIS, T. P. de; BRITO, C. H. de; FERREIRA, A. de S.; LUZ, J. M. Q. Aspectos morfofisiológicos de plantas de milho e bioquímico do solo em resposta à adubação nitrogenada e à inoculação com *Azospirillum brasilense*. **Revista Ceres**, v. 62, n.6, p. 589-596, 2015.

MOREIRA, C. A. **Biofertilizante: nutrição e desenvolvimento de tomate orgânico**. 2012. 110 f. Teses (Doutorado em Agronomia - Horticultura) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2012.

MOREIRA, F. M. de S.; SILVA, K. da.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. de. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.

MOTA, M. R.; SANGOI, L.; SCHENATTO, D. E.; GIORDANI, W.; BONIATTI, C. M.; DALL'IGNA, L. Fontes estabilizadas de nitrogênio como alternativa para aumentar o rendimento de grãos e a eficiência de uso do nitrogênio pelo milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p. 512-522, 2015.

NASCIMENTO, F. K. S. do. **Eficiência do uso de nitrogênio em milho sob aplicação de biofertilizante com noni e rizobactérias.** 2016. 54 f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) - Universidade Estadual do Maranhão, 2016.

NASCIMENTO, G. A. Z. **Gestão de resíduos em propriedade rural: utilização de resíduos avícolas para a produção de energia e biofertilizante.** 2011. 113 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Instituto Mauá de Tecnologia, 2011.

NOVAKOWISKI, J. H.; SANDINI, I. E.; FALBO, M. K.; MORAES, A. de; NOVAKOWISKI, J. H.; CHENG, N. C. Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, suplemento 1, p. 1687-1698, 2011.

OLIVEIRA, A. P. de; BARBOSA, A. H. D.; CAVALCANTE, L. F.; PEREIRA, W. E.; OLIVEIRA, A. N. P. de. Produção da batata-doce adubada com esterco bovino e biofertilizante. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.6, p.1722-1728, 2007.

OLIVEIRA, A. P. S. **Desempenho do feijoeiro-comum inoculado com rizóbio em resposta a diferentes plantas de cobertura e épocas de dessecação.** 2016. 66 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Solo e Água) - Universidade Federal de Goiás, 2016.

OLIVEIRA, J. R. de. **Uso de biofertilizantes na produção de pimenta Dedo de Moça.** 2012. 62 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Piauí, 2012.

OLIVEIRA, J. R. de; GOMES, R. L. F.; ARAÚJO, A. S. F.; MARINI, F. S.; LOPES, J. B.; ARAÚJO, R. M. Estado nutricional e produção da pimenteira com uso de biofertilizantes líquidos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 12, p. 1241-1246, 2014.

OLIVEIRA, M. M. de; PIMENTA, M. E. de S. G.; CAMARGO, A. C. da S.; FIORINI, J. E.; PIMENTA, C. J. Silagem de resíduos da filetagem de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*), com ácido fórmico - análise bromatológica, físico-química e microbiológica. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.6, p.1218-1223, 2006.

OLIVEIRA JÚNIOR, F. A. de. **Ensino não formal da diminuição da carga poluidora de dejetos animais a partir da produção de biogás e biofertilizante em pequenas propriedades rurais.** 2013. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ensino de Ciências e Matemática) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, 2013.

ORRICO JÚNIOR, M. A. P.; ORRICO, A. C. A.; LUCAS JÚNIOR, J. de. Biodigestão anaeróbica dos resíduos da produção avícola: cama de frangos e carcaças. **Engenharia Agrícola**, v. 30, n. 3, p. 546-554, 2010.

PETENUCCI, M. E.; STEVANATO, F. B.; MORAIS, D. R. de; SANTOS, L. P.; SOUZA, N. E. de; VISENTAINER, J. V. Composição e estabilidade lipídica da farinha de espinhaço de tilápia. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n.5. p 1279-1284, 2010.

PICHLER, M. E. B. **Avaliação do biofertilizante supermagro na produção de mudas de *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2011. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Estadual do Centro-oeste, 2011.

PRIMO, D. C.; FADIGAS, F. se S.; CARVALHO, J. C. R.; SCHMIDT, C. D. S.; BORGES FILHO, A. C. S. Avaliação da qualidade nutricional de composto orgânico produzido com resíduos de fumo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.7, p.742-746, 2010.

RODRIGUES, J. R. **Otimização da extração de lipídeos, via mistura ternária hexano-etanol-água, de matriz composta de resíduos do processamento de tilápias**. 2016. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2016.

SANES, F. S. M.; STRASSBURGER, A. S.; ARAÚJO, F. B.; MEDEIROS, C. A. B. Compostagem e fermentação de resíduos de pescado para produção de fertilizantes orgânicos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 1241-1252, 2015.

SANGOI, L.; SILVA, L. M. M. da; MOTA, M. R.; PANISON, F.; SCHMITT, A.; SOUZA, N. M. de; GIORDANI, W.; SCHENATTO, D. E. Desempenho agrônômico do milho em razão do tratamento de sementes com *Azospirillum sp.* e da aplicação de doses de nitrogênio mineral. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p. 1141-1150, 2015.

SANTOS, A. P. G.; VIANA, T. V. A.; SOUSA, G. G.; Ó, L. M. G.; AZEVEDO, B. M.; SANTOS, A. M. 2014. Produtividade e qualidade de frutos do meloeiro em função de tipos e doses de biofertilizantes. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 409-416, 2014.

SANTOS, C. S. A. dos. **Capim-marandu submetido à inoculação com bactérias diazotróficas associativas em Latossolo Vermelho de cerrado**. 2013. 69 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Mato Grosso, 2013.

SANTOS, J. F. **Fertilização orgânica de batata-doce com esterco bovino e biofertilizante**. 2008. 113 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba, 2008.

SÉKULA, C. R. **Características químicas do solo e produção de grandes culturas com rochagem e biofertilizantes**. 2011. 61 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Centro-oeste, 2011.

SILVA, A. de A. **Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada na aclimação de mudas micropropagadas de abacaxizeiro**. 2013. 88 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2013.

SILVA, A. F.; PINTO, J. M.; FRANÇA, C. R. R. S.; FERNANDES, S. C.; GOMES, T. C. A.; SILVA, M. S. L.; MATOS, A. N. B. **Preparo e uso de biofertilizantes líquidos**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2007. (Embrapa Semi-Árido. Comunicado Técnico, 130).

SILVA, D. R. G.; COSTA, K. A. de P.; FAQUIN, V.; OLIVEIRA, I. P. de; SOUZA, M. R. F. de; SOUZA, M. A. S. Eficiência nutricional e aproveitamento do nitrogênio pelo capim-marandu de pastagem em estágio moderado de degradação sob doses e fontes de nitrogênio. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 2, p. 242-249, 2011.

SILVA, F. G da. **Promoção de crescimento vegetal por bactérias halotolerantes e reinoculação em *Atriplex nummularia* L.** 2014. 85 p. Dissertação (Mestrado em Produção Agrícola) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2014.

SILVA, M. de O.; STAMFORD, N. P.; AMORIM, L. B. de; ALMEIDA JÚNIOR, A. B. de; SILVA, M. de O. Diferentes fontes de P no desenvolvimento do meloeiro e disponibilidade de fósforo no solo. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 268-277, 2011.

VALENTE, B. S.; XAVIER, E. G.; PEREIRA, H. da S.; PILOTTO, M. V. T. Compostagem de resíduos da filetagem de pescado marinho e casca de arroz. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 17, n. 2, p. 237-248, 2016.

VALENTE, B. S.; XAVIER, E. G.; PEREIRA, H. da S.; PILOTTO, M. V. T. Compostagem na gestão de resíduos de pescado de água doce. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 40, n. 1, p. 95-103, 2014.

VIDEIRA, S. S. **Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas associada a plantas de capim-elefante**. 2012. 105 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2012.

**GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE MILHO SOB APLICAÇÃO DE
BIOFERTILIZANTES INOCULADOS COM *Azospirillum brasilense***

CAPÍTULO II

1 **Germinação e crescimento inicial de milho sob aplicação de biofertilizantes**
2 **inoculados com *Azospirillum brasilense***

3 Germination and initial growth of maize under application of biofertilizers inoculated
4 with *Azospirillum brasilense*

5 **RESUMO** - Bactérias diazotróficas como o *Azospirillum brasilense* e biofertilizantes
6 produzidos a partir de resíduos orgânicos podem contribuir para a redução da dependência de
7 adubos químicos na produção de milho (*Zea mays* L.). O objetivo deste trabalho foi avaliar o
8 uso de biofertilizantes produzidos com resíduos de pescado inoculados com *A. brasilense* sobre
9 o crescimento inicial de plantas de milho. O delineamento experimental foi inteiramente
10 casualizado seguindo o arranjo fatorial 2 x 5 + 1, com quatro repetições. Os tratamentos
11 consistiram da combinação da ausência ou presença de *A. brasilense* em biofertilizantes
12 produzidos com cinco substituições do componente esterco bovino por resíduos de pescado:
13 BIO 100EB:0RP; BIO 75EB:25RP; BIO 50EB:50RP; BIO 25EB:75RP; e BIO 0EB:100RP.
14 Biofertilizantes à base exclusivamente de resíduos de pescado ou destes em associação com
15 esterco bovino influenciaram negativamente a prevalência da bactéria *A. brasilense* e ao
16 contrário para os biofertilizantes produzidos exclusivamente com esterco bovino. A germinação
17 de sementes do híbrido de milho AG 1051 não foi afetada por solução a 10% de biofertilizantes,
18 inoculados ou não com a bactéria *A. brasilense*. O crescimento de plantas do híbrido de milho
19 AG 1051, avaliado aos 45 dias após a semeadura nas condições do presente trabalho, foi, de
20 um modo geral, positivamente influenciado pela aplicação de solução a 20% de biofertilizantes
21 exclusivamente à base de resíduos de pescado e pela inoculação da bactéria *A. brasilense*.

