



Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

**EFICIÊNCIA DO *Azospirillum brasilense*  
ASSOCIADO À ADUBAÇÃO NITROGENADA  
SOBRE AS CARACTERÍSTICAS  
AGRONÔMICAS DO MILHETO E VALOR  
NUTRICIONAL DE SUA SILAGEM**

**WALTER SOARES DA SILVA FILHO**

2020

**WALTER SOARES DA SILVA FILHO**

**EFICIÊNCIA DO *Azospirillum brasilense* ASSOCIADO À ADUBAÇÃO NITROGENADA SOBRE AS CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS DO MILHETO E VALOR NUTRICIONAL DE SUA SILAGEM**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para obtenção do título de Mestre.

**Orientadora**  
**Prof. Dra. Camila Maida Albuquerque Maranhão**

**Janaúba**  
**2020**

**Ficha Catalográfica**

*O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001*

S311e	<p>Silva Filho, Walter Soares da</p> <p>Eficiência do <i>Azospirillum brasilense</i> associado à adubação nitrogenada sobre as características agronômicas do milheto e valor nutricional de sua silagem [manuscrito] / Walter Soares da Silva Filho – 2020. 50 p.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Montes Claros – Janaúba, 2020. Orientadora: Prof. D. Sc. Camila Maida Albuquerque Maranhão.</p> <p>1. Adubação nitrogenada. 2. Bactérias. 3. Milheto. 4. Silagem. I. Maranhão, Camila Maida Alquerque. II. Universidade Estadual de Montes Claros. III. Título.</p> <p>CDD. 631.81</p>
-------	--

Catálogo: Joyce Aparecida Rodrigues de Castro Bibliotecária CRB6/2445



GOVERNO DO ESTADO DE MINAS  
GERAIS Universidade Estadual de Montes  
Claros Mestrado em Zootecnia

Declaração - UNIMONTES/PRPG/PPGZ - 2020

Montes Claros, 10 de setembro de 2020.

**WALTER SOARES  
DA SILVA FILHO**

**EFICIÊNCIA DO *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* ASSOCIADO À  
ADUBAÇÃO NITROGENADA SOBRE AS CARACTERÍSTICAS  
AGRONÔMICAS AS CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS DO  
MILHETO E VALOR NUTRICIONAL DE SUA SILAGEM**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

**APROVADA em 15 de JUNHO de 2020.**

**Dra. Camila Maida de Albuquerque Maranhão/ Presidente/ UNIMONTES**

**Dr. Virgílio Mesquita Gomes/ Membro Interno/ UNIMONTES**

**Dra. Héliida Christine de Freitas Monteiro / Membro Interno/ UNIMONTES**

**Dr. Flávio Pinto Monção/ Membro Interno/UNIMONTES**

**Dr. Thiago Gomes dos Santos Braz / Membro Externo/ UFMG**

**JANAÚBA, MINAS GERAIS – BRASIL/2020**



Documento assinado eletronicamente por **Camila Maida de Albuquerque Maranhao, Professora de Educação Superior**, em 10/09/2020, às 19:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **FREDSON VIEIRA E SILVA, Coordenador**, em 10/09/2020, às 20:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helida Christhine de Freitas Monteiro, Professora de Educação Superior**, em 10/09/2020, às 22:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Virgilio Mesquita Gomes, Professor(a)**, em 14/09/2020, às 21:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flávio Pinto Monção, Professor(a)**, em 25/09/2020, às 16:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Gomes dos Santos Braz, Usuário Externo**, em 02/10/2020, às 14:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



A auten cidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.mg.gov.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.mg.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 19273239 e o código CRC AE79C0E7.

## SUMÁRIO

<b>NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA .....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMO GERAL.....</b>	<b>10</b>
<b>GENERAL ABSTRACT .....</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
2.1 O Semiárido brasileiro.....	13
2.2 Cultura do milheto .....	14
2.3 Bactérias do gênero <i>Azospirillum</i> .....	15
2.4 Benefícios proporcionados pelo gênero <i>Azospirillum</i> .....	17
<b>3. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>20</b>
<b>4. ARTIGO - Eficiência do <i>Azospirillum brasilense</i> associado à adubação nitrogenada sobre as características agrônômicas do milheto e valor nutricional de sua silagem .....</b>	<b>25</b>
RESUMO:.....	25
ABSTRACT: .....	25
4.1 INTRODUÇÃO.....	26
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.2.1 Local .....	27
4.2.2 Tratamentos e manejo experimental.....	28
4.2.3 Perdas, e pH da silagem .....	30
4.2.4 Composição químico-bromatológica .....	30
4.2.5 Degradabilidade in situ .....	31
4.2.6 Análises Estatísticas.....	32
4.3 RESULTADOS.....	33
4.4 DISCUSSÃO .....	35
4.5 CONCLUSÃO.....	39
4.6 AGRADECIMENTO .....	39
4.7 REFERÊNCIAS .....	39
4.8 – FIGURAS E TABELAS.....	44
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>51</b>

## **DEDICO...**

Aos meus pais **Walter e Sueli**, por sempre me apoiarem e incentivarem em todas as etapas de minha trajetória, e pelo exemplo de vida, determinação, honestidade, apoio e amor incondicional para comigo!

À minha Irmã **Haline** e seu marido **João Batista**, e especialmente à minha linda afilhada, **Ana Luísa**, agradeço pelos dias felizes, e apoio nos dias mais difíceis e por ter me dado uma das melhores experiências, ser padrinho.

**Consagre ao Criador tudo o que você faz,  
e os seus planos serão bem-sucedidos!**  
(Provérbios, 16:3)

## AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente ao Criador, pois Ele é minha fortaleza, e por ter me concedido saúde e determinação. Onde sempre esteve presente em meu coração nos momentos de alegrias ou de tristezas, me dando forças para concluir este trabalho;

À Universidade Estadual e Montes Claros, e principalmente aos professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, pela ótima convivência e por ter me conduzido a um bom aprendizado, fico grato de ter feito parte desse programa e por ter contribuído de forma singela.

À minha orientadora Profa. Dra. *Camila Maida de Albuquerque Maranhão*, pelo seu profissionalismo, conselhos, empenho e pela confiança em mim depositada, principalmente pela liberdade de ações na realização deste trabalho desenvolvido. Sou grato por tudo, e me orgulho em tê-la como orientadora.

Ao meu coorientador Prof. Dr. *Virgílio Mesquita Gomes* pelo apoio, competência, amizade, conselhos. Seus ensinamentos serão referência para todo meu futuro, onde certamente todos serão lembrados. Eternamente grato por ter me coorientado.

Ao Dr. *Flávio Pinto Monção*, pelo companheirismo, competência e conselhos, contribuindo sem medir esforço para a conclusão deste trabalho, e por sempre está disposto a tirar minhas dúvidas. Imensamente grato por você fazer parte dessa minha trajetória, “*É só alegria*” meu amigo.

A todos funcionários da Instituição responsáveis por manter o funcionamento da Universidade, e especialmente aos funcionários da Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Montes Claros, pelo auxílio para conclusão deste trabalho.

A todos do Grupo GEEFOR que pelas valiosas contribuições para execução deste trabalho, e pela boa convivência que tivemos juntos.

A empresa Biomulti pelo auxílio técnico, e pelo fornecimento do produto necessário para realização do experimento.

Aos amigos irmão da pós-graduação: *Antônio Augusto, Fausto, Luiz Fernando*, e principalmente *Marco Aurélio e Vinícius Martins* que foram imprescindíveis para realização deste trabalho. Nossos bons momentos estarão eternizados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, ao Conselho



Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo auxílio de bolsa estudantil e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - INCT- Ciência Animal.

Sou muito grato, e em meu coração eu compreendo a imensa importância de todos em minha vida profissional.

Muito Obrigado!

## **NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA**

Esta dissertação segue as premissas básicas da Revista Brasileira de Zootecnia. link:

<https://www.rbz.org.br/pt-br/>.

## RESUMO GERAL

Da Silva Filho, Walter Soares. **Eficiência do *Azospirillum brasilense* associado à adubação nitrogenada sobre as características agronômicas do milho e valor nutricional de sua silagem.** 2020. 42 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG<sup>1</sup>.

O milho é uma cultura anual adaptada à produção de silagem no semiárido. Sua produção pode ser aumentada com uso de nitrogênio. Porém, em função do seu alto valor, tem sido testada como alternativa, com bactérias promotoras de crescimento como o *Azospirillum brasilense*. Dessa forma, objetivou-se determinar a melhor dose do *Azospirillum brasilense* que proporcione maior produtividade e valor nutricional da planta inteira e da silagem de milho, associado ou não com a adubação nitrogenada. Utilizou-se o delineamento em blocos ao acaso em arranjo fatorial 4 x 2, sendo quatro doses de solução do *Azospirillum brasilense* (0, 10, 20, 30 litro ha<sup>-1</sup>), associado ou não à ureia convencional, com cinco repetições. Não houve interação entre os fatores *Azospirillum brasilense* e nitrogênio para as variáveis estudadas. A pulverização de 30 litros incrementou 6,80% na altura da planta, e 23,88 na produção de matéria seca por ha<sup>-1</sup> quando comparado aos tratamentos que não receberam a pulverização da bactéria. A dose de 30 litros reduziu em 2,18% no teor de proteína bruta e 2,73% nos nutrientes digestíveis totais. Entretanto, a dose de 30 litros produziu 562,33 kg de proteína bruta e 2.898,16 por ha<sup>-1</sup> de nutrientes digestíveis totais a mais do que os tratamentos que não receberam a pulverização. A dose de 30 litros produz maior quantidade de matéria seca por ha<sup>-1</sup>, e reduz o valor nutricional. Entretanto, resulta em maior produção de proteína bruta e nutrientes digestíveis totais por hectare. O *Azospirillum brasilense* demonstra ser uma tecnologia sustentável e com boa produtividade, sendo que a aplicação da adubação nitrogenada não aumentou a produção de matéria seca por hectare.

**Palavra-chave:** Bactérias promotoras de crescimento de plantas, degradabilidade, *Pennisetum glaucum*

<sup>1</sup>**Comitê de Orientação:** Profa. Camila Maida de Albuquerque Maranhão – Departamento de Ciência Agrárias/UNIMONTES (Orientadora); Prof. Virgílio Mesquita Gomes – Departamento de Ciência Agrárias/UNIMONTES (Co-Orientador); Pós-Doutorando Flávio Pinto Monção – Departamento Ciência Agrárias/UNIMONTES (Co-Orientador).

## GENERAL ABSTRACT

Da Silva Filho, Walter Soares. **Efficiency of *Azospirillum brasilense* associated with nitrogen fertilization on the agronomic characteristics of millet and nutritional value of its silage.** 2020. p. 44. Dissertation (Master in Zootecnics) - State University of Montes Claros, Janaúba, MG<sup>1</sup>.

Millet is an annual crop adapted to the production of silage in the semiarid region. Its production can be increased with the use of nitrogen. However, due to their high value, growth-promoting bacteria such as *Azospirillum brasilense* have been tested as an alternative. Thus, the objective was to determine the best dose of *Azospirillum brasilense* that provides greater productivity and nutritional value of the entire plant and millet silage, associated or not with nitrogen fertilization. A randomized block design in a 4 x 2 factorial arrangement was used, with four doses of *Azospirillum brasilense* solution (0, 10, 20, 30-liter ha<sup>-1</sup>), associated or not with conventional urea, with five replications. There was no interaction between the factors, *Azospirillum brasilense* and nitrogen for the studied variables. The spraying of 30 liters increased 6.80% in the height of the plant, and 23.88% in the production of dry matter per ha when compared to treatments that do not received the spray of the bacteria. The 30-liter dose reduced 2.18% in the crude protein content by and 2.73% in the total digestible nutrients. However, the dose of 30 liters produced 562.33 kg of crude protein and 2,898.16 per ha<sup>-1</sup> of total digestible nutrients more than the treatments that did not receive the spray. The dose of 30 liters produces a greater amount of dry matter per ha<sup>-1</sup>, and reduces the nutritional value, however it results in greater production of crude protein and total digestible nutrients per hectare. *Azospirillum brasilense* proves to be a sustainable technology with good productivity, and the application of nitrogen fertilization did not increase the production of dry matter per hectare.

**Key words:** Plant growth promoting bacteria, degradability, *Pennisetum glaucum*

<sup>1</sup>**Guidance committe:** Profa. Camila Maida de Albuquerque Maranhão - Department of Agrarian Sciences/UNIMONTES (Adviser); Prof. Virgílio Mesquita Gomes - Department of Agrarian Sciences/UNIMONTES (Co-advisor); Postdoctoral Flávio Pinto Monção - Department of Agrarian Sciences/UNIMONTES (Co-advisor).

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A sazonalidade e a queda de produção de forragem do pasto são um dos principais fatores que limitam a produção dos ruminantes nos trópicos. Alternativamente, a produção de silagem no período das águas permite o aproveitamento do período favorável do ano para produção e conservação de alimentos para a seca.

Dentre as diversas forrageiras com potencial de utilização para ensilagem (i. e. milho, sorgo, capim-elefante), o milheto [*Pennisetum glaucum* (L. R. Br.)] é considerado uma opção para a produção de forragem em regiões áridas e semiáridas em todo mundo. Isso se deve à sua baixa exigência hídrica, além de adaptação aos solos com baixo teor de matéria orgânica e média fertilidade (Dos Santos et al., 2016). Pelo fato de ser uma forrageira de clima tropical e ciclo curto (60 a 90), o seu potencial é promissor, pois possui capacidade de produzir 60 t matéria verde e 20 t matéria seca por hectare ano (Carvalho et al., 2018).

Contudo, esse potencial de produção do milheto nem sempre tem sido atingido pelos produtores nas regiões semiáridas do Brasil, devido aos longos períodos de estiagem e a irregularidade pluviométrica, afetando diretamente o desempenho das lavouras. Dessa forma, faz-se necessário utilizar estratégias para o rápido desenvolvimento da planta, e uma delas é a utilização de adubação nitrogenada, já que o nitrogênio possui papel fundamental no crescimento e desenvolvimento da cultura, sendo requerido em maiores quantidades.

As bactérias fixadoras de nitrogênio como o *Azospirillum brasilense* podem fornecer parte do N exigido pela cultura e aumentar sua produção. Além disso, podem sintetizar fitormônios que auxiliam no crescimento e desenvolvimento, com impactos positivos na produtividade (Hungria et al., 2010; Fukami et al., 2018). Portanto, a associação da fertilização nitrogenada juntamente com o *A. brasilense* pode promover mudanças significativas na morfologia e histologia da planta que afetam o conteúdo de proteína bruta, carboidratos estruturais, carboidratos solúveis, energia e outros nutrientes essenciais para a nutrição dos animais, podendo reduzir fertilizante nitrogenado a ser aplicado na cultura. A modificação dos teores de proteínas carboidratos e parede celular podem impactar diretamente na composição químico-bromatológica e digestibilidade do milheto.

Com base no exposto, objetivou-se por meio deste estudo determinar a dose do *Azospirillum brasilense* que proporcione maior produtividade e valor nutricional da planta inteira e da silagem de milheto, associado ou não com a adubação nitrogenada.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O Semiárido brasileiro

Em todo mundo, as regiões semiáridas atingem aproximadamente 20 milhões de km<sup>2</sup>, propagadas por 49 países dos cinco continentes. Sendo que existem três regiões caracterizadas pela semiaridez na América Latina, entre elas, o semiárido brasileiro. Sendo a região mais homogênea delas em se tratando do ponto de vista fisiográfico, ecológico e social. E possui a maior área de domínio de clima semiárido, em termos de extensão e de densidade demográfica (Ab'Sáber, 2003).

A delimitação do semiárido brasileiro abrange uma grande parte do país, correspondendo a 12% do território nacional. Recentemente, é composto por 1.262 municípios dos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe. Para enquadrar nos critérios do semiárido é necessário que a região tenha um índice de precipitação pluviométrica média anual igual ou inferior a 800 mm. Além disso, possuir um índice de Aridez de Thornthwaite igual ou inferior a 0,50 e, o percentual diário de déficit hídrico igual ou superior a 60%, considerando um clico anual. Esses critérios foram aprovados pelas Resoluções do Conselho Deliberativo da SUDENE de nº 107, de 27/07/2017 e de n. 115, de 23/11/2017 (SUDENE, 2018).

No Brasil, historicamente, a região do semiárido brasileiro é reconhecida pelo baixo índice pluviométrico e, principalmente, por obter má distribuição das chuvas no tempo e no espaço. Em vista disso, essa região está sujeita a frequentes ocorrências de secas, na qual, recentemente, ocorreu um baixo índice pluviométrico registrado entre os anos de 2012 a 2017 (Silva et al., 2017; Marengo et al., 2018).

Os solos da região semiárida são caracterizados por serem rasos, com pouca capacidade de retenção de água, elevada evaporação, e possuindo temperaturas altas (Nunes et al., 2016). A vegetação particular é a caatinga, correspondida por um regime de chuvas fortemente centralizado em quatro meses com uma variabilidade interanual grande. O índice anual é em torno de 286 a 800 mm (Giulietti et al., 2004).

Entretanto, esses fatos estão ligados diretamente à produção agropecuária, sendo, assim, responsável pelo sucesso, ou não, nas atividades da região. Devido às complicações

da região semiárida, devemos explorar forrageiras que se desenvolvam de forma eficiente e rápida, podendo introduzir tecnologias que aceleram o crescimento, aumentando a produção e a qualidade da forrageira.

## **2.2 Cultura do milheto**

O milheto é de origem das regiões semiáridas da África. Cultivado em todo mundo, seu grão é muito utilizado na alimentação humana na África e na Índia (Pires et al., 2007). No Brasil, o milheto é uma cultura com características versáteis se comparada a outras, por exemplo, à do milho. Dessa forma, o milheto pode ser utilizado para o pastejo, para produção de silagem (Guimarães Junior et al., 2005), e na produção de grãos para compor a dietas de animais. O milheto também pode ser usado com intuito de substituir parcial ou totalmente o grão de milho na alimentação de bovinos de corte (Gonçalves et al., 2010), e como planta de cobertura em sistema de plantio direto (Meschede et al., 2007).

O milheto possui uma importante característica que é sua tolerância ao déficit hídrico, isso advém do seu sistema radicular profundo, podendo atingir 3,60 metros de profundidade. A planta apresenta uma grande eficiência na utilização de água para a produção de matéria seca, necessitando de 282 a 302 Kg para produzir 1 kg de matéria seca, enquanto que o sorgo, o milho e o trigo necessitam de 321, 370 e 590 kg de H<sub>2</sub>O para produzir 1 kg de matéria seca (Amaral et al., 2008). A cultura é capaz de vegetar em regiões com precipitações pluviométricas inferiores a 400 mm anuais (Guimarães Junior et al., 2005).

A exploração da pecuária nas regiões semiáridas pode alcançar boa capacidade de produção de forragem, porém necessita de tecnologia, específica para a região. Da mesma forma, deve-se buscar forrageiras mais adaptadas ao semiárido, como o caso do milheto. Inúmeros fatores contribuem para a escolha certa da forrageira nessas regiões, dentre eles de baixa a média exigência na fertilidade do solo e da matéria orgânica, o déficit pluviométrico e a distribuição irregular ao longo do ano (Moreira et al., 2015).

Com base na escolha da forrageira para região semiárida, o milheto possui características favoráveis por apresentar alta tolerância à seca, baixa a média exigência em fertilidade dos solos, crescimento rápido e elevada produção de biomassa, sendo uma excelente alternativa para utilizá-la na produção de silagem (Pacheco et al., 2011). Devido a

essas peculiaridades, o milho proporciona uma boa opção para produção de silagem no semiárido brasileiro. Além disso, contribui, também, para melhoria da fertilidade do solo, visando a aumentar o aporte de matéria orgânica e nutrientes das camadas mais profundas para a superfície do solo, principalmente o potássio (Pacheco et al., 2011).

Tien et al. (1979) realizaram o primeiro estudo com o *Azospirillum brasilense* em relação à capacidade de produção de fitormônio da bactéria. Os autores trabalharam com o milho, e relataram aumento na produção de citocininas, mostrando aumento no crescimento da raiz da planta. Em estudo realizado por Bouton et al. (1985) utilizando *Azospirillum brasilense* e o milho, foi observado que a bactéria promoveu boa fixação de nitrogênio na planta. Com base nisto, o *Azospirillum brasilense* pode promover mudanças no crescimento e na qualidade químico-bromatológica do milho (*Pennisetum glaucum*), que é a gramínea utilizada neste trabalho.

### **2.3 Bactérias do gênero *Azospirillum***

O Brasil possui uma longa tradição em pesquisa com o gênero *Azospirillum*, sobre o qual se pode mencionar o trabalho pioneiro da Dra. Johanna Döbereiner (Döbereinere Day 1976; Döbereiner et al., 1976), visto que ela também é responsável por associar estudos das espécies de bactérias diazotróficas com gramíneas. O gênero *Azospirillum* inclui bactérias gram-negativas, que apresentam forma de bastonete uniflagelados, de vida livre e com boa motilidade no solo (Steenhoudt e Vandereyden, 2000).

Sobre o gênero *Azospirillum*, após a descoberta de sua capacidade de fixação do nitrogênio atmosférico, posteriormente enquadrado como bactérias diazotróficas, inúmeras pesquisas foram realizadas associando-as com gramíneas, com intuito de substituir os fertilizantes nitrogenados (Okon et al., 1983). Dentro das gramíneas mais pesquisadas, estão cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), milho (*Zeamays L.*), trigo (*Triticumaes-tivum L.*) e arroz (*Oryza sativa L.*), pastagens (*Urochloa*), entre outras (Fukami et al., 2018; Marks et al., 2015).

O *Azospirillum* pode ser associado à inúmeras espécies de vegetais em diversos graus de especificidade, recebendo a classificação como bactérias associativas, simbióticas ou endofíticas e sendo classificadas como Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCP) (Hungria et al., 2007). Dentre as bactérias utilizadas mundialmente para promoção de



crescimento vegetal em gramíneas, o gênero *Azospirillum* tem sido o mais estudado (Fukami et al., 2016).