22 **Palavras-chave:** *Zea mays* L.. Bactérias diazotróficas. Esterco bovino. Resíduos de pescado.

23

24 **ABSTRACT** - Diazotrophic bacteria such as *Azospirillum brasilense* and biofertilizers
25 produced from organic waste may contribute to the reduction of chemical fertilizer dependence

26 on maize (*Zea mays* L.) production. The aim of this work was to evaluate the use of biofertilizers
27 produced with fish waste inoculated with *A. brasilense* on the initial growth of maize plants.
28 The experimental design was completely randomized according to the factorial arrangement 2
29 x 5 + 1, with four replications. The treatments consisted of the combination of the absence or
30 presence of *A. brasilense* in biofertilizers produced with five substitutions of the bovine manure
31 component for fish waste: BIO 100EB:0RP; BIO 75EB:25RP; BIO 50EB:50RP; BIO
32 25EB:75RP; and BIO 0EB:100RP. Biofertilizers based exclusively on fish waste or those in
33 association with bovine manure had a negative influence on the prevalence of the *A. brasilense*
34 bacteria and on the contrary for the biofertilizers produced exclusively with bovine manure.
35 The germination of AG 1051 maize hybrid seeds was not affected by 10% solution of
36 biofertilizers, inoculated or not with *A. brasilense* bacteria. The growth of AG 1051 maize
37 hybrid, evaluated at 45 days after sowing in the conditions of the present study, was, in general,
38 positively influenced by the application of a 20% solution of biofertilizers based exclusively on
39 fish waste and inoculation of *A. brasilense* bacteria.

40 **Key words:** *Zea mays* L. Diazotrophic bacteria. Bovine manure. Fish waste.

41 INTRODUÇÃO

42 O milho (*Zea mays* L.) é o cereal mais produzido no mundo, responsável por grande parte
43 do total de calorias produzidas pela agricultura (MATSUMURA *et al.*, 2015). O custo de
44 produção do milho é alto devido ao seu processo de produção que requer doses elevadas de
45 nitrogênio, que é o principal limitante à produtividade (DARTORA *et al.*, 2016; MÜLLER *et*
46 *al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2015). Portanto, a busca por fontes alternativas de fornecimento de
47 nitrogênio às plantas é imprescindível para a sustentabilidade da agricultura. Nesse sentido, o
48 reaproveitamento de resíduos agroindustriais na produção de adubos é uma possibilidade.

49 As agroindústrias de beneficiamento de pescado geram grande quantidade de resíduos,
50 cujo aproveitamento é reduzido (LIMA *et al.*, 2014). No processo de produção de filé de

51 pescado é comum o descarte de 65% do peso vivo de pescado, com aproveitamento de apenas
52 35% (VALENTE *et al.*, 2014). Esses resíduos são constituídos por cabeça, nadadeiras, vísceras
53 e espinhaço, que são muitas vezes descartados no meio ambiente (PETENUTI *et al.*, 2010),
54 apesar do potencial de reaproveitamento em outras áreas, como na produção de biofertilizantes
55 para a agricultura.

56 Os biofertilizantes disponibilizam vários nutrientes para as culturas (MIRANDA *et al.*,
57 2012). Eles são o resultado da biodigestão anaeróbia ou aeróbia de resíduos orgânicos de origem
58 animal ou vegetal, juntamente com esterco. Os principais biofertilizantes são: o comum,
59 também chamado de puro e aqueles enriquecidos com macro e micronutrientes e uma mistura
60 proteica, como o Supermagro e o Agrobio (CAVALCANTE *et al.*, 2007). Além de nutrientes,
61 os biofertilizantes contêm células vivas ou latentes de microrganismos que podem atuar de
62 forma benéfica no solo e nas plantas. A inoculação de microrganismos também é denominada
63 de biofertilização.

64 A biofertilização com bactérias diazotróficas pode melhorar o desenvolvimento das
65 culturas, pois essas bactérias têm a capacidade de converter o nitrogênio atmosférico em formas
66 assimiláveis pelas plantas. A associação de gramíneas com bactérias do gênero *Azospirillum* é
67 uma técnica capaz de possibilitar a economia de fertilizantes nitrogenados (SABUNDJIAN *et*
68 *al.*, 2013). A inoculação de culturas com *Azospirillum brasilense* tem mostrado aumento da
69 produtividade e crescimento de plantas em diversos ambientes (CASSÁN; DIAZ-ZORITA,
70 2016). Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) podem substituir total ou
71 parcialmente fertilizantes químicos, reduzir custos e os impactos negativos da agricultura sobre
72 o ambiente (FUKAMI *et al.*, 2016).

73 Considerando as hipóteses de que os biofertilizantes produzidos com resíduos de pescado
74 em substituição ao esterco bovino funcionam como veículo de aplicação de *A. brasilense* e que
75 os biofertilizantes inoculados com *A. brasilense* melhoram os índices de germinação das

76 sementes, a absorção de N pelas plantas de milho e a qualidade das plantas, o objetivo deste
77 trabalho foi avaliar o uso de biofertilizantes produzidos com resíduos de pescado inoculados
78 com *A. brasilense* sobre o crescimento inicial de plantas de milho.

79 MATERIAL E MÉTODOS

80 Os experimentos foram conduzidos em condições de laboratório e casa de vegetação, na
81 Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), localizado na Cidade Universitária Paulo VI,
82 em São Luís - MA (2°35'33.0"S; 44°12'43.6"W e altitude de 42 m). Segundo a classificação de
83 Köppen, o clima da região é Aw'.

84 Foram conduzidos 4 experimentos com os objetivos de: 1) verificar a presença de
85 *Azospirillum* em biofertilizantes inoculados com *A. brasilense*, realizada por meio da contagem
86 de unidades formadoras de colônias (UFC); 2) avaliar a porcentagem de plântulas normais e
87 comprimento da parte aérea e de raízes de plântulas de milho, por meio de teste de germinação;
88 3) Contar o número de sítios de mitose (NSM) em raízes de plantas de milho; e 4) Avaliar o
89 crescimento e a absorção de N em plantas de milho, cultivadas em vasos.

90 Os biofertilizantes foram preparados por meio do processo de biodigestão anaeróbia,
91 que teve duração de 45 dias, em galões plásticos de 20 L, com substituição gradual do
92 quantitativo de esterco bovino da formulação utilizada, com 2 kg deste componente, por
93 resíduos de pescado, até a substituição completa do quantitativo daquele por este, da seguinte
94 forma: Biofertilizante exclusivamente com esterco bovino (BIO 100EB:0RP); Biofertilizante
95 com 75% de esterco bovino e 25% de resíduos do pescado (BIO 75EB:25RP); Biofertilizante
96 com 50% de esterco bovino e 50% de resíduos de pescado (BIO 50EB:50RP); Biofertilizante
97 com 25% de esterco bovino e 75% de resíduos de pescado (BIO 25EB:75RP); Biofertilizante
98 exclusivamente com resíduos de pescado (BIO 0EB:100RP). Os outros componentes da
99 formulação permaneceram inalterados e foram os seguintes: 0,2 kg de cana de açúcar triturada;
100 0,1 kg de cinzas de madeira; 0,1 kg de fosfato natural; 0,04 kg de ácido bórico; 0,04 kg de

101 sulfato de zinco e 0,2 L de leite bovino. Todos os componentes foram homogeneizados e o
102 volume completado com 8 L de água.

103 Após a homogeneização, foi adicionado 50 mL de inoculante líquido a base de *A.*
104 *brasiliense* Abv5 da marca Azos®, com concentração de 1×10^8 UFC mL⁻¹, produzido pelo
105 Laboratório Farroupilha, em parte dos recipientes. Em seguida, os galões foram fechados
106 hermeticamente. Por fim, uma mangueira foi adaptada na tampa dos recipientes para possibilitar
107 a saída dos gases produzidos durante o processo de biodigestão.

108 Os biofertilizantes resultantes foram analisados para a determinação da composição
109 química (Tabela 1).

110 **Tabela 1.** Composição química dos biofertilizantes, com (CB) e sem (SB) bactéria.

Biofertilizantes	N	P	K	Ca	Mg
----- g L ⁻¹ -----					
BIO 100EB:0RP SB	2,85	6,17	92,50	0,45	0,31
BIO 75EB:25RP SB	12,56	7,07	95,48	0,40	0,15
BIO 50EB:50RP SB	16,50	8,04	93,09	0,32	0,09
BIO 25EB:75RP SB	26,95	13,03	116,67	0,52	0,04
BIO 0EB:100RP SB	28,51	13,17	120,15	0,57	0,05
BIO 100EB:0RP CB	4,02	6,54	98,99	0,45	0,26
BIO 75EB:25RP CB	7,19	5,97	94,92	0,44	0,18
BIO 50EB:50RP CB	23,26	7,59	95,96	0,32	0,09
BIO 25EB:75RP CB	26,64	11,15	123,63	0,43	0,04
BIO 0EB:100RP CB	28,03	13,30	113,41	0,44	0,05

111
112 Para a contagem de UFC de *Azospirillum*, foi realizado um experimento em delineamento
113 experimental inteiramente casualizado, com tratamentos constituídos pelas cinco substituições
114 de esterco bovino por resíduos de pescado, com quatro repetições.

115 A parcela experimental foi formada por quatro placas de Petri com meio NFb sólido,
116 específico para o isolamento de *A. brasiliense* (DOBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995).
117 O meio foi riscado com amostras dos biofertilizantes inoculados e as placas levadas para
118 *Biological Oxygen Demand* (B.O.D.), à temperatura de 35 °C por 5 dias. Posteriormente, foi
119 feita a contagem de UFC de *A. brasiliense* com base nas características visíveis após o
120 crescimento no meio de cultura.

121 As demais avaliações foram conduzidas por meio de experimentos em delineamento
122 inteiramente casualizado, segundo o arranjo fatorial $(2 \times 5) + 1$, com quatro repetições, com o
123 primeiro fator relacionado à inoculação (CB) ou não da bactéria (SB), e o segundo vinculado
124 às cinco substituições do quantitativo de esterco bovino por resíduos de pescado. Adotou-se um
125 tratamento adicional (controle) e o híbrido de milho AG 1051 como planta teste.

126 Para o teste de germinação, cinquenta sementes de milho foram colocadas em três folhas
127 de papel *germitest* umedecidas com os tratamentos diluídos a 10%, em substituição à água
128 destilada, na razão 2,5:1 (peso biofertilizante : peso do papel). As unidades experimentais,
129 assim formadas, foram acondicionadas em sacos plásticos e postas em germinador tipo B.O.D.,
130 regulado a 25 °C na ausência de luz. Foi adotado um tratamento controle com água destilada.
131 A contagem foi realizada no oitavo dia após a instalação do teste, conforme as Regras para
132 Análises de Sementes (BRASIL, 2009). Um segundo teste foi realizado, diferindo do
133 anteriormente citado, pela utilização de 10 sementes de milho colocadas no terço superior do
134 papel *germitest*, para avaliação do comprimento da parte aérea (CPA) e comprimento de raiz
135 (CR) no oitavo dia, conforme Nakagawa (1999).

136 Quanto à avaliação do número de sítios de mitose (NSM), raízes de plântulas de milho
137 com aproximadamente 1 cm de comprimento foram submersas nos tratamentos diluídos a 10%
138 por 48 horas, em recipientes plásticos, utilizando como tratamento controle CaCl_2 2 mM.
139 Depois, o sistema radicular foi retirado, lavado com água, aquecido a 75 °C por 20 minutos em
140 solução de KOH (0,5%, p/v) e novamente lavado com água, corado com solução de
141 hematoxilina (1 g de hematoxilina, 0,5 g de amônio férrico sulfato e 50 mL de ácido acético 45
142 % p/v), armazenada à temperatura ambiente por 14 h no escuro. A seguir, fez-se lavagem com
143 água e o material foi colocado em solução de ácido láctico 80% (p/v) a 75 °C de 30 a 90 segundos.
144 Na sequência, transferiu-se para placas de Petri contendo água e procedeu-se a observação em

145 microscópio estereoscópico para a avaliação do número de sítios de mitose (NSM), como
146 pontos vermelhos em um fundo branco do tecido da raiz (CANELLAS *et al.*, 2002).

147 Para a avaliação das variáveis de crescimento e da absorção de nitrogênio, foi conduzido
148 experimento em vasos contendo Terra Fina Seca ao Ar coletada em camada superficial (0-20
149 cm) de um ARGISSOLO VERMELHO-AMARELO distrófico (EMBRAPA, 2013), com
150 realização da caracterização química (Tabela 2), conforme metodologias descritas em Rajj *et*
151 *al.* (1997).

152 **Tabela 2.** Caracterização química do solo utilizado no experimento de milho em vasos.

pH	M.O.	P	K	Ca	Mg	S.B.	H+Al	CTC	V
	g dm ⁻³	mg dm ⁻³	----- mmol _c dm ⁻³ -----			-----			%
4,3	26	5	0,7	14	4	18,7	45	63,7	29

153 Métodos de extração: M.O.: H₂SO₄; pH: Solução de CaCl₂; P, K, Ca, Mg: Resina; H+Al: Tampão SMP.

154 O solo foi acondicionado em vasos plásticos com capacidade para 2,00 L e adubado com
155 1,80 g de cinzas de madeira, 0,90 g fosfato natural e 11,25 g de composto orgânico. Quatro
156 sementes de milho foram semeadas em cada vaso, deixando-se duas plantas após o desbaste.
157 Nos estágios V4 e V6 aplicou-se 200 mL de biofertilizante diluído a 20%, com exceção do
158 tratamento controle. Aos 45 dias após a semeadura (DAS), foram avaliadas as seguintes
159 variáveis: altura de planta, diâmetro do caule, área foliar, massa da matéria fresca, massa da
160 matéria seca, teor relativo de clorofila (índice SPAD) e nitrogênio total. O teor relativo de
161 clorofila foi determinado com clorofilômetro modelo Minolta SPAD-502 e o teor de N-total
162 pelo método de Kjeldahl.

163 Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo
164 teste de Tukey (p<0,05), por meio do programa ASSISTAT (versão 7.7 beta).

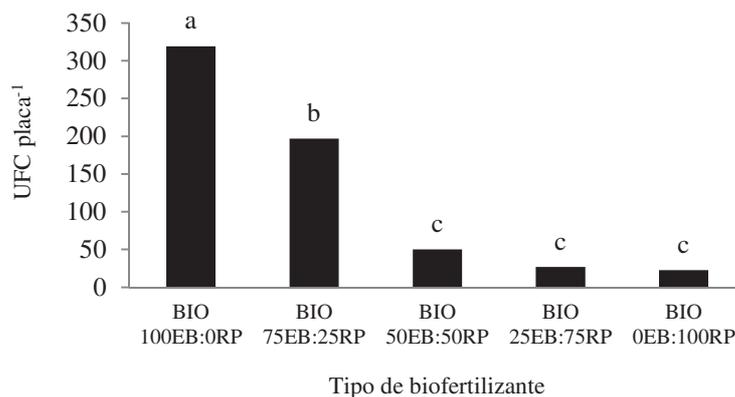
165 RESULTADOS E DISCUSSÃO

166 Contagem de UFC de *Azospirillum*

167 Foi verificado efeito significativo do tipo de biofertilizante para presença de unidades
168 formadoras de colônia de *Azospirillum* (Figura 1). O maior número de unidades foi observado
169 no tratamento BIO 100EB:0RP, seguido do efeito produzido em BIO75EB:25RP. As menores

170 quantidades de unidades formadoras de colônias foram verificadas para os tratamentos
 171 BIO50EB:50RP, BIO25EB:75RP e BIO0EB:100RP, cujas médias para valores de UFC por
 172 placa não diferiram estatisticamente entre si ($p>0,05$).

173 **Figura 1.** Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) nos biofertilizantes inoculados
 174 (médias seguidas da mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de
 175 Tukey).



176

177 A presença mais acentuada de *Azospirillum* nos biofertilizantes BIO 100EB:0RP e
 178 BIO75EB:25RP pode estar relacionada à maior concentração de ácidos húmicos possivelmente
 179 provenientes do esterco bovino. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por
 180 Conceição *et al.* (2008). Esses autores, trabalhando com *Herbaspirillum seropedicae* e ácidos
 181 húmicos, constataram aumento significativo do número dessas bactérias devido à aplicação de
 182 ácidos húmicos quando comparado ao tratamento controle.

183 Testes de germinação e avaliação de sítios de mitose nas radículas

184 Foi verificado efeito significativo ($p<0,05$) dos fatores sobre as variáveis CPA e CR e
 185 apenas do fator tipo de biofertilizante sobre NSM (Tabela 3). O efeito não significativo dos
 186 fatores sobre a porcentagem de germinação, cujo valor médio foi superior a 99%, indica que os
 187 tratamentos diluídos a 10% não interferiram no processo germinativo e nem na formação de
 188 plântulas normais. Considerando apenas os efeitos do fator bactéria, os efeitos proporcionados
 189 pelos tratamentos coincidem com os relatados por Pereira *et al.* (2015), que não observaram
 190 influência significativa da inoculação de *A. brasilense* sobre a porcentagem de plântulas

191 normais de milho, híbridos simples AG7098 e 2B707 e variedades sintéticas experimentais V2
192 e V4.

193 **Tabela 3.** Resumo da análise de variância dos parâmetros relacionados à germinação de
194 plântulas de milho e número de sítios de mitose, mais tratamento controle.

FV	Valores do teste F				
	GL	GERM	CPA	CR	NSM
Bactéria (Bact)	1	0,08 ^{ns}	18,25 ^{**}	12,80 ^{**}	0,32 ^{ns}
Biofertilizante (Bio)	4	1,11 ^{ns}	83,75 ^{**}	15,42 ^{**}	3,44 [*]
Bact x bio	4	0,28 ^{ns}	10,70 ^{**}	1,82 ^{ns}	0,74 ^{ns}
Fatorial x controle	1	12,60 ^{**}	3,69 ^{ns}	0,83 ^{ns}	-
Resíduo	33				
CV (%)	-	1,11	10,04	10,05	67,52

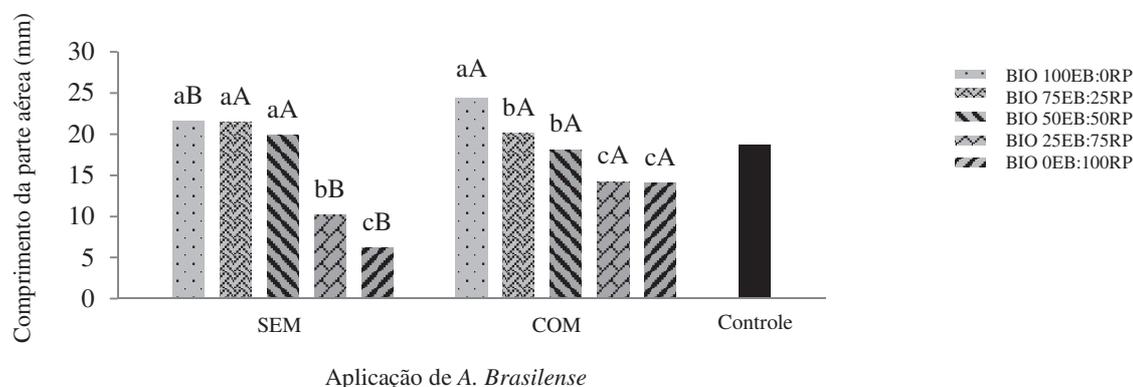
195 GERM - Germinação (%); CPA - Comprimento da parte aérea (cm); CR - Comprimento de raiz (cm); NSM -
196 Número de sítios de mitose; ns - não significativo, * e ** - significativo a 5% e 1% pelo teste F, respectivamente.