Pesquisas com a inoculação do gênero *Azospirillum* têm sido estudadas e desenvolvidas desde 1996 pela Embrapa Soja juntamente com a Universidade Federal do Paraná. Nesses trabalhos foi possível selecionar estirpes de bactérias com melhor desempenho e capacidade de sobrevivência em condições de campos e uma interação bactérias/planta, que resultou em melhoria nas adaptações às tecnologias empregadas na produção das gramíneas. Esses inóculos, atualmente são produzidos por empresas produtoras das estirpes Ab-V5 e Ab-V6. De acordo com a legislação, esses inoculantes são comercializados em formas líquida ou turfosa, com uma exigência mínima de  $5 \times 10^8$  células mL<sup>-1</sup> ou g<sup>-1</sup>. Em se tratando de praticidade do produto, os agricultores têm preferência pela forma líquida pela maior facilidade de aplicação tanto via semente, foliar ou solo (Hungria et al., 2010).

Embora o benefício preeminente mais mencionado sobre o *Azospirillum* tenha sido sua capacidade de fixação do N<sub>2</sub>, o número de pesquisas crescentes apresenta outros atributos que implicam a promoção de crescimento das plantas. Uma peculiaridade relevante do *Azospirillum* baseia-se na síntese de fitormônios, tais como auxina (Spaepen & Vanderleyden, 2015), citocininas (Tien et al., 1979) e giberelinas (Bottini et al., 1989).

Contudo, das BPCP o gênero mais utilizado é o *Azospirillum*, sendo que o mais comercializado é o *A. brasilense* (Fukami et al., 2018). Embora o meio tradicional de realizar a inoculação da bactéria seja por tratamento em sementes, esse processo é também uma maneira de aplicação de fungicidas, inseticidas e micronutrientes que podem ser tóxicos para as bactérias e, conseqüentemente, pode acometer a efetividade da inoculação. Sobre isso há pouca informação disponível em relação à toxicidade desses produtos no tratamento de sementes em relação aos gêneros das BPCP (Müller et al., 2016). Perdomo et al. (2015), avaliando *in vitro* a influência de agroquímicos sobre o *Azospirillum brasilense*, relataram que há possíveis efeitos negativos sobre o metabolismo do microrganismo, tendo-se em vista da substância ativa e da sua concentração utilizada.

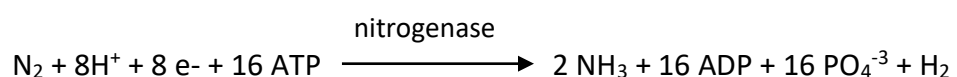
Fukami et al. (2016), com intuito de observar respostas sobre diferentes formas de aplicação do *Azospirillum brasilense*, trabalharam com quatro métodos diferentes de aplicação, sendo: inoculação na semente, inoculação no sulco do plantio na semeadura, inoculação por pulverização de folhas e inoculação por pulverização na superfície do solo. Os

autores relataram que a pulverização foliar obteve resultado satisfatório em relação aos demais, economizando 25% na aplicação de ureia, promovendo um aumento de 773 kg ha<sup>-1</sup> na produção de grão de milho. Diante disso, pode se esperar boa resposta neste trabalho, devido à forma de pulverização ser foliar.

#### 2.4 Benefícios proporcionados pelo gênero *Azospirillum*

Em referência à fixação biológica, o nitrogênio gasoso (N<sub>2</sub>) representa 78% dos gases atmosféricos, sendo que, qualquer planta ou animal existente, não consegue aproveitá-lo como nutriente, o que está relacionado à tripla ligação que advém de dois átomos de N, sendo uma das mais fortes existentes na natureza. Entretanto, o nitrogênio gasoso incorpora no espaço poroso do solo e alguns microrganismos (algumas arqueobactérias mas, principalmente, bactérias) que ali habitam, e conseguem utilizar o N<sub>2</sub>. Isso se deve à atuação da enzima chamada nitrogenase, que possibilita o rompimento da tripla ligação do N<sub>2</sub>, reduzindo-o a amônia (Hungria et al., 2007).

Hoje em dia, tem-se conhecimento de três tipos de enzimas nitrogenase: sendo uma que possui molibdênio (Mo, nitrogenase-1) e ferro (Fe); outra quem detém o vanádio (V) que substitui o Mo (nitrogenase-2); e uma terceira, que só porta o ferro (nitrogenase-3). O processo da fixação do nitrogênio atmosférico é representado pela seguinte equação (Reis & Teixeira, 2005):



São exemplos de bactérias endofíticas que efetuam a conversão do N<sub>2</sub> atmosférico em amônia: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Klebsiella* spp., *Azoarcusspp.*, *Azospirillum* spp. e *Azotobacter* spp. Todavia, ao inverso das bactérias simbióticas (*Rhizobium*), as bactérias associativas excretam parte do nitrogênio fixado para a planta. Seguidamente, a mineralização das bactérias pode colaborar como aporte complementar de nitrogênio para as plantas. É de suma importância salientar que o processo de fixação biológica por essas bactérias consegue suprir parcialmente as exigências nutricionais das plantas (Hungria, 2011).

Em um estudo desempenhado em três regiões diferentes no Brasil, utilizando áreas degradadas, autores testemunharam que a inoculação com o *Azospirillum brasilense* foi equivalente a uma adubação adicional de 40 kg de N por ha<sup>-1</sup> (Hungria et al., 2016). Entretanto, em uma revisão com dados compilados, o processo de fixação biológica do nitrogênio pode contribuir para planta em torno de 25 a 50 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de N (Moreira et al., 2010).

Os benefícios do *Azospirillum brasilense* no crescimento das plantas são atribuídos a diversos mecanismos únicos ou combinados, que operam de forma cumulativa ou em cascata. E a produção de secreção de fitormônios contribui diretamente para o crescimento e desenvolvimento do sistema radicular (Bashan e De-Bashan, 2010), proporcionando aumento na absorção de nutrientes e água (Ardakani et al., 2011).

O *Azospirillum* proporciona melhoria nas características da planta, tais como maior biomassa de raiz, ramificação da raiz e maior densidade de pelos radiculares, auxiliando na tolerância de déficit hídrico (Lopes et al., 2011; Marks et al., 2015) e promovendo melhor exploração da água no solo. O melhoramento da atividade radicular das plantas tem sido explicitado devido à ação de fitormônios sintetizados pela bactéria.

No milho, a inoculação do *Azospirillum brasilense* resultou em aumento no rendimento de grãos, que atingiram 27%, em comparação com tratamento controle sem inoculação (Hungria et al., 2010). Turan et al. (2012) evidenciaram a capacidade de solubilização de fósforo por algumas estirpes de *Azospirillum*, aumentando a disponibilidade de fósforo no solo e na produção de trigo.

Além do mais, estudos recentes sobre às BPCP têm evidenciado que os benefícios são mais estendidos. Algumas estirpes de *Azospirillum* podem proteger as plantas de estresses bióticos, desencadeando mecanismos de defesa como a Resistência Sistêmica Induzida, bem como a resistência das plantas contra patógenos e estresses abióticos, por meio da Tolerância Sistêmica Induzida. A inoculação das bactérias do gênero *Azospirillum* promove nas plantas mecanismos que auxiliam na desintoxicação do estresse oxidativo (Bashan e De-Bashan 2010; Fukami et al., 2018). O estudo de Curá et al. (2017), trabalhando com inoculação do *A. brasilense* em milho sob o efeito de estresse hídrico, evidenciou efeitos positivos na tolerância do milho.

Os mecanismos desencadeados pelo *Azospirillum brasilense* podem proporcionar mudanças na composição químico-bromatológica da planta. E o aumento dos nutrientes,

incluindo o nitrogênio, influencia no desenvolvimento das estruturas morfológicas e reprodutivas, bem como a proporção de caules, folhas e espigas/grãos. Salienta-se, ainda, que a assimilação de nutrientes também pode promover mudanças na histologia dos tecidos vegetais, como a deposição das células do mesófilo, parênquima, esclerênquima, entre outros tecidos (Wilson, 1993), que têm diferentes paredes celulares e concentrações de conteúdo celular. Dessa forma, o *A. brasilense* pode promover alterações morfológicas e histológicas que afetam o conteúdo de proteína bruta, carboidratos estruturais, carboidratos solúveis, energia e outros nutrientes essenciais para a nutrição dos ruminantes (Skonieski et al., 2017).

Na literatura não se encontra muitos trabalhos relacionando o *Azospirillum brasilense* com a composição químico-bromatológica. Skonieski et al. (2017), trabalhando com silagem de milho com níveis crescentes de adubação nitrogenada sem e com inoculação do *Azospirillum brasilense*, encontraram diferença na parede celular da planta, sendo que os tratamentos que receberam inoculação obtiveram menor teor da fibra em detergente ácido do que os tratamentos que não foram inoculados. Em vista disso, o teor dos nutrientes digestíveis totais foi superior para os tratamentos que receberam a inoculação do *Azospirillum brasilense*.

### 3. REFERÊNCIAS

- Ab' Sáber, A. 2003. Os domínios de natureza no Brasil: potencialidades paisagísticas. Ateliê Editorial, São Paulo.
- Amaral, P. N. C.; Evangelista, A. R.; Salvador, F. M.; Pinto, C. J. 2008. Qualidade e valor nutritivo da silagem de três cultivares de milho. *Ciência Agrotecnologia* 32:611-617. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542008000200041>
- Ardakani, M. R.; Mafakheri, S. 2011. Designing a sustainable agroecosystem for wheat (*Triticum aestivum* L.) production. *Journal of Applied Environmental Biological Sciences* 1:181-197.
- Bashan, Y.; De-Bashan, L. E. 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth a critical assessment. *Advances in Agronomy* 108:77-136. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)08002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8)
- Bottini, R.; Fulchieri M.; Pearce, D.; Pharis, R. P. 1989. Identification of Gibberellins A<sub>1</sub>, A<sub>3</sub>, and Iso-A<sub>3</sub> in Cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiol* 90:45-47. <https://doi.org/10.1104/pp.90.1.45>
- Bouton, J. H.; Albrecht S. L.; Zuberer, D. A. 1985. Screening and selection of pearl millet for root associated bacterial nitrogen fixation. *Field Crops Research* 11:131-140. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(85\)90097-8](https://doi.org/10.1016/0378-4290(85)90097-8)
- Carvalho, G. G. P.; Freitas, P. M. D.; Santos, E. M.; Araújo, G. G. L.; Oliveira, J. S.; Pires, A. J. V.; Maranhão, C. M. A.; Rodrigues, T. C. G. C.; Freitas Junior, J. E.; Rufino, L. M. A.; Rodrigues, C. S.; Leite, L. C.; Araújo, M. L. G. M. 2018. Effect of pearl millet silage ammoniated with urea on lamb production and metabolic performance. *Grass and Forage Science* 73:685-693. <https://doi.org/10.1111/gfs.12352>
- Curá, J. A.; Franz, D. R.; Filosofía, J. E.; Balestrasse, K. B.; Buragueño, L. E. 2017. Inoculation with *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum* spp. Bacteria Increases the Tolerance of Maize to Drought Stress. *Microorganisms* 5:1-16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030041>
- Döbereiner, J.; Marriel, I. E.; Nery, M. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Canadian Journal of Microbiology* 22:1464-1473. <https://doi.org/10.1139/m76-217>
- Döbereiner, J.; Day, J. M. 1976. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganism and dinitrogen-fixing sites. In: Newton W. E., Nyman, C. T. (Ed) *International*

Symposium on Nitrogen Fixation, vol. 2, Proceedings... Pullman, USA, Washington State University Press. 518-538.

Dos Santos, R. D.; Neves, A. L. A.; Pereira, L. G. R.; Sollenberger, L. E.; Rodrigues, J. A. S.; Tabosa, R. S.; Verneque, R. S.; Oliveira, G. F.; Jayme, D. G.; Gonçalves, L. C. 2016. Agronomic traits, ensilability and nutritive value of five pearl millet cultivars grown in a Brazilian semi-arid region. *Journal of Agricultural Science* 154:165-173. <https://10.1017/S0021859615000908>

Fukami, J.; Nogueira, M. A.; Araujo, R. S.; Hungria, M. 2016. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. *AMB Express* 6:1-13. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0171-y>

Fukami, J.; Cerezini, P.; Hungria, M.; 2018. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express*. 8(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>

Giulietti, A. M.; Bocage Neta, A. L.; Castro, A. A. J. F.; Gamarra-Rojas, C. F. L.; Sampaio, E. C. S. B.; Virgínio, J. F.; Queiroz, L. P.; Figueiredo, M. A.; Rodal, M. J. N.; Barbosa, M. R. V.; Harley, R. M. 2004. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma da caatinga. .47-90. In: Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. MMA - UFPE – Conservação Internacional - Biodiversitas - Embrapa Semi-árido, Brasília.

Gonçalves, J. R. S.; Pires, A. V.; Susin, I.; Lima, L. G.; Mendes, C. Q.; Ferreira, E. M. 2010. Substituição do grão de milho pelo grão de milheto em dietas contendo silagem de milho ou silagem de capim-elefante na alimentação de bovinos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39:2032-2039. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000900023>

Guimarães Júnior, R.; Gonçalves, L. C.; Rodrigues, J. A. S.; Jayme, D. G.; Pires, D. A. A.; Borges, A. L. C. C.; Rodriguez, N. M.; Saliba, E. O. S.; Borges, I. 2005. Matéria seca, proteína bruta, nitrogênio amoniacal e pH das silagens de três cultivares genótipo [*Pennisetum glaucum* (L). R. BR] em diferentes períodos de fermentação. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo* 4:251-258. <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v4n02p%25p>

Hungria, M.; Campo, R. J.; Mendes, I. C. 2007. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. p. 80. Documentos 283, Embrapa Soja, Londrina, Brasil.

Hungria, M., Campo, R. J., Souza, E. M., Pedrosa F.O. 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331:413-425. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>

Hungria, M. 2011. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. p. 36. Circular Técnica 325, Embrapa Soja, Londrina, Brasil.

Hungria, M.; Nogueira, M. A.; Araujo, R. S. 2016. Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 221:125-131. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.01.024>

Lopes, M. S.; Araus, J. L.; Van Heerden, P. D. R.; Foyer, C. H. 2011. Enhancing drought tolerance in C<sub>4</sub> crops. *Journal of Experimental Botany*, 62:3135-3153. <https://doi.org/10.1093/jxb/err105>

Marengo, J. A.; Alves, L. M.; Alvala, R. C. S.; Cunha, A. P.; Brito, S.; Moraes, O. L. L. 2018. Climatic characteristics of the 2010-2016 drought in the semiarid Northeast Brazil region. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90:1973-1985. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170206>

Marks, B. B.; Megías, M.; Ollero, F. J.; Nogueira, R. S. A.; Hungria, M. 2015. Maize growth promotion by inoculation with *Azospirillum brasilense* and metabolites of *Rhizobium tropici* enriched on lipo-chitooligosaccharides (LCOs). *AMB Express* 5:1-11. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0154-z>

Meschede, D. K.; Ferreira, A. B.; Ribeiro Jr., C. C. 2007. Avaliação diferentes cobertura na supressão de plantas daninhas no cerrado. *Planta Daninha* 25:465-471. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582007000300005>

Moreira, F. M. S.; Silva, K.; Nóbrega, R. S. A.; Carvalho, F. 2010. Bactéria diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae* 1:74-99.

Moreira, J. A. S.; Fagundes J. L.; Mistura, C.; Lemos, N. L. S.; Moreira, J. N.; Backes, A. A.; Morais, J. A. S.; Oliveira, V. S.; Moreira, A. L. 2015. Características morfogênicas, estruturais e produtivas e acessos de capim-buffel. *Semina: Ciência Agrárias* 36:391-400. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n1p391>

Müller, T. M.; Sandini, I. E.; Rodrigues, J. D.; Novakowiski, J. H.; Baso, S.; Kaminski, T. H. 2016. Combination of inoculation methods of *Azospirillum brasilense* with broadcasting of nitrogen

fertilizer increases crop yield. *Ciência Rural* 46:210-215. <https://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20131283>

Okon, Y.; Heytler, P. G.; Hardy, R. W. F. 1983. N<sub>2</sub> Fixation by *Azospirillum brasilense* and Its Incorporation into Host *Setaria itálica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(3), 694-697. <https://doi.org/10.1128/AEM.46.3.694-697.1983>

Pacheco, L. P.; Leandro, W. M.; Machado, P. L. O. A.; Assis, R. L.; Cobucci, T.; Madari, B. E.; Petter, F. A. 2011. Produção de fitomassa e acúmulo e liberação de nutrientes por plantas de cobertura na safrinha. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46:17-25. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2011000100003>

Perdomo, F. R.; Campos, P. J. C.; Rodríguez, A. J.; Rusinque, M. C.; Buitrago, R. R. B. 2015. Efecto de fertilizantes y herbicidas sobre el crecimiento *in vitro* de *Azospirillum brasilense* C16. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 35:117-120.

Pires, F. R.; Assis, R. L.; Silva, G. P.; Braz, A. J. B. P.; Santos, S. C.; Vieira Neto, S. A.; Sousa, P. G. 2007. Desempenho agrônomo de variedades de milho em razão da fenologia em pré-safra. *Bioscience Journal* 23:41-49.

Reis, V. M.; Teixeira, K. R. S. 2005. Fixação Biológica de Nitrogênio - Estado da Arte. P.151-180. In: *Processos biológicos no sistema solo-planta*. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, Brasil.

Silva, A. R.; Dos Santos, T. S.; Queiroz, D. E.; Gusmão, M. O.; Silva, T. G. F. 2017. Variação no índice de anomalia de chuva no semiárido. *Journal of Environmental Analysis and Progress* 2:377-384. <https://doi.org/10.24221/jeap.2.4.2017.1420.377-384>

Skonieski, F. R.; Viégas, J.; Martin, T. N.; Nörnberg, J. L.; Meinerz, G. R.; Tonin, T. J.; Bernhard, P.; Frata, M. T. 2017. Effect of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization rates on maize plant yield and silage quality. *Revista Brasileira de Zootecnia* 46:722-730. <https://doi.org/10.1590/s1806-92902017000900003>.

Spaepen, S.; Vanderleyden, J. 2015. Auxin Signaling in *Azospirillum brasilense*: A Proteome Analysis. p.937-940 In: de Bruijn F. J. (ed) *Biological Nitrogen Fixation*. John Wiley, Hoboken, USA. <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch91>

Steenhoudt, O.; Vandereyden, J. 2000. *Azospirillum*, free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews* 24:487-506. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00552.x>



Tien, T.; Gaskins, M.; Hubbell, D. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). Applied and Environmental Microbiology 37:1016-1024. <https://doi.org/10.1128/AEM.37.5.1016-1024.1979>

Turan M.; Gulluce M.; Von Wirén N.; Sahin F. 2012. Yield promotion and phosphorus solubilization by plant growth-promoting rhizobacteria in extensive wheat production in Turkey. Journal Plant Nutrition and Soil Science, 175:818–826. <https://doi.org/10.1002/jpln.201200054>

Wilson, J. R. 1993. Organization of forage plant tissues. p. 1-32. In: Forage cell wall structure and digestibility. American Society of Agronomy, Madison, USA. <https://doi.org/10.2134/1993.foragecellwall.c1>

#### **4. ARTIGO - Eficiência do *Azospirillum brasilense* associado à adubação nitrogenada sobre as características agronômicas do milho e valor nutricional de sua silagem**

Efficiency of *Azospirillum brasilense* associated with nitrogen fertilization on the agronomic characteristics of millet and nutritional value of its silage.

**RESUMO:** Objetivou-se determinar a dose de *Azospirillum brasilense* que proporcionasse maior produtividade e valor nutricional da planta inteira e da silagem de milho [*Pennisetum glaucum* (L. R. Br.)], associado ou não com a adubação nitrogenada. Utilizou-se o delineamento em blocos ao acaso em arranjo fatorial 4 x 2, sendo quatro doses de solução do *Azospirillum brasilense* (0, 10, 20, 30 litro ha<sup>-1</sup>), associadas ou não à adubação nitrogenada, com cinco repetições. Não houve interação entre os fatores, bactéria e nitrogênio para nenhuma das variáveis. A pulverização de 30 litros incrementou 6,80% na altura da planta, e 23,88% na produção de matéria seca quando comparado com aos tratamentos que não receberam a bactéria. A dose de 30 litros reduziu em 2,18% no teor de proteína bruta e 2,73% nos nutrientes digestíveis totais. Entretanto, a dose de 30 litros produziu 562,33 kg de proteína bruta e 2.898,16 por ha<sup>-1</sup> de nutrientes digestíveis totais a mais do que os tratamentos que não obtiveram a bactéria. A dose de 30 litros produz maior quantidade de matéria seca por ha<sup>-1</sup>, e reduz o valor nutricional, porém resulta em maior produção de proteína bruta e nutrientes digestíveis totais por hectare. O *Azospirillum brasilense* demonstra ser uma tecnologia sustentável e com boa produtividade, sendo que a aplicação da adubação nitrogenada não aumentou a produção de matéria seca por hectare.

**Palavra-chave:** Bactérias promotoras de crescimento de plantas, degradabilidade, *Pennisetum glaucum*

**ABSTRACT:** The objective was to determine the dose of *Azospirillum brasilense* that provides greater productivity and nutritional value of the whole plant and of millet silage [*Pennisetum glaucum* (L. R. Br.)], Associated or not with nitrogen fertilization. A randomized block design in a 4 x 2 factorial arrangement was used, with four doses of *Azospirillum brasilense* solution (0, 10, 20, 30-liter ha<sup>-1</sup>), associated or not with nitrogen fertilization, with five replications. There was no interaction between the factors, bacteria and nitrogen for any of the variables. The 30-liter dose reduced 2.18% in the crude protein content by and 2.73% in the total

digestible nutrients. However, the dose of 30 liters produced 562.33 kg of crude protein and 2,898.16 per ha<sup>-1</sup> of total digestible nutrients more than the treatments that did not obtain the bacteria. The dose of 30 liters produces a greater amount of dry matter per ha<sup>-1</sup>, and reduces the nutritional value, however it results in greater production of crude protein and total digestible nutrients per hectare. *Azospirillum brasilense* proves to be a sustainable technology with good productivity, and the application of nitrogen fertilization did not increase the production of dry matter per hectare.