197
198 Foi verificada a maior média para o comprimento da parte área associada ao BIO

199 100EB:0RP inoculado com *A. brasilense* (Figura 2).

200 **Figura 2.** Valores médios para o comprimento da parte aérea de plântulas de milho em função
201 da aplicação de diferentes tipos de biofertilizantes, sem e com adição de *A. brasilense* (médias
202 seguidas da mesma letra não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, com
203 letras minúsculas para bactéria e maiúsculas para tipo de biofertilizante).

204



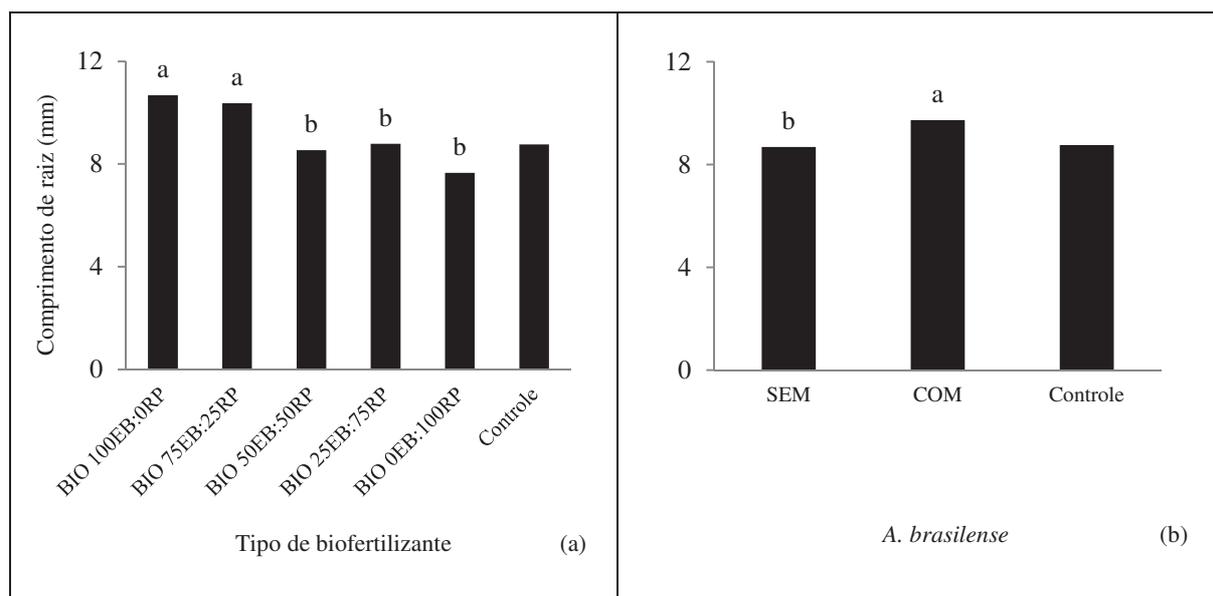
205

206 A associação da bactéria com as demais composições inoculadas proporcionou menores
207 médias, com menor expressão para as composições BIO 25EB:75RP e BIO 0EB:100RP. As
208 médias do comprimento da parte aérea das plântulas submetidas às composições de
209 biofertilizantes com mais de 50% de resíduos de pescado e não inoculadas foram as de menor
210 valor, o que parece indicar um efeito positivo para a inoculação com *A. brasilense* e negativo

211 quando da inclusão de resíduos de pescado em proporção superior a 50% da composição do
 212 produto.

213 As maiores médias para o comprimento de raiz foram as decorrentes dos tratamentos BIO
 214 100EB:0RP e BIO 75EB:25RP, com efeito do BIO 100EB:0RP diferente significativamente do
 215 tratamento controle. As composições com 50% ou mais de resíduos de pescado parecem ter
 216 provocado menor estímulo ao crescimento radicular (Figura 3a). E, a inoculação da bactéria
 217 resultou em maior comprimento de raiz (Figura 3b), diferindo estatisticamente do efeito
 218 proporcionado pela ausência de *A. brasilense*.

219 **Figura 3.** Valores médios para o comprimento de raiz de plântulas de milho em função da
 220 aplicação de diferentes tipos de biofertilizantes (a) e da adição ou não de *A. brasilense* (b)
 221 (médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste de
 222 Tukey).



223 Segundo Conceição *et al.* (2008), tratamentos associados à presença de *Herbaspirillum*
 224 *seropedicae* e ácidos húmicos proporcionaram maior crescimento da parte aérea e raiz de plantas
 225 de milho, híbrido intervarietal UENF 506-8, o que vai ao encontro dos resultados
 226 supramencionados.

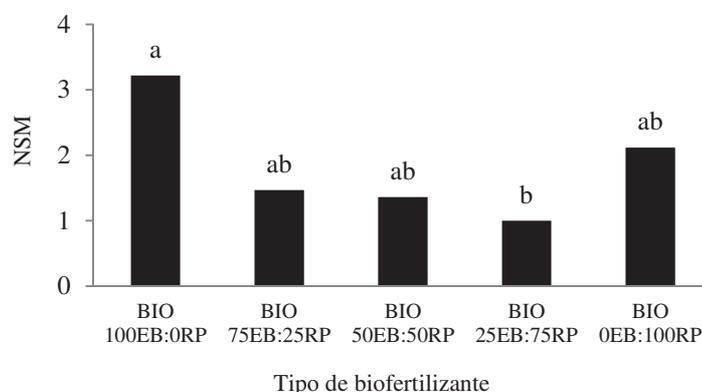
228 Segundo Moreira *et al.* (2010), bactérias diazotróficas como *A. brasilense* favorecem o
 229 crescimento vegetal por meio da fixação biológica de nitrogênio, como também, pela produção

230 de substâncias que induzem o crescimento radicular. Os autores ainda citam que tais bactérias
 231 propiciam o aumento da absorção de nutrientes e água, além de favorecer o desenvolvimento
 232 da planta, por estimular a produção de fitohormônios como as auxinas, giberelinas e citocininas.

233 **Avaliação de sítios de mitose nas raízes**

234 Ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$) entre o efeito decorrente do uso do BIO
 235 100EB:0RP e o proporcionado por BIO 25EB:75RP, que foi 68% menor (Figura 4).

236 **Figura 4.** Valores médios para o número de sítios de mitose (NSM) em raízes de plântulas de
 237 milho em função da aplicação de diferentes tipos de biofertilizantes (médias seguidas da mesma
 238 letra não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey).



239

240 O biofertilizante com 100% de esterco bovino proporcionou incremento no número de
 241 sítios de mitose quando comparado aos outros biofertilizantes. Esse resultado pode estar
 242 associado à maior quantidade de ácidos húmicos contida no tratamento com maior proporção
 243 de esterco bovino. Rima *et al.* (2011), relatam que essas substâncias impulsionam a
 244 multiplicação de raízes laterais de milho, devido estimular a atividade da H⁺-ATPase de
 245 membrana plasmática, o que induz o crescimento de raízes laterais. Como consequência, há
 246 maior absorção de nutrientes pela planta.

247 **Avaliação das variáveis de crescimento de plantas e da absorção de nitrogênio**

248 Não houve efeito significativo dos fatores para altura (ALT) de plantas de milho. Para
 249 teor de clorofila (SPAD), diâmetro de caule (DC), matéria fresca (MF) e matéria seca (MS),
 250 apenas o fator tipo de biofertilizante influenciou nas médias dos valores resultantes. A área

251 foliar (AF) foi influenciada tanto pelo fator bactéria quanto pelo tipo de biofertilizante. Em
 252 relação à variável nitrogênio total (NT), todos os fatores, incluindo a interação, influenciaram
 253 os resultados obtidos (Tabela 4).

254 **Tabela 4.** Resumo da análise de variância dos parâmetros relacionados ao crescimento inicial
 255 de plantas de milho, mais tratamento controle.

FV	Valores do teste F							
	GL	ALT	AF	SPAD	DC	NT	MF	MS
Bactéria (Bact)	1	0,59 ^{ns}	10,68 ^{**}	0,50 ^{ns}	0,00 ^{ns}	11,22 ^{**}	0,00 ^{ns}	0,04 ^{ns}
Biofertilizante (Bio)	4	2,07 ^{ns}	21,51 ^{**}	15,98 ^{**}	6,32 ^{**}	20,96 ^{**}	8,25 ^{**}	7,72 ^{**}
Bact x bio	4	0,95 ^{ns}	1,37 ^{ns}	2,21 ^{ns}	0,33 ^{ns}	5,21 ^{**}	0,77 ^{ns}	0,98 ^{ns}
Fatorial x controle	1	9,04 ^{**}	187,51 ^{**}	18,15 ^{**}	19,28 ^{**}	48,62 ^{**}	67,26 ^{**}	41,64 ^{**}
Resíduo	33							
CV (%)	-	13,36	6,41	13,38	8,02	11,44	10,28	12,92

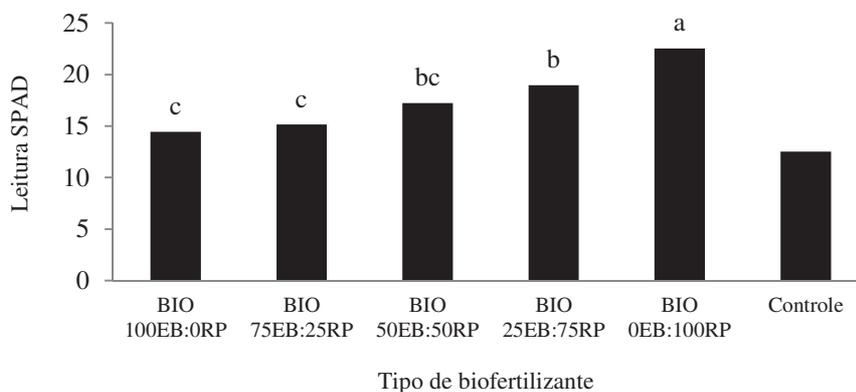
256 ALT - Altura de plantas; AF - Área foliar; SPAD - Teor de clorofila; DC - Diâmetro de caule; NT - Nitrogênio
 257 total; MF - Massa fresca; MS - Massa seca; ns - não significativo, * e ** - significativo a 5% e 1% pelo teste F,
 258 respectivamente.

259 Ainda que não tenha ocorrido efeitos significativos dos fatores isolados para altura, os
 260 resultados obtidos no presente trabalho são similares aos observados por Lana *et al.* (2012), no
 261 sentido da inoculação com *A. brasilense* não ter influenciado aquela variável em plantas de
 262 milho. Mas foi diferente do resultado encontrado por Kappes *et al.* (2013), em que a inoculação
 263 com *A. brasilense* proporcionou maior altura de plantas. Alguns fatores influenciam a resposta
 264 à inoculação de *A. brasilense*, como características genéticas do hospedeiro, estirpe de
 265 *Azospirillum* e condições ambientais, com a seleção de estirpes como um fator chave
 266 (HUNGRIA, 2011). Segundo Dartora *et al.* (2016), a altura da planta é uma característica
 267 genética influenciada pelo ambiente em que as plantas se desenvolvem e que sofre grande
 268 impacto da disponibilidade de nutrientes.

269 Em relação ao teor de clorofila, representado pelo índice SPAD, a maior média foi
 270 observada para o BIO 0EB:100RP, que foi diferente significativamente das demais. Os
 271 resultados indicam que o aumento da proporção do componente resíduos de pescado parece ter
 272 contribuído para o incremento do teor de clorofila em plantas de milho (Figura 5). O resultado
 273 para fator o *A. brasilense* está de acordo como o encontrado por Kappes *et al.* (2013), que não

274 verificaram efeito significativo da presença de fator *A. brasilense* no índice de clorofila foliar
 275 em plantas de milho a partir da segunda leitura no estágio vegetativo.

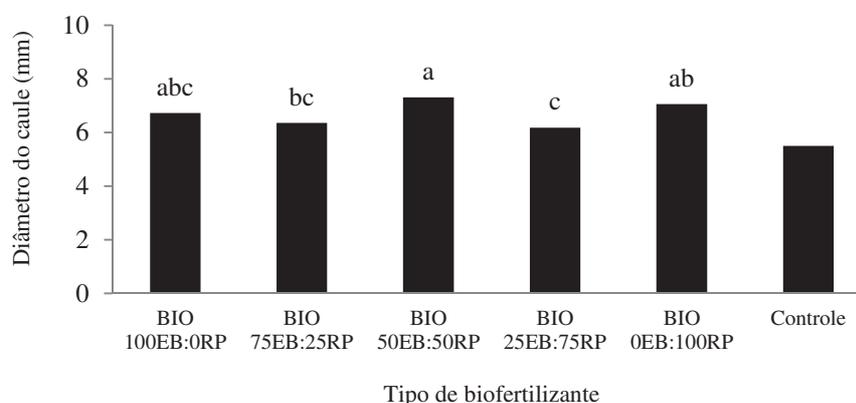
276 **Figura 5.** Valores médios para o teor de clorofila (SPAD) em plantas de milho em função da
 277 aplicação de diferentes tipos de biofertilizantes (médias seguidas da mesma letra não diferiram
 278 entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey).



279

280 Em relação ao diâmetro de caule (DC) ocorreram diferenças significativas entre o BIO
 281 75EB:25RP e BIO 50EB:50RP bem como entre o BIO 25EB:75RP e BIO 50EB:50RP. Entre
 282 os citados, a melhor performance para a variável foi associada ao BIO 50EB:50RP, cujos efeitos
 283 foram similares aos obtidos por BIO 100EB:0RP e BIO 0EB:100RP (Figura 6). O valor relativo
 284 ao diâmetro de caule é um indicador do acúmulo de reservas pela planta e conseqüentemente
 285 da possibilidade de melhor produção (DARTORA *et al.*, 2013).

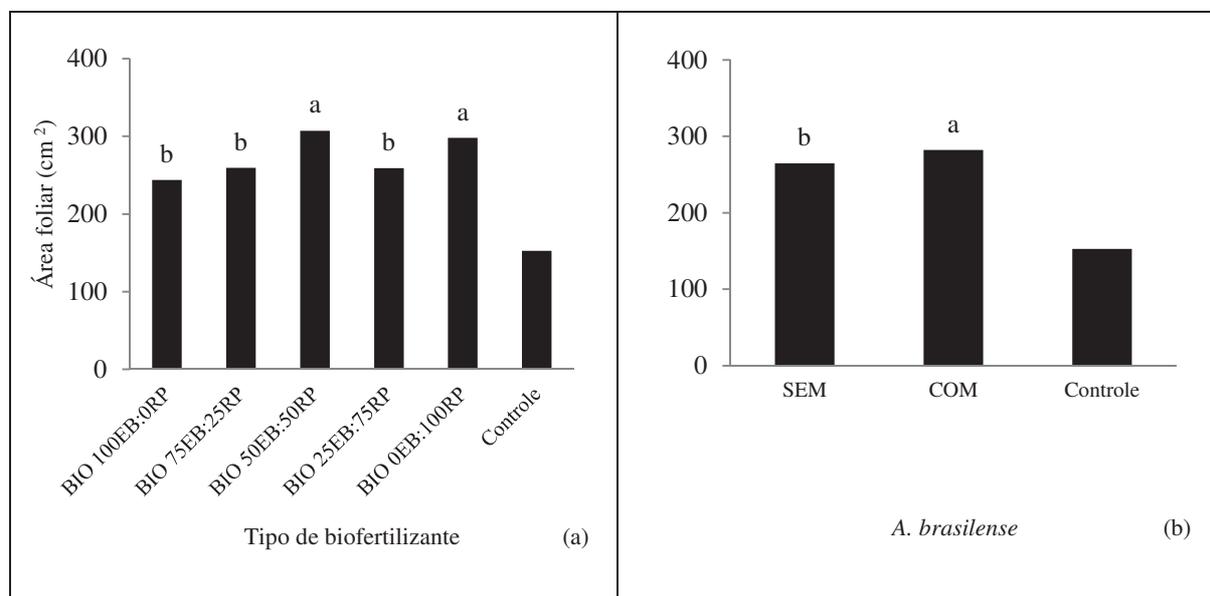
286 **Figura 6.** Valores médios para o diâmetro de caule em plantas de milho em função da aplicação
 287 de diferentes tipos de biofertilizantes (médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si a
 288 5% de probabilidade pelo teste de Tukey).



289

290 As maiores médias para a área foliar (AF) foram obtidas quando da aplicação do BIO
 291 50EB:50RP e BIO 0EB:100RP (Figura 7a) e com a inoculação de *A. brasilense* (Figura 7b).

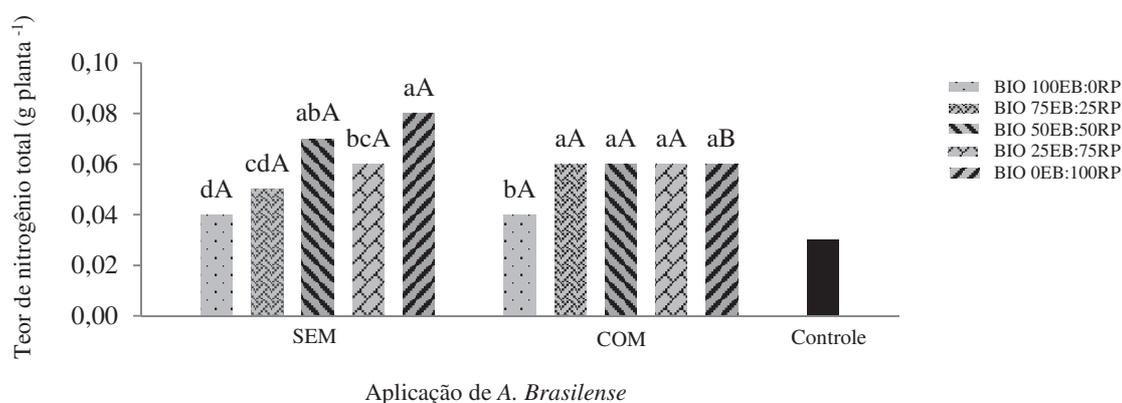
292 **Figura 7.** Valores médios para a área foliar de plântulas de milho em função da aplicação de
 293 diferentes tipos de biofertilizantes (a) e da adição ou não de *A. brasilense* (b) (médias seguidas
 294 da mesma letra não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey).



295 O resultado da inoculação de *A. brasilense* sobre a área foliar é semelhante ao encontrado
 296 por Marini *et al.* (2015) para o efeito da inoculação com a bactéria no aumento da variável. Mas
 297 foi diferente do encontrado por Dartora *et al.* (2013), que trabalhando com *Azospirillum* e
 298 *Herbaspirillum*, não encontraram efeito significativo da aplicação de *A. brasilense* sobre a área
 299 foliar de plantas de milho. Nesse sentido, a área foliar de plantas é um fator importante, pois
 300 quanto maior a área foliar maior a atividade fotossintética e maior a produção. Segundo Peksen
 301 (2007), a área foliar é importante para a interceptação de radiação e troca de água e energia,
 302 além de ser um indicador do crescimento e produtividade da cultura.

304 Quanto à variável nitrogênio total (NT), o tratamento BIO 0EB:100RP sem aplicação de
 305 *A. brasilense* associou-se a maior média, cujo valor não diferiu estatisticamente dos
 306 relacionados aos tratamentos BIO 75EB:25RP, BIO 50EB:50RP e BIO 25EB:75RP, todos
 307 inoculados com a bactéria (Figura 8).