**Key words:** Plant growth promoting bacteria, degradability, *Pennisetum glaucum*

#### 4.1 INTRODUÇÃO

A escolha da cultura a ser cultivada no semiárido é de grande importância, pois o déficit hídrico é um fator que pode limitar o potencial produtivo de culturas forrageiras de maior custo de produção, a exemplo do milho (*Zeamays* L.) e do sorgo (*Sorghum bicolor* L. moench) (Ramos et al., 2016; Rodrigues et al., 2019). Em vista disto, o milheto se destaca por apresentar características peculiares, como maior tolerância ao déficit hídrico, elevado potencial produtivo e bom valor nutricional, além de se adequar ao processo de ensilagem, o que possibilita a sua produção com competitividade em regiões semiáridas (Jahanzad et al., 2015).

Embora considerada uma cultura de maior rusticidade, o milheto, dentre seus aspectos produtivos, requer um adequado manejo cultural, bem como uma adubação equilibrada, notadamente relacionada à quantidade de nitrogênio aplicada no ciclo produtivo. A fertilização nitrogenada possibilita maior produtividade e qualidade nutricional no milheto (Jahanzad et al., 2014). No entanto, a fertilização a base de N, onera os custos de produção, principalmente quando não há um ajuste nutricional de doses de máxima eficiência física e econômica para a cultura. Além disso, há de se considerar as perdas de fertilizantes nitrogenados no sistema, que podem ocorrer por lixiviação, no caso dos nitratos, ou por volatilização, a exemplo da amônia.

Uma estratégia importante é o uso de microrganismos eficientes na agricultura, como o *Azospirillum brasilense*, que possui a capacidade de fixar nitrogênio e promover crescimento aos vegetais (Santos et al., 2019). E, devido à região semiárida possuir

irregularidade no período chuvoso, a aplicação de fertilizantes nitrogenados, como a ureia, pode provocar perdas por volatilização por falta de uma lâmina de água, e a bactéria auxilia na disponibilidade de nitrogênio para planta. Contudo, outro benefício do *A. brasilense* é sua capacidade de produzir fitormônios, proporcionando maior desenvolvimento do sistema radicular, com respostas na eficiência no uso da água e nutrientes (Choen et al., 2008; Shao et al., 2014).

O *Azospirillum brasilense* pode apresentar uma boa estratégia, promovendo aumento na produtividade e mudanças no valor nutricional da silagem do milho. Porém, em estudos realizados com a bactéria, os pesquisadores trabalharam com dose de 300 a 500 mL por kg de semente, e para pulverização foliar as doses variam entre 300 a 500 mL, com realização de uma calda e posteriormente feita a pulverização nas plantas. E, diferentemente deste estudo, propõem trabalhar com doses elevadas, com multiplicação das estirpes em biorreator. Esse método de pulverização foliar facilita quantidades maiores na aplicação do *Azospirillum brasilense*.

Com base no exposto, objetivou-se, por meio deste estudo, determinar a dose de *Azospirillum brasilense* que proporcione maior produtividade e valor nutricional da planta inteira e da silagem de milho, associado ou não com a adubação nitrogenada.

## **4.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1 Local**

O experimento foi realizado no período de dezembro de 2018 a março de 2019, na Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Montes Claros - UNIMONTES, Campus Janaúba, Minas Gerais, localizada nas coordenadas geográficas 15° 52' 38" Latitude Sul e 43° 20' 05" Longitude Oeste. A classificação do clima da região é do tipo Aw, com chuvas de verão e período de seca bem definidos no inverno. A precipitação anual média é de 876 mm, com temperatura anual média de 24 °C (Reboita et al., 2015). Os dados meteorológicos do período experimental foram registrados (Figura 1).

#### 4.2.2 Tratamentos e manejo experimental

Foram avaliadas doses de pulverização do *Azospirillum brasilense* (0, 10, 20, 30 litros da solução por hectare), na planta de milho, sem e com fertilização nitrogenada, o fertilizante utilizado foi a ureia convencional (45% N), com aplicação de 50 kg de N ha<sup>-1</sup>. O delineamento utilizado foi o em blocos ao acaso, em arranjo fatorial 4 x 2, com cinco repetições. As unidades experimentais possuíam uma área de 4 x 3 m, totalizando 12 m<sup>2</sup>, com espaçamento de 1 m entre as parcelas.

Utilizou-se o *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 concentração de 2 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. Foi preparada solução bacteriana obtida pelo processo de multiplicação massal em unidade controlada, denominada biorreator. Utilizou-se um meio de cultura específico e a bactéria adquirida comercialmente. Ao biorreator foi adicionado o meio de cultura junto com uma dose do *A. brasilense* com 0,1% da concentração do volume de bactéria do produto comercial, a condições de agitação e aeração ideal.

Antes da semeadura foi realizada a análise do solo na camada de 0 a 20 cm, que apresentou as seguintes características físico-químicas: argila = 29,4%; silte = 6,8%; areia = 63,8%; pH em água = 5,03; capacidade de troca catiônica (T) = 5,63 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; capacidade de troca efetiva (t) = 2,91 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> Ca = 1,96 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Mg = 0,49 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; K = 100 mg dm<sup>-3</sup>; P = 5,20 mg dm<sup>-3</sup>; Al = 0,20 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; H+Al = 2,93 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; SB = 2,71 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; m% = 6,88; V% = 48,02; matéria orgânica = 1,24 dag/kg. Para a correção da acidez do solo foi realizada uma calagem com a aplicação do GEOX<sup>®</sup>, produto da Gecal, Pains - Minas Gerais, Brasil. O produto contém 60% de óxido de cálcio e 30% de óxido de magnésio, com um poder relativo de neutralização total de 180%. A quantidade aplicada foi calculada para atingir uma saturação de bases de 60%. A adubação básica, aplicada na semeadura, para todos os tratamentos, constituiu-se de 100 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> do adubo superfosfato simples. A aplicação da calagem e da adubação básica foi de acordo com a recomendação de Sousa e Lobato (2004).

Utilizou-se o híbrido forrageiro de milho ADRf 6010<sup>®</sup>, pertencente a ATTO Sementes Adriana<sup>®</sup>, Rondonópolis - Mato Grosso, Brasil. O híbrido foi semeado manualmente, em profundidade de 0,03 m, observando um espaçamento entre linhas de 0,80 m, e taxa de semente de 12 kg ha<sup>-1</sup> de acordo com a recomendação do fabricante. A adubação nitrogenada foi realizada, aos 35 dias após a semeadura, com aplicação única e

realizada a lanço. Após a aplicação do fertilizante a cultura recebeu uma lâmina de água, para amenizar as perdas por volatilização.

A pulverização do *Azospirillum brasilense* foi feita após quatro dias da fertilização nitrogenada, com objetivo de não interferir com o adubo nitrogenado, sendo as doses da solução diluídas em água para volume de 200 litros ha<sup>-1</sup> de calda e, com auxílio de um atomizador foi realizada a pulverização foliar até observar o escorrimento da planta. A cultura recebeu irrigação por microaspersão em malha durante o período experimental, a fim de suprir a falta de chuva no início do experimento (Figura 1).

A colheita foi realizada aos 90 dias após a emergência das plantas. Avaliaram-se as seguintes características agronômicas: produção de matéria seca por hectare (mensurada por peso da amostra, sendo coletadas em três pontos lineares representativos dentro da parcela, e determinados em produção por metro linear), a altura de plantas (mensuradas da superfície do solo até ápice da panícula), diâmetro do colmo (com auxílio de um paquímetro), e o tamanho da panícula (medida da base da panícula até o seu ápice). O corte da forrageira foi realizado manualmente, rente ao solo e, logo após, o material foi picado em um galpão com máquina acoplada em um motor elétrico. Foi utilizada uma máquina ensiladeira JF 40 Maxxium, regulada para a obtenção do tamanho de partículas de 1-2 cm, com intuito de promover uma boa compactação do material.

No processo de ensilagem, foram utilizados silos experimentais de Polyvinyl chloride (PVC), de pesos conhecidos, com 50 cm de comprimento e 10 cm de diâmetro. Na base foram colocados reservatórios para efluentes. Cada reservatório possuía 500 g de areia seca, separado da forragem por tecidos e espuma. A amostra homogenizada, foi depositada nos silos e compactada com auxílio de um êmbolo de madeira.

Em cada tratamento foram ensilados aproximadamente  $2,322 \pm 0,207$  kg do material triturado da forragem fresca, com aplicação de uma massa específica em torno de 600 kg/m<sup>3</sup> por silo conforme a recomendação de (Ruppel et al., 1995). Logo após o preenchimento, os silos foram fechados com tampas de PVC dotadas com válvula tipo “bunsen”, e selados com fita adesiva, e foi feita a pesagem dos silos. Após, os silos foram armazenados à temperatura ambiente, e abertos após 60 dias do fechamento.

### 4.2.3 Perdas, e pH da silagem

Para as análises de pH foram coletadas subamostras de 9 g e adicionados 60 mL de água destilada e, após repouso por 30 minutos, realizou a leitura de pH, utilizando um potenciômetro (Akso®) conforme descrito por (Silva e Queiroz, 2002).

A determinação da perda de matéria seca nas silagens sob a forma de gás e de efluentes foi mensurada por diferença de peso, utilizando as equações descritas por Jobim et al. (2007). Para as perdas por efluentes:  $E = [(Pab - Pen) / (MVfe)] \times 1000$ , onde: E: produção de efluentes (kg/toneladas de massa verde); Pab: peso do conjunto (balde + tampa + areia úmida + pano + espuma) na abertura (kg); Pen: peso do conjunto (balde + tampa + areia seca + pano + espuma) na ensilagem (kg); MVfe: massa verde de forragem ensilada (kg).

A perda de matéria seca por gás foi calculada pela diferença entre o peso bruto da matéria seca ensilada no início do experimento, em relação à quantidade de matéria seca ensilada, descontado o peso do conjunto silo e areia seca, de acordo com a equação:  $G = \{[(PCen - Pen) \times Msen] - [(Pcab - Pen) \times 100 / [(PCen - Pen) \times MSen]]\} \times 100$  onde: G = perdas por gases em % da MS; PCen = Peso do silo cheio na ensilagem (kg); Pen = Peso do conjunto (silo + tampo + areia + pano + espuma) na ensilagem (kg); MSen = Teor de MS da forragem na ensilagem (%); PCab = Peso do silo cheio na abertura (kg); MSab teor de MS da forragem na abertura (%).

### 4.2.4 Composição químico-bromatológica

As amostras da planta inteira e da silagem foram analisadas quanto ao teor de matéria seca (MS; INCT-CA G-003/1), proteína bruta (PB, INCT-CA M-001/1), cinzas (MM, INCT-CA N-001/1), fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteínas (FDNcp; INCT-CA F-002/1), fibra em detergente ácido (FDA), lignina (INCT-CA F-002/1), carboidratos não fibrosos (CNF) estimados pela seguinte equação CNF:  $100 - (PB + \text{Extrato Etéreo} + \text{Cinzas} + \text{FDNcp})$ , e a fração "a" dos compostos nitrogenados de acordo com Detmann et al. (2012). Os carboidratos totais (CT) foram obtidos utilizando a seguinte equação  $CT = 100 - (PB\% + \text{Cinzas}\% + \text{Extrato Etéreo}\%)$ , de acordo com a metodologia descrita por Sniffen et al. (1992), e os nutrientes digestíveis totais (NDT) conforme equações propostas por Weiss (1998).