308 **Figura 8.** Valores médios para o nitrogênio total em plantas de milho em função da aplicação
 309 de diferentes tipos de biofertilizantes, sem e com adição de *A. brasilense* (médias seguidas da
 310 mesma letra não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, com letras
 311 minúsculas para bactéria e maiúsculas para tipos de biofertilizantes).



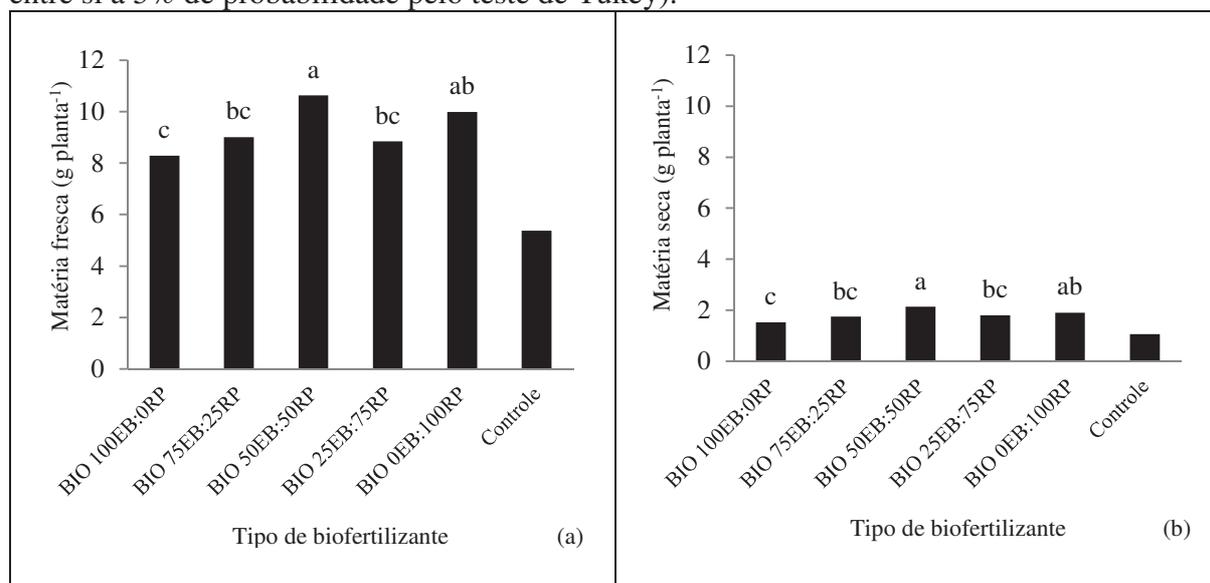
312

313 Interessante notar que a aplicação de *A. brasilense* parece igualar o efeito dos
 314 biofertilizantes em relação ao conteúdo de nitrogênio, com exceção do biofertilizante com
 315 100% do componente esterco bovino. Esse efeito pode estar relacionado ao acúmulo de
 316 nitrogênio promovido pelo *A. brasilense*. Reis Junior *et al.* (2008), relatam que a co-inoculação
 317 de *Azospirillum amazonense* e *Herbaspirillum seropedicae* proporcionaram aumento da
 318 acumulação de nitrogênio em plantas de milho, o que esses autores indicam poder ocorrer
 319 devido à fixação biológica de nitrogênio e a mecanismos de promoção de crescimento, que
 320 propiciam maior capacidade de absorção de nitrogênio pelas plantas.

321 De acordo com Morais *et al.* (2015), o fornecimento de nitrogênio causa o incremento no
 322 teor de clorofila, devido esse nutriente estar envolvido na produção desse pigmento, além de
 323 outras substâncias importantes para o metabolismo vegetal.

324 Para a matéria fresca, a maior média foi relacionada ao BIO 50EB:50RP (Figura 9a). Os
 325 resultados para a matéria seca seguiram a tendência da matéria fresca, com maior média
 326 também para a substituição BIO 50EB:50RP (Figura 9b). Ambas tiveram médias das
 327 composições diferentes significativamente da média do tratamento controle.

328 **Figura 9.** Valores médios para a matéria fresca (a) e seca (b) de plantas de milho em função da
 329 aplicação de diferentes tipos de biofertilizantes (médias seguidas da mesma letra não diferiram
 330 entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey).



331

332

CONCLUSÕES

333 1. Biofertilizantes à base exclusivamente de resíduos de pescado ou destes em associação
 334 com esterco bovino influenciaram negativamente a prevalência da bactéria *A. brasilense* e ao
 335 contrário para os biofertilizantes produzidos exclusivamente com esterco bovino;

336 2. A germinação de sementes do híbrido de milho AG 1051 não foi afetada por solução a
 337 10% de biofertilizantes, inoculados ou não com a bactéria *A. brasilense*; a inoculação da
 338 bactéria e o uso de solução a 10% de biofertilizantes com até 25% de resíduos de pescado
 339 estimularam o alongamento da radícula; o crescimento da parte aérea de plântulas normais foi
 340 mais expressivo quando associado à solução a 10% de biofertilizantes exclusivamente à base
 341 de esterco bovino e inoculado com a bactéria *A. brasilense*;

342 3. O crescimento de plantas do híbrido de milho AG 1051, avaliado aos 45 dias após a
 343 semeadura nas condições do presente trabalho, foi, de um modo geral, positivamente
 344 influenciado pela aplicação de solução a 20% de biofertilizantes exclusivamente à base de
 345 resíduos de pescado e pela inoculação da bactéria *A. brasilense*.

346

347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371

AGRADECIMENTOS

A CAPES, FAPEMA, Universidade Estadual do Maranhão e Laboratório Farroupilha.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009.
- CANELLAS, L. P. *et al.* R. Humic Acids Isoleted from Earthworm Compost Enhance Root Elongation, Lateral Root Emergence, and Plasma Membrane H⁺-ATPase Activity in Maize Roots. **Plant Physiology**, v. 130, 1951-1957, 2002.
- CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 103, p. 117-130, 2016.
- CAVALCANTE, L. F. *et al.* Crescimento e produção do maracujazeiro-amarelo em solo de baixa fertilidade tratado com biofertilizantes líquidos. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.2, n.1, p.15-19, 2007.
- CONCEIÇÃO, P. M. *et al.* Recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 43, n. 4, p. 545-548, 2008.
- DARTORA, J. *et al.* Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.17, n.10, p. 1023-1029, 2013.
- DARTORA, J. *et al.* Maize response to inoculation with strains of plant growth-promoting bactéria. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n.7, p. 606-611, 2016.
- DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/Itaguaí: EMBRAPA-CNPAB, 1995.

- 372 EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Centro
373 Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3. ed. Brasília:
374 Embrapa Solos, 2013. 353p.
- 375 FUKAMI, J. *et al.* Assessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum*
376 *brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 3, p. 1-13, 2016.
- 377 HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixa**
378 **custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. (Embrapa Soja. Documentos, 325).
- 379 KAPPES, C. *et al.* Inoculação de sementes com bactéria diazotrófica e aplicação de nitrogênio
380 em cobertura e foliar em milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2; p. 527-538, 2013.
- 381 LANA, M. C. *et al.* Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in
382 maize. **Revista Ceres**, v. 59, n. 3, p. 399-405, 2012.
- 383 LIMA, R. M. *et al.* Redução do fósforo pela peneiragem da farinha de resíduos de peixes.
384 **Ciência Rural**, v.44, n.10, p.1841-1844, 2014.
- 385 MARINI, D. *et al.* Growth and yield of corn hybrids in response to association with
386 *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization. **Revista Ceres**, v. 62, n. 1, p. 117-123, 2015.
- 387 MATSUMURA, E. E. *et al.* Composition and activity of endophytic bacterial communities in
388 field-grown maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Annals of Microbiology**, v.
389 65, n. 4, p. 2187-2200, 2015.
- 390 MIRANDA, A. P. *et al.* Anaerobic biodigestion of pigs feces in the initial, growing and
391 finishing stages fed with diets formulated with corn or sorghum. **Engenharia Agrícola**, v. 32,
392 n. 1, p. 47-59, 2012.
- 393 MORAIS, T. P. *et al.* Aspectos morfofisiológicos de plantas de milho e bioquímico do solo em
394 resposta à adubação nitrogenada e à inoculação com *Azospirillum brasilense*. **Revista Ceres**,
395 v. 62, n. 6, p. 589-596, 2015.

- 396 MOREIRA, F. M. *et al.* Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial
397 de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74-99, 2010.
- 398 MÜLLER, T. M. *et al.* Combination of inoculation methods of *Azospirillum brasilense* with
399 broadcasting of nitrogen fertilizer increases corn yield. **Ciência Rural**, v. 46, n.2, p. 210-215,
400 2015.
- 401 NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In:
402 KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes:**
403 **conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. p.2.1-2.24.
- 404 PEKSEN, E. Non-destructive leaf area estimation model for faba bean (*Vicia faba* L.). **Scientia**
405 **Horticulturae**, v.113, n.4, p.322-328, 2007.
- 406 PEREIRA, L. M. *et al.* Seed quality, chlorophyll content index and leaf nitrogen levels in maize
407 inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 3, p. 630-637,
408 2015.
- 409 PETENUCCI, M. E. *et al.* Composição e estabilidade lipídica da farinha de espinhaço de tilápia.
410 **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n.5. p 1279-1284, 2010.
- 411 RAIJ, B. van.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações**
412 **de Adubação e Calagem para o Estado de São Paulo**, 2 ed. rev. atual. Campinas: Instituto
413 Agronômico/Fundação IAC, 1997. 285p. (Boletim Técnico, 100).
- 414 REIS JUNIOR, F. B. *et al.* **Isolamento, caracterização e seleção de estirpes de *Azospirillum***
415 ***amazonense* e *Herbaspirillum seropedicae* associadas a diferentes variedades de milho**
416 **cultivadas no cerrado**. Planaltina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2008. 36p.
417 Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 206.
- 418 RIMA, J. A. H. *et al.* Adição de ácido cítrico potencializa a ação de ácidos húmicos e altera o
419 perfil protéico da membrana plasmática em raízes de milho. **Ciência Rural**, v. 41, n. 4, p. 614-
420 620, 2011.

421 SABUNDJIAN, M. T. *et al.* Adubação nitrogenada em feijoeiro em sucessão a cultivo solteiro
422 e consorciado de milho e *Urochloa ruziziensis*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.43, n.3, p.
423 292-299, 2013.

424 VALENTE, B. S. *et al.* Compostagem na gestão de resíduos de pescado de água doce. **Boletim**
425 **do Instituto de Pesca**, v. 40, n. 1, p. 95-103, 2014.

426

ANEXO

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Atenção: As normas da Revista Ciência Agronômica podem sofrer alterações, portanto não deixe de consultá-las antes de fazer a submissão de um artigo. Elas são válidas para todos os trabalhos submetidos neste periódico. Um modelo de artigo pode ser visto em “MODELO ARTIGO” no endereço <http://www.ccarevista.ufc.br>.

1. Política Editorial

A Revista Ciência Agronômica destina-se à publicação de **artigos científicos e artigos técnicos que sejam originais e que não foram publicados ou submetidos a outro periódico, inerentes às áreas de Ciências Agrárias e Recursos Naturais**. Os artigos poderão ser submetidos na Revista Ciência Agronômica nos idiomas português, inglês ou espanhol. **Se aprovado o artigo deverá ser traduzido e publicado em inglês**. A RCA exige que a tradução seja feita por alguma empresa especializada. Abaixo sugerimos preferencialmente algumas:

- Academic-Editing-Services.com (<http://www.academic-editing-services.com/>)
- American Journal Express (<http://www.journalexpress.com/>)
- American Manuscript Editors (<http://americanmanuscripteditors.com/>)
- Bioedit Scientific Editing (<http://www.bioedit.co.uk/>)
- BioMed Proofreading (<http://www.biomedproofreading.com>)
- Edanz (<http://www.edanzediting.com>)
- Editage (<http://www.editage.com.br/>)
- Elsevier (<http://webshop.elsevier.com/languageservices/>)
- Enago (<http://www.enago.com.br/forjournal/>)
- GlobalEdico (<http://www.gloaledico.com/>)
- JournalPrep (<http://www.journalprep.com>)
- Paulo Boschcov (paulo@bridgetextos.com.br, bridge.textecn@gmail.com)
- Proof-Reading-Service.com (<http://www.proof-reading-service.com/pt/>)
- Publicase (<http://www.publicase.com.br/formulario.asp>)
- Queen's English (<http://www.queensenglishediting.com/>)
- STTA - Serviços Técnicos de Tradução e Análises (<http://stta.com.br/servicos.php>)

A tradução para o inglês é custeada pelos autores e o comprovante enviado para a sede da RCA no ato da submissão através da nossa página no campo “Transferir Documentos Suplementares”.

Os trabalhos submetidos à RCA serão **avaliados preliminarmente pelo Comitê Editorial** e só então serão enviados para pelo menos dois (2) revisores da área e publicados, somente, se aprovados por eles e pelo Comitê Editorial. A publicação dos artigos será baseada na originalidade, qualidade e mérito científico, **cabendo ao Comitê Editorial a decisão final do aceite**. O sigilo de identidade dos autores e revisores será mantido durante todo o processo. A administração da revista tomará o cuidado para que os revisores de cada artigo sejam, obrigatoriamente, de instituições distintas daquela de origem dos autores. **O artigo que apresentar mais de cinco autores não terá a sua submissão aceita pela Revista Ciência Agronômica, salvo algumas condições especiais (ver Autores)**. Não serão permitidas mudanças nos nomes de autores *a posteriori*.

2. Custo de publicação

O custo é de **R\$ 45,00 (quarenta e cinco reais) por página editorada** no formato final. No ato da submissão é **requerido um depósito de R\$ 100,00 (cem reais) não**

reembolsáveis. Se o trabalho for rejeitado na avaliação prévia do Comitê Editorial, a taxa paga não poderá ser reutilizada para outras submissões dos autores. O comprovante de depósito ou transferência deve ser enviado ao e-mail da RCA (ccarev@ufc.br). Os depósitos ou transferências deverão ser efetuados em nome de:

CETREDE CIENCIA AGRONOMIC

Banco do Brasil: Agência bancária: **3653-6** - Conta corrente: **46.375-2**

As opiniões emitidas nos trabalhos são de exclusiva responsabilidade de seus autores. A Revista Ciência Agronômica reserva-se o direito de adaptar os originais visando manter a uniformidade da publicação. A RCA não mais fornece separatas ou exemplares aos autores. A distribuição na forma impressa da RCA é de responsabilidade da Biblioteca de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal do Ceará sendo realizada por meio de permuta com bibliotecas brasileiras e do exterior. Na submissão online é requerido:

1. A concordância com a declaração de responsabilidade de direitos autorais;
2. Que o autor que fizer a submissão do trabalho **cadastre todos os autores no sistema**;
3. Identificação do autor de correspondência com endereço completo.

3. Formatação do Artigo

DIGITAÇÃO: no máximo 20 páginas digitadas em espaço duplo (exceto Tabelas), fonte Times New Roman, normal, tamanho 12, recuo do parágrafo por 1 cm. Todas as margens deverão ter 2,5 cm. As linhas devem ser numeradas de forma contínua.

ESTRUTURA: o trabalho deverá obedecer à seguinte ordem: título, título em inglês, resumo, palavras-chave, abstract, key words, introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusões, agradecimentos (opcional) e referências.

TÍTULO: deve ser escrito com apenas a inicial maiúscula, em negrito e centralizado na página com no **máximo 15 palavras**. Como chamada de rodapé numérica, extraída do título, devem constar informações sobre a **natureza do trabalho** (se extraído de tese/dissertação, se pesquisa financiada,...) e referências às instituições colaboradoras. Os subtítulos: Introdução, Material e métodos, Resultados e discussão, Conclusões, Agradecimentos e Referências devem ser escritos em caixa alta, em negrito e centralizados.

AUTORES: na primeira versão do artigo submetido, os nomes dos autores e a nota de rodapé deverão ser omitidos. Somente na versão final o artigo deverá conter o nome de todos os autores com identificação em nota de rodapé, inclusive a do título. Os nomes completos (sem abreviaturas) deverão vir abaixo do título, somente com a primeira letra maiúscula, um após outro, separados por vírgula e centralizados na linha. Como nota de rodapé na primeira página, deve-se indicar, de cada autor, afiliação completa (departamento, centro, instituição, cidade, estado e país), endereço eletrônico e endereço completo do autor correspondente. O autor de correspondência deve ser identificado por um "*". **Só serão aceitos artigos com mais de cinco autores, quando, comprovadamente, a pesquisa tenha sido desenvolvida em regiões distintas (diferentes).**

RESUMO e ABSTRACT: devem começar com estas palavras, na margem esquerda, em caixa alta e em negrito, contendo no máximo **250 palavras**.

PALAVRAS-CHAVE e KEY WORDS: devem conter entre três e cinco termos para indexação. Os termos usados não devem constar no título. Cada **palavra-chave e key word** deve iniciar com letra maiúscula e ser seguida de ponto.

INTRODUÇÃO: deve ser compacta e objetiva contendo citações atuais que apresentem relação com o assunto abordado na pesquisa. As citações presentes na introdução devem ser empregadas para fundamentar a discussão dos resultados, criando, assim, uma contextualização entre o estudo da arte e a discussão dos resultados. Não deve conter mais de **550 palavras**.

CITAÇÃO DE AUTORES NO TEXTO: a NBR 10520/2002 estabelece as condições exigidas para a apresentação de citações em documentos técnico-científicos e acadêmicos. Nas citações, quando o sobrenome do autor, a instituição responsável ou título estiver incluído na sentença, este se apresenta em letras maiúsculas/minúsculas, e quando estiverem entre parênteses, em letras maiúsculas.

Ex: Santos (2002) ou (SANTOS, 2002); com dois autores ou três autores, usar Pereira e Freitas (2002) ou (PEREIRA; FREITAS, 2002) e Cruz, Perota e Mendes (2000) ou (CRUZ; PEROTA; MENDES, 2000); com mais de três autores, usar Xavier *et al.* (1997) ou (XAVIER *et al.*, 1997).

VÁRIOS AUTORES CITADOS SIMULTANEAMENTE: havendo citações indiretas de diversos documentos de vários autores mencionados simultaneamente e que expressam a mesma idéia, separam-se os autores por ponto e vírgula, **em ordem alfabética**, independente do ano de publicação.

Ex: (FONSECA, 2007; PAIVA, 2005; SILVA, 2006).

SIGLAS: quando aparecem pela primeira vez no texto, deve-se colocar o nome por extenso, seguido da sigla entre parênteses.

Ex: De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) [...].

TABELAS: devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos na parte superior. Não usar linhas verticais. As linhas horizontais devem ser usadas para separar o título do cabeçalho e este do conteúdo, além de uma no final da tabela. Cada dado deve ocupar uma célula distinta. Usar espaço simples. Não usar negrito ou letra maiúscula no cabeçalho.