#### 4.2.5 Degradabilidade *in situ*

Para as variáveis de degradabilidade *in situ*, utilizou-se o delineamento em blocos casualizados, em esquema de parcela subdivididas, com oito tratamentos sendo 0, 10, 20, 30 doses L ha<sup>-1</sup>, sem e com adubação nitrogenada (parcelas), dez tempos de incubação (0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 e 144) (subparcelas) e quatro blocos (novilhos); os diferentes pesos dos animais foram o fator de blocagem. Utilizou-se quatro novilhos canulados no rúmen, mestiços, com peso médio de 500 ± 65 kg. Os animais receberam 3,0 kg de concentrado, dividido em duas porções iguais (manhã e à tarde), além de dietas à base de silagem de milho. A técnica de degradabilidade *in situ* foi realizada utilizando sacos de tecido com aproximadamente 60 µm, de acordo como descrito por Casali et al. (2009). O peso das amostras foi determinado a partir da razão de 20 mg de MS cm<sup>-2</sup> de superfície do saco (Nocek, 1988).

Os sacos contendo as amostras foram colocados em sacos de filó de 20 x 30 cm, juntamente com pesos de chumbo de 100 g. Os sacos de filó foram amarrados com fio de nylon, deixando um comprimento de 1 m para que os sacos pudessem se mover livremente nas fases sólida e líquida do rúmen. Os sacos de filó foram então depositados na região do saco ventral do rúmen, com a extremidade do fio de nylon presa à cânula nos tempos de 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96; 120 e 144 horas em ordem inversa decrescente, começando com a duração de 144 horas. Os sacos relacionados ao tempo zero não foram incubados no rúmen, e foram lavados em água corrente para extrair a fração solúvel das amostras. Posteriormente, as amostras foram colocadas em estufas a 55 °C por 72 horas e, em seguida, resfriadas em dessecador e pesadas. A porcentagem de degradação foi calculada pela diferença de peso remanescente nos sacos após a incubação ruminal. E a FDN foi analisada de acordo com os métodos descrito por Detmann et al. (2012) sem o uso de α-amilase.

Os dados obtidos foram ajustados para uma regressão não-linear pelo método de Gauss-Newton (Neter et al., 1985), utilizando o software SAS (SAS Institute, Inc., Cary, NC, EUA), de acordo com a equação proposta por Ørskov e McDonald, (1979):  $Y = a + b(1 - e^{-ct})$ , onde Y = degradação cumulativa do componente nutricional analisada após o tempo t; a = a degradação intercepta quando t = 0, que corresponde à fração solúvel em água do componente nutriente analisado; b = potencial de degradação da fração insolúvel em água



do componente nutriente analisado;  $a + b$  = degradação do componente nutricional analisado quando o tempo não é um fator limitante;  $c$  = taxa de degradação por ação fermentativa de  $b$ ; e  $t$  = tempo de incubação. Uma vez calculados, os coeficientes  $a$ ,  $b$  e  $c$  foram aplicados à equação proposta por Ørskov e McDonald, (1979):  $DE = a + (b+c/c+k)$ , onde  $DE$  = degradabilidade efetiva do componente nutricional, e  $k$  = taxa de passagem do alimento. A taxa de passagem de partículas pelo rúmen foi estimada em  $5\%/h^{-1}$ , conforme sugerido pelo AFRC (1993). O valor do desaparecimento verificado no tempo zero (" $a$ ") foi usado para estimar o tempo de colonização (TC) para a MS e a FDN, de acordo com Goes et al., (2017), onde os parâmetros " $a$ ", " $b$ " e " $c$ " foram avaliados pelos algoritmo de Gauss-Newton:  $TC = [-\ln(a'-a-b)/c]$ .

A degradabilidade da FDN foi estimada usando o modelo de Mertens e Loftén, (1980):  $R_t = B \times e^{-ct} + I$ , onde  $R_t$  = a fração degradada no tempo  $t$ ,  $B$  = a fração insolúvel potencialmente degradável; e  $I$  = fração indigestível. Posteriormente, a equação de degradação da FDN foi padronizada conforme proposto por Waldo et al., (1972) usando as equações:  $B_p = B / (B+I) \times 100$  e  $I_p = I / (B+I) \times 100$ , onde  $B_p$  = a fração potencialmente degradável padronizada (%);  $I_p$  = fração indigesta padronizada (%);  $B$  = a fração insolúvel potencialmente degradável; e  $I$  = a fração indigestível. A degradabilidade efetiva do FDN foi calculada usando o modelo  $DE = B_p \times c / (c+k)$ , onde  $B_p$  é a fração potencialmente degradável padronizada (%).

#### 4.2.6 Análises Estatísticas

Os dados das características agrônômicas e da composição químico-bromatológica foram submetidos à análise de variância, considerando como fontes de variação, doses da solução contendo a bactéria, adubação nitrogenada e a interação doses e adubação, testados a 5% de probabilidade. A interação foi desdobrada, ou não, de acordo com a significância, e o efeito das doses da bactéria foram avaliadas por análise de regressão, por meio de polinômios ortogonais, pela decomposição da soma de quadrado da bactéria em efeito linear e quadrático. Já a variação da adubação nitrogenada foram comparados pelo teste F. O modelo estatístico adotado para as análises foi o seguinte:  $Y_{ijk} = \mu + \delta_k + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$ , em que  $Y_{ijk}$  = é a observação da variável dependente em  $ijk$ ;  $\mu$  = é a média de todas as parcelas para a variável em estudo;  $\delta_k$  = é o efeito do bloco  $k$ , ( $k = 1, 2, 3, 4, 5$ );  $\alpha_i$  =

é o efeito das doses da bactéria  $i$ , ( $i = 0, 10, 20, 30$ );  $\beta_j$  = é o efeito da adubação nitrogenada  $j$ , ( $j = \text{sem e com}$ );  $(\alpha\beta)_{ij}$  = é o efeito da interação da bactéria  $i$ , e adubação nitrogenada  $j$ ;  $\varepsilon_{ijk}$  = é o erro aleatório associado a cada observação, com probabilidade de 5%.

Os dados da degradabilidade *in situ* foram submetidos à análise de variância e as análises de regressão foram realizadas com o procedimento Proc MIXED e REG do SAS, versão 9.0 (SAS Institute, Cary, NC, EUA), conforme o modelo:  $Y_{ijk} = \mu + R_k + \alpha_i + \delta_{(i)k} + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$ , onde:  $Y_{ijk}$  = é a observação da variável dependente em  $ijk$ ;  $\mu$  = é a média de todas as parcelas para a variável em estudo;  $R_k$  = é o efeito bloco  $k$ , ( $k = 1; 2; 3; 4$ );  $\alpha_i$  = é o efeito do tratamento aplicado a parcela  $i$ , com  $i = (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)$ ;  $\delta_{(i)k}$  = e o erro da parcela que recebeu o nível  $i$  da parcela na repetição  $k$ , é o erro da parcela;  $\beta_j$  = e o efeito da subparcela no valor observado  $j$ , ( $j = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ );  $(\alpha\beta)_{ij}$  = é o efeito da interação entre parcela e a subparcela;  $\varepsilon_{ijk}$  = é o erro associado à observação, é o erro da subparcela. As doses da solução da bactéria foram realizadas pela soma dos quadrados em contrastes ortogonais, em efeito linear e quadrático. E para adubação nitrogenada foi comparada pelo teste F, com significância de 5%.

### 4.3 RESULTADOS

Não houve interação entre os fatores bactéria e nitrogênio para nenhuma das variáveis analisadas, portanto, os fatores serão apresentados isoladamente. Considerando a altura de planta, houve efeito linear ( $p < 0,05$ ) com o uso da bactéria, sendo que para cada litro aplicado do *Azospirillum brasilense* incrementou em 0,0074 m, obtendo incremento na altura de 6,80% em relação aos tratamentos que não receberam a pulverização. Já a fertilização nitrogenada foi significativa ( $p < 0,05$ ), obtendo acréscimo de 4,95% com a aplicação do fertilizante nitrogenado (Tabela 1). O diâmetro de colmo foi explicado por efeito quadrático ( $p < 0,05$ ), no qual a bactéria apresentou eficiência máxima com a dose de 16,12 litros por  $\text{ha}^{-1}$ , atingindo um diâmetro de colmo de 13,64 mm, incrementando 7,94% superior comparado à não pulverização do *A. brasilense*.

A produção de matéria seca aumentou ( $p < 0,05$ ) de forma linear com a pulverização da bactéria, sendo que, para cada litro, adicionado houve incremento de 198 kg por  $\text{ha}^{-1}$ , promovendo um acréscimo de 23,88% quando comparado com os tratamentos que não foram pulverizados. Observou-se uma equação linear decrescente ( $p < 0,05$ ) para a proteína

bruta em relação à bactéria, sendo que houve um decréscimo de 0,0076% para cada litro adicionado, no qual proporcionou uma redução na PB de 2,18% quando comparado à aplicação da dose de 30 litros do *A. brasilense* (Tabela 2). Entretanto, as outras variáveis químico-bromatológicas da planta inteira não obtiveram significância para nenhum dos fatores estudados.

As doses da pulverização influenciaram a Fração “a” da cinética ruminal da MS da planta inteira de forma linear decrescente ( $p < 0,05$ ), uma vez que, para cada litro aplicado da bactéria, diminuiu 0,042%, sendo que houve uma redução de 4,78% na Fração “a” para a dose de 30 litros em comparação com os tratamentos sem a pulverização (Tabela 3). Não houve influência sobre os outros parâmetros estudados na cinética ruminal da MS da planta inteira.

As doses da pulverização influenciaram a cinética ruminal da fração fibrosa da planta inteira de forma linear negativa as variáveis Bp e TC ( $p < 0,05$ ), com decréscimo na Bp de 0,1387%, e, para cada litro incorporado, a partir desse valor, houve redução para a dose de 30 litros de 7,04% em comparação aos tratamentos sem a bactéria. E o TC reduziu 0,1519% em cada litro aplicado. A dose de 30 litros da bactéria foi 30,96% inferior aos tratamentos que não foram pulverizados (Tabela 4).

As variáveis taxa de degradação “c”, DE e FI da fração fibrosa da planta inteira responderam a uma linear crescente ( $p < 0,05$ ), sendo que para cada litro adicionado da bactéria proporcionou aumento de 0,023; 0,10 e 0,138% (Tabela 4). A dose de 30 litros da bactéria foi superior em 29,89, 17,09 e 9,23% quando comparado aos tratamentos com a dose sem a pulverização. Não houve efeito para as perdas e pH da silagem de milho ( $p = 0,05$ ), para nenhum dos fatores estudados (Tabela 5).

Em relação à composição químico-bromatológica da silagem, houve resposta quadrática ( $p < 0,05$ ) à pulverização para FaPB, onde o ponto de mínimo foi estimado para a dose de 15,89 L ha<sup>-1</sup>, atingindo o valor de 29,29% para FaPB, no qual promoveu decréscimo de 23,03% em relação aos tratamentos que não houve a pulverização do *A. brasilense*, que obteve 38,05% (Tabela 6). A fertilização nitrogenada foi significativa ( $p < 0,05$ ) para as variáveis FDN e FDA, no qual ocorreu aumento de 1,98, 3,07% para as plantas que receberam a adubação nitrogenada, respectivamente (Tabela 6).

Para a FDA houve efeito linear crescente ( $p < 0,05$ ), sendo que para cada litro adicionado do *A. brasilense* houve aumento de 0,083%, proporcionando acréscimo total de

4,83% em relação à não pulverização da bactéria (Tabela 6). Para cada litro acrescentado da bactéria houve acréscimo de 0,057% ( $p < 0,05$ ) para a LIG, visto que, com a inoculação da dose de 30 litros, houve acréscimo de 16,18% em comparação aos tratamentos em que não houve a pulverização da bactéria.

A respeito dos CNF, conforme a adição das doses, houve um decréscimo 0,087% ( $p < 0,05$ ) para cada litro pulverizado, dado que houve redução de 28,37% na dose máxima em comparação à não pulverização (Tabela 6). Os NDT diminuíram ( $p < 0,05$ ) de forma linear com o aumento da pulverização da bactéria, visto que, cada litro adicionado da bactéria, reduziu 0,04% nos NDT, proporcionando um decréscimo de 2,73% em relação aos tratamentos que não receberam o *Azospirillum brasilense*. Referente às variáveis da cinética ruminal da matéria seca da silagem, não houve significância para nenhum dos fatores estudados (Tabela 7).

A Bp da fração fibrosa da cinética ruminal reduziu ( $p < 0,05$ ) de forma linear com o acréscimo da pulverização da bactéria, sendo que, para cada litro adicionado da bactéria, houve um decréscimo de 0,136%, reduzindo 6,91% em relação aos tratamentos que não receberam inoculação (Tabela 8). Houve efeito linear crescente ( $p < 0,05$ ) para taxa de degradação “c”, no qual ocorreu um aumento na taxa de degradação de 26,67% em relação aos tratamentos sem o *A. brasilense*.

Houve um efeito linear ( $p < 0,05$ ) para as variáveis DE e FI, sendo que cada litro adicionado do *Azospirillum* acrescentou 0,086 e 0,136%, proporcionando um incremento de 15,15 e 9,08% em relação aos tratamentos sem bactéria. Já o TC respondeu sobre uma linear decrescente ( $p < 0,05$ ), visto que, para cada litro aplicado da bactéria, houve 0,139%. Contudo, resultou em uma redução de 28,06% em relação aos tratamentos que não receberam a pulverização.

#### **4.4 DISCUSSÃO**

Os estudos sobre os benefícios de bactérias promotoras de crescimento de plantas associado às culturas se justificam por ser prática sustentável em relação à aplicação de fertilizantes químicos (Maliniche Bauer, 2018; Leite et al., 2019). Neste estudo, a produção de matéria seca e a altura de planta foram influenciadas pela pulverização do *Azospirillum brasilense*, na qual houve incremento de 5.940 kg ha<sup>-1</sup> na PMS, e aumento de 22 cm na

altura de planta para a dose de 30 litros da bactéria em relação aos tratamentos que não receberam a pulverização.

Esses resultados podem ser atribuídos não somente pela capacidade de fixação do nitrogênio atmosférico, mas também à produção de fitormônios. Estes, por sua vez, propiciam aumento no comprimento e na densidade de raízes, e aumento da superfície de contato radicular com solo, permitindo melhor absorção dos nutrientes e de água, promovendo um aumento na produção de biomassa (Hungria et al., 2010; Ardakani e Mafakheri, 2011).

Os hormônios de crescimento produzidos pela bactéria (auxinas, giberelinas e seus precursores) aumentam o crescimento das plantas, devido a essas substâncias serem responsáveis por vários processos fisiológicos relacionados ao crescimento vegetal (Fukami et al., 2017). A atuação da giberelina e da auxina pode modificar a expansão celular, ocasionando em alongamento da parte aérea da planta (Taiz e Zeiger, 2013).

A altura de planta adubada cresceu 16 cm em comparação aos tratamentos sem fertilização nitrogenada. Entretanto a fertilização nitrogenada com 50 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio não influenciou em maior PMS. Uma justificativa sobre a adubação nitrogenada não ter promovido incremento na produção se deve às perdas por volatilização e lixiviação do nitrogênio. Já a dose de 16,12 litros incrementou 1,08 mm no DC em relação aos tratamentos sem inoculação, sendo que esta variável faz referência à capacidade da planta em acumular nutrientes e fotoassimilados que auxiliam no enchimento dos grãos (Kappes et al., 2013).

O teor de MS da planta inteira é uma característica muito importante para a ensilagem. Essa variável deve apresentar valor entre 25 e 35% para proporcionar boa fermentação (Kung et al., 2018). Contudo, somente os tratamentos com 20 e 30 L atingiram o valor mínimo preconizado. Isso indica que tais tratamentos resultaram em plantas mais maduras e com maior teor de MS.

Apesar do baixo teor de matéria seca, todos tratamentos apresentaram valor de pH inferior ao preconizado por Kung et al. (2018) para gramíneas forrageiras (pH entre 4,3 e 4,7). Isso indica que o teor de matéria seca não influenciou diretamente na fermentação.

O teor de PB da planta inteira foi de 10,43% para os tratamentos sem a inoculação da bactéria, e para os tratamentos com a dose de 30 litros foi 10,20%. Esse decréscimo pode ser explicado por efeito de diluição, visto que a dose de 30 litros aumentou a altura da

planta e a PMS, proporcionando uma diluição do nitrogênio na planta inteira, o que promove decréscimo na proteína bruta (Monção et al., 2019). Ressalta-se que a aplicação da dose 30 litros aumentou a PMS (24.876,0 kg por ha<sup>-1</sup>), com 2537,35 kg por ha<sup>-1</sup> de PB a mais que tratamentos sem aplicação do *A. brasilense* que produziram somente (18.936,0 kg por ha<sup>-1</sup>), resultando em apenas 1.975,02 kg ha<sup>-1</sup> de PB. Esse fato evidencia aumento considerável na produção de PB por ha<sup>-1</sup>.

A fração “a” da MS da planta inteira reduziu linearmente, resultando em 26,36% para o tratamento sem pulverização e 25,10% para a dose de 30 litros. Essa redução também pode ser explicada pelo aumento da altura da planta, pois a fração “a” da planta corresponde ao conteúdo intracelular, que inclui frações mais solúveis da proteína. À medida que a planta aumenta em altura e avança seu estágio fisiológico, esses componentes são alocados na parede celular da planta (Van Soest, 1994; Wilson, 1994).

ABp da parte fibrosa da planta inteira reduziu conforme aumento da dose do *Azospirillum*, sendo 59,07% para os tratamentos sem bactéria, e 54,91% para a dose de 30 litros. Esse comportamento se justifica pelo aumento da PMS e à altura, resultando em maior proporção de tecidos estruturais para suporte da planta, como parede celular secundária, associado ao processo de lignificação. Isso diminui a degradabilidade potencial da fração “b” (Van Soest, 1994; Zailan et al., 2016).

Comparando os tratamentos sem inoculação para a pulverização de 30 litros em relação à parte fibrosa da planta, houve uma redução para o tempo de colonização de 4,56 horas para a dose de 30 litros, promovendo uma taxa de degradação de 0,71 horas superior aos tratamentos que não receberam inoculação. A DE foi superior em 17,09% (k = 5% horas) para os tratamentos com a dose de 30 litros em relação aos tratamentos não inoculados, demonstrando que a fração fibrosa ficou mais disponível para a microbiota ruminal, promovendo aumento da degradabilidade ruminal da parte fibrosa do milho.

Sobre a composição químico-bromatológica da silagem a FaPB foi de 38,06% para os tratamentos que não receberam, já a dose de 30 litros foi de 36,21% de FaPB, proporcionando decréscimo de 4,85%. Esse resultado pode estar associado à migração dos compostos nitrogenados do conteúdo celular para parede celular com o aumento da altura da planta e maturidade fisiológica. A adubação nitrogenada promoveu aumento nas FDN e FDA, que pode ser explicado devido o efeito da adubação nitrogenada na maturidade das plantas.

O aumento linear da FDA e da LIG justifica-se pelo incremento da PMS e aumento da altura da planta, sendo que, com o avanço da maturidade dos tecidos vegetais, aumenta a concentração de fibra e lignina em detrimento do conteúdo celular (Wilson, 1994; Van Soest, 1994). Entretanto, teor de lignina e seu arranjo estrutural com os outros componentes da parede celular, formando ligação do tipo éster juntamente com a hemicelulose, influencia diretamente no valor nutricional e na digestibilidade da forragem, (Jung e Deetz, 1993).

Entretanto, a lignina é um componente indigestível pela microbiota do rúmen, devido a três fatores limitantes. São eles: a toxicidade pela liberação de ácido cumárico durante a digestão da parede celular, barreira física causada pela ligação lignina-polissacarídeo limitando o acesso das enzimas fibrolíticas, e pela ação hidrofóbica resultante dos polímeros de lignina limitando o processo enzimático (Jung, Deetz, 1993).

Com o aumento da dose da bactéria, houve decréscimo de 9,23% nos carboidratos não fibrosos para 6,61% nos CNF dos tratamentos com 0 e 30 L, respectivamente. Essa redução no teor dos CNF afetou a fração “a” de MS e, conseqüentemente, a degradabilidade potencial da forragem. Os NDT, responsável pela energia da forragem, reduziu de 44,88% para 43,65 % em comparação com os tratamentos 0 e 30 litros. Há de ressaltar que os tratamentos que não receberam a inoculação produziram somente 8.265,94 kg de NDT por ha<sup>-1</sup>, enquanto os tratamentos que receberam 30 litros produziram 11.164,10 kg de NDT por ha<sup>-1</sup>, fornecendo uma produção de 2.898,16 kg de NDT por ha<sup>-1</sup> a mais do que os tratamentos sem inoculação.

ABp da fração fibrosa da silagem reduziu de 59,10 para 55,02 em comparação aos tratamentos 0 a 30 litros, efeito ocorrido devido ao acúmulo de carboidratos estruturais na parede celular da planta. Houve uma redução no tempo de colonização de 4,17 horas para a dose de 30 litros em relação aos tratamentos que receberam a pulverização da bactéria. Esse fato melhora a taxa de degradação da parte fibrosa em 26,67%, e reflete diretamente na degradabilidade efetiva que foi 15,5% superior.

Os resultados da cinética ruminal da parte fibrosa da planta inteira e da silagem demonstraram que, com aumento da dose do *Azospirillum*, houve melhor aproveitamento na digestibilidade da parede celular da forragem. O *Azospirillum brasilense* também demonstrou que há a possibilidade de empregar tecnologia sustentável e com grande capacidade de produção de PB e NDT por ha<sup>-1</sup> sem a necessidade de fertilização nitrogenada

de 50 kg N por ha<sup>-1</sup>, visto que, quanto maior quantidade produzida de PB e NDT por ha<sup>-1</sup>, maior será a produção de leite ou carne por hectare.