FIGURAS: gráficos, fotografias ou desenhos levarão a denominação geral de **Figura** sucedida de numeração arábica crescente e legenda na parte superior. Para a preparação dos gráficos deve-se utilizar “softwares” compatíveis com “Microsoft Windows”. As figuras devem apresentar 8,2 cm de largura, não sendo superior a 17 cm. A fonte Times New Roman, corpo 10 e não usar negrito na identificação dos eixos. A Revista Ciência Agronômica reserva-se ao direito de não aceitar tabelas e/ou figuras com o papel na forma “paisagem” ou que apresentem mais de 17 cm de largura. **Tabelas e Figuras devem ser inseridas logo após a sua primeira citação.**

Obs.: As figuras devem ser também enviadas em arquivos separados e com RESOLUÇÃO de no mínimo 500 dpi através do campo “Transferir Documentos Suplementares”.

EQUAÇÕES: devem ser digitadas usando o editor de equações do Word, com a fonte Times New Roman. As equações devem receber uma numeração arábica crescente. O padrão de tamanho deverá ser:

Inteiro = 12 pt
Subscrito/sobrescrito = 8 pt
Sub-subscrito/sobrescrito = 5 pt
Símbolo = 18 pt
Subsímbolo = 14 pt

ESTATÍSTICA:

1. Caso tenha realizado análise de variância, apresentar o "F" e a sua significância;
2. Dados quantitativos devem ser tratados pela técnica de análise de regressão;
3. Apresentar a significância dos parâmetros da equação de regressão;
4. Dependendo do estudo (ex: função de produção), analisar os sinais associados aos parâmetros.
5. É requerido, no mínimo, quatro pontos para se efetuar o ajuste das equações de regressão.
6. Os coeficientes do modelo de regressão devem apresentar o seguinte formato:
 $y = a + bx + cx^2 + \dots$;
7. O Grau de Liberdade do resíduo deve ser superior a 12.

CONCLUSÕES: quando escritas em mais de um parágrafo devem ser numeradas.

AGRADECIMENTOS: logo após as conclusões poderão vir os agradecimentos direcionados a pessoas ou instituições, em estilo sóbrio e claro, indicando as razões pelas quais os faz.

REFERÊNCIAS: são elaboradas conforme a ABNT NBR 6023/2002. Inicia-se com a palavra REFERÊNCIAS (escrita em caixa alta, em negrito e centralizada). Devem ser digitadas em fonte tamanho 12, espaço duplo e justificadas. **UM PERCENTUAL DE 60% DO TOTAL DAS REFERÊNCIAS DEVERÁ SER ORIUNDO DE PERIÓDICOS CIENTÍFICOS INDEXADOS COM DATA DE PUBLICAÇÃO INFERIOR A 10 ANOS. Não são contabilizadas neste percentual de 60% referências de livros. Não serão aceitas nas referências citações de Resumos, Anais, Comunicados Técnicos, Monografias, Dissertações e Teses.** Com relação aos periódicos, é dispensada a informação do local de publicação, porém os títulos não devem ser abreviados. Recomenda-se um total de 20 a 30 referências.

Alguns exemplos:

- Livro

NEWMANN, A. L.; SNAPP, R. R. **Beef cattle**. 7. ed. New York: John Willey, 1977. 883 p.

- Capítulo de livro

MALAVOLTA, E.; DANTAS, J. P. Nutrição e adubação do milho. *In:* PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. **Melhoramento e produção do milho**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargil, 1987. cap. 13, p. 539-593.

- Artigo de revista

XAVIER, D. F.; CARVALHO, M. M.; BOTREL, M. A. Resposta de *Cratylia argentea* à aplicação em um solo ácido. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n. 1, p. 14-18, 1997.

ANDRADE, E. M. *et al.* Mapa de vulnerabilidade da bacia do Acaraú, Ceará, à qualidade das águas de irrigação, pelo emprego do GIS. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, n. 3, p. 280-287, 2006.

UNIDADES e SÍMBOLOS: As unidades e símbolos do Sistema Internacional adotados pela Revista Ciência Agronômica.

Grandezas básicas	Unidades	Símbolos	Exemplos
Comprimento	metro	m	
Massa	quilograma	kg	
Tempo	segundo	s	
Corrente elétrica	amper	A	
Temperatura termodinâmica	Kelvin	K	
Quantidade de substância	mol	mol	
Unidades derivadas			
Velocidade	---	$m s^{-1}$	$343 m s^{-1}$
Aceleração	---	$m s^{-2}$	$9,8 m s^{-2}$
Volume	metro cúbico, litro	m^3 , L*	$1 m^3$, 1 000 L*
Frequência	Hertz	Hz	10 Hz
Massa específica	---	$kg m^{-3}$	$1.000 kg m^{-3}$
Força	newton	N	15 N
Pressão	pascal	Pa	$1,013 \cdot 10^5 Pa$
Energia	joule	J	4 J
Potência	watt	W	500 W
Calor específico	---	$J (kg ^\circ C)^{-1}$	$4186 J (kg ^\circ C)^{-1}$
Calor latente	---	$J kg^{-1}$	$2,26 \cdot 10^6 J kg^{-1}$
Carga elétrica	coulomb	C	1 C
Potencial elétrico	volt	V	25 V
Resistência elétrica	ohm	Ω	29 Ω
Intensidade de energia	Watts/metros quadrado	$W m^{-2}$	$1.372 W m^{-2}$
Concentração	mol/metro cúbico	$mol m^{-3}$	$500 mol m^{-3}$
Condutância elétrica	siemens	S	300 S
Condutividade elétrica	desiemens/metro	$dS m^{-1}$	$5 dS m^{-1}$
Temperatura	grau Celsius	$^\circ C$	$25 ^\circ C$
Ângulo	grau	$^\circ$	30°
Porcentagem	---	%	45%

Números mencionados em seqüência devem ser separados por ponto e vírgula (;). Ex: 2,5; 4,8; 25,3.

4. Lista de verificação - Revista Ciência Agronômica

Visando a maior agilidade no processo de submissão de seu artigo, o Comitê Editorial da Revista Ciência Agronômica, elaborou uma lista de verificação para que o autor possa conferir toda a formatação do manuscrito de sua autoria, **ANTES** de submetê-lo para publicação. A lista foi elaborada de acordo com as normas da Revista Ciência Agronômica. Respostas **NEGATIVAS** significam que seu artigo ainda deve ser adaptado às normas da revista e a submissão de tais artigos implicará na sua devolução e retardo na tramitação.

Respostas **POSITIVAS** significam que seu artigo está em concordância com as normas, implicando em maior rapidez na tramitação.

A. Referente ao trabalho

1. O trabalho é original?
2. O trabalho representa uma contribuição científica para a área de Ciências Agrárias?
3. O trabalho está sendo enviado com exclusividade para a Revista Ciência Agronômica?

B. Referente à formatação

4. O trabalho pronto para ser submetido online está omitindo os nomes dos autores na versão Word?
5. O trabalho contém no máximo 20 páginas, está no formato A4, digitado em espaço duplo, incluindo as referências; fonte Times New Roman tamanho 12, incluindo títulos e subtítulos?
6. As margens foram colocadas a 2,5 cm, a numeração de páginas foi colocada na margem superior, à direita e as linhas foram numeradas de forma contínua?
7. O recuo do parágrafo de 1 cm foi definido na formatação do parágrafo? Lembre-se que a revista não aceita recuo de parágrafo usando a tecla “TAB” ou a “barra de espaço”.
8. A estrutura do trabalho está de acordo com as normas, ou seja, segue a seguinte ordem: título, título em inglês, autores, resumo, palavras-chave, abstract, key words, introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusões, agradecimentos (opcional) e referências?
9. O título contém no máximo 15 palavras?
10. O resumo e o abstract apresentam no máximo 250 palavras?
11. As palavras-chave (key words) contém entre três e cinco termos, iniciam com letra maiúscula e são seguidas de ponto?
12. A introdução contém citações atuais que apresentam relação com o assunto abordado na pesquisa e apresenta no máximo 550 palavras?
13. As citações apresentadas na introdução foram empregadas para fundamentar a discussão dos resultados?
14. As citações estão de acordo com as normas da revista?
15. As tabelas e figuras estão formatadas de acordo com as normas da revista e estão inseridas logo em seguida à sua primeira citação? Lembre-se, não é permitido usar “enter” nas células que compõem a(s) tabela(s).
16. As tabelas estão no formato retrato?
17. As figuras apresentam boa qualidade visual?
18. As unidades e símbolos utilizados no seu trabalho se encontram dentro das normas do Sistema Internacional adotado pela Revista Ciência Agronômica?
19. Os números estão separados por ponto e vírgula? As unidades estão separadas do número por um espaço? Lembre-se, não existe espaço entre o número e o símbolo de %.
20. O seu trabalho apresenta entre 20 e 30 referências sendo 60% destas publicadas com menos de 10 anos em periódicos indexados?
21. Todas as referências estão citadas ao longo do texto?
22. Todas as referências citadas ao longo do texto estão corretamente descritas, conforme as normas da revista, e aparecem listadas?

C. Observações:

1. Lembre-se que **SE** as normas da revista não forem seguidas rigorosamente, seu trabalho não irá tramitar. Portanto, é melhor retardar o envio por mais alguns dias e conferir todas as normas. A consulta de um trabalho já publicado na sua área pode lhe ajudar a sanar algumas dúvidas e pode servir como um modelo (acesse aos periódicos no site <http://www.ccarevista.ufc.br/busca>).

2. Caso suas respostas sejam todas **AFIRMATIVAS** seu trabalho será enviado com maior segurança. Caso tenha ainda respostas **NEGATIVAS**, seu trabalho irá retornar retardando o processo de tramitação.

Lembre-se: A partir da segunda devolução, por irregularidade normativa, principalmente em se tratando das referências, o mesmo terá a submissão cancelada e **não haverá devolução da taxa de submissão**. Portanto é muito importante que os autores verifiquem cuidadosamente as normas requeridas pela Revista Ciência Agronômica.

3. Procure **SEMPRE** acompanhar a situação de seu trabalho pela página da revista (<http://ccarevista.ufc.br>) no sistema online de gerenciamento de artigos.
4. Esta lista de verificação não substitui a revisão técnica da revista, a qual todos os artigos enviados serão submetidos.