#### **4.5 CONCLUSÃO**

A solução de 30 litros do *Azospirillum brasilense* produz maior quantidade de matéria seca por hectare.

A solução de 30 litros do *Azospirillum brasilense* reduz o valor nutricional do milho, entretanto aumenta a produção de proteína bruta e nutrientes digestíveis totais por hectare.

O *Azospirillum brasilense* demonstra que há a possibilidade de empregar tecnologia sustentável e com boa produtividade, sendo que a aplicação da adubação nitrogenada não aumentou a produção de matéria seca por hectare.

#### **4.6 AGRADECIMENTO**

Agradecimento à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001 pelo financiamento parcial deste estudo.

Agradecimento à empresa BIOMULTI pela parceria.

#### **4.7 REFERÊNCIAS**

Agricultural and Food Research Council - AFRC. 1993. Energy and protein requirements of ruminants. CAB International, Wallingford, Inglaterra.

Ardakani, M.; Mafakheri, S. 2011. Designing a sustainable agroecosystem for wheat (*Triticum aestivum* L.) production. Journal of Applied Environmental and Biological Sciences 1:401-403.

Casali, A. O.; Detmann, E.; Valadares Filho, S. C.; Pereira, J. C.; Cunha, M.; Detmann, K. S. C.; Paulino, M. F. 2009. Estimação de teores de componentes fibrosos em alimentos para ruminantes em saco de diferentes tecidos. Revista Brasileira de Zootecnia 38:130-138. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982009000100017>



Cohen A. C.; Bottini, R.; Piccoli, P. N. 2007. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. *Plant Growth Regulation* 54:97-103. <https://doi.org/10.1007/s10725-007-9232-9>

Detmann, E.; Souza, M. A.; Valadares Filho, S. C.; Queiroz, A. C.; Berchielli, T. T.; Saliba, E. O. S.; Cabral, L.S; Pina, D. S.; Ladeira, M. M.; Azevedo, J. A. G. 2012. Métodos para análise de alimentos. Suprema, Visconde do Rio Branco, Brasil.

Fukami, J.; Ollero, F. J.; Megías, M.; Hungria, M. 2017. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. *AMB Express* 7:1-14. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0453-7>.

Goes, R. H. T. B.; Patussi, R. A.; Gandra, J. R.; Branco, A. F.; Cardoso, T. J. L.; Oliveira, M. V. M.; Oliveira, R. T.; Souza, C. J. S. 2017. The crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) byproducts, can be used as a source of non-degradable protein in the rumen? *Bioscience Journal* 33:113-120. <https://doi.org/10.14393/BJ-v33n1a2017-33105>

Hungria, M.; Campo, R. J.; Souza, E. M.; Pedrosa F. O. 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331:413–425. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>

Jahanzad, E.; Sadeghpour, A.; Hosseini, M. B.; Barker, A. V.; Hashemi, M.; Zandvakili, O. R. 2014. Silage Yield and Nutritive Value of Millet-Soybean Intercrops as Influenced by Nitrogen Application. *Crop Economics, Production & Management* 106:1993-2000. <https://doi.org/10.2134/agronj13.0542>

Jahanzad, E.; Sadeghpour, A.; Hashemi, M.; Afshar, R. K.; Hosseini, M. B.; Barker, A. V. 2015. Silage fermentation profile, chemical composition and economic of millet and soya bean grown in monocultures and as intercrops. *Grass and Forage Science* 71:584-594. <https://doi.org/10.1111/gfs.12216>

Jobin, C. C.; Nussio, L. G.; Reis, R. A.; Schmidt, P. 2007. Avanço metodológico na avaliação da qualidade da forragem conservada. *Revista Brasileira de Zootecnia* 36:101-119. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982007001000013>

Jung, H. G.; Deetz, D. A. 1993. Cell wall lignification and degradability. p.315-346. In: Forage cell wall structure and digestibility. American Society of Agronomy, Madison, USA. <https://doi.org/10.2134/1993.foragecellwall.c13>

- Kappes C.; Arf, O.; Arf, M. V.; Ferreira, J. P.; Bem, E. A. D.; Portugal, J. R.; Vilela, R. G. 2013. Inoculação de sementes com bactérias diazotróficas e aplicação de nitrogênio em cobertura e foliar em milho. *Semina: Ciências Agrárias*, 34:527-538. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n2p527>
- Kung Jr., L.; Shaver, R. D.; Grant R. J.; Schmidt, R. J. 2018. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *Journal of Dairy Science* 101:4020-4033. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>
- Leite, R. C.; Santos, A. C., Santos, J. G. D., Leite, R. C., Oliveira, L. B. T., Hungria, M. 2019. Mitigation of Mombasa Grass (*Megathysus maximus*) Dependence on Nitrogen Fertilization as a Function of Inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 43:1-14. <http://dx.doi.org/10.1590/18069657rbc20180234>
- Malinich, E. A.; Bauer, C. E. 2018. The plant growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense* is vertically transmitted in *Phaseolus vulgaris* (common bean). *Symbiosis* 76:97-108. <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0539-2>
- Mertens D. R.; Lofton, J. R. 1980. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics in vitro. *Journal Dairy Science* 63:1437-1446. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(80\)83101-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)83101-8)
- Monção, F. P.; Costa, M. A. M. S.; Rigueira, J. P. S.; Sales, E. C. J.; Leal, D. B.; Silva, M. F. P.; Gomes, V. M.; Chamone, J. M. A.; Alves, D. D.; Carvalho, C. C. S.; Murta, J. E. J.; Rocha Júnior, V. R. 2020. Productivity and nutritional value of BRS capiaçu grass (*Pennisetum purpureum*) managed at four regrowth ages in a semiarid region. *Tropical Animal Health and Production* 52:235-241. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02012-y>
- Neter, J.; Wasserman, W.; Kutner, M.H. 1985. Applied linear statistical models. Regression, analysis of variance, and experimental designs. 2 ed. Richard D, Irwin, USA.
- Nocek, J. E. (1988). *In situ* and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. *Journal of Dairy Science* 71:2051-2069. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79781-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79781-7)
- Ørskov, E. R.; McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science*, 92:499-503. <https://doi.org/10.1017/S0021859600063048>

Ramos, J. P. F.; Santos, E. M.; Santos, A. P. M.; Souza, W. H.; Oliveira J. S. 2016. Ensiling of Forage Crops in Semiarid Regions. p.65-84. In: Advances in Silage Production and Utilization. Intech Open, Silva, T., Brasil. <http://dx.doi.org/10.5772/101990>

Reboita, M. S.; Rodrigues, M.; Silva, L. F.; Alves, M. A.; 2015. Climate aspects in Minas Gerais state. Revista Brasileira de Climatologia 17:206-226. <http://dx.doi.org/10.5380/abclima.v17i0.41493>

Rodrigues, T. C. G. de C, Freitas, P. M., Santos, E. M., Araujo, Pires, A. J. V., Ayres, M. C. C., Carvalho, L. M., Souza J. G., Carvalho, G. G. P. 2019. Effects of ammoniated pearl millet silage on intake, feeding behavior, and blood metabolites in feedlot lambs. Tropical Animal Health and Production 51: 2323-2331. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01914-1>

Ruppel, K. A.; Pitt, R. E.; Chase, L. E.; Galton, D. M. 1995. Bunker silo management and its relationship to forage preservation on dairy farms. Journal of Dairy Science 78:141-153. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76624-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76624-3)

Sahoo R. K.; Ansari M. W.; Pradhan M.; Dangar T. K.; Mohanty, S.; Tuteja, N. 2014. Phenotypic and molecular characterization of native *Azospirillum* strains from rice fields to improve crop productivity. Protoplasma 251:943-953. <https://doi.org/10.1007/s00709-013-0607-7>

Santos, M. S.; Nogueira, M. A.; Hungria, M. 2019. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the presente and previewing an outstanding future for the use of beneficial bactéria in agriculture. AMB Express 9:1-22. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>

Silva, D.J.; Queiroz, A.C. 2002). Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. Viçosa, Brasil.

Sniffen, C. J.; O'Connor, J. D.; Van Soest, P. J.; Fox, D. G.; Russell, J. B. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. Journal of Animal Science 70:3562-3577. <https://doi.org/10.2527/1992.70113562x>

Sousa, D.M.G; Lobato, E. 2004. Cerrado: Correção do solo e adubação. Embrapa Cerrados, Planaltina, Brasil.

Taiz, L., and Zeiger, E. 2013. Plant physiology. Artemed, Porto Alegre, Brasil.

Van Soest, P. J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2. ed. Ithaca: Cornell University, New York, USA.

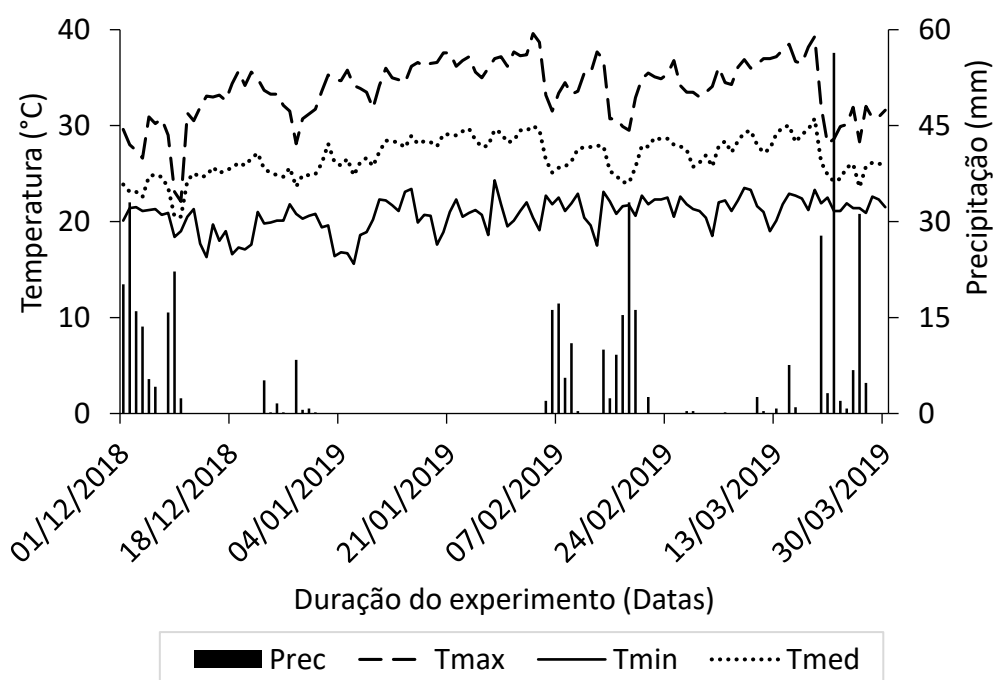
Waldo, D. R.; Smith, L. W.; Cox, E. L. 1972. Model of cellulose disappearance from the rumen. Journal of dairy science 55:125-129. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(72\)85442-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(72)85442-0)

Weiss, W. P. 1998. Estimating the Available Energy Content of Feeds for Dairy Cattle. Journal of Dairy Science 81:830-839. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75641-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75641-3)

Wilson, J. R. 1994. Cell wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants: review. Journal Agriculture Science 122:173-182. <https://doi.org/10.1017/S0021859600087347>

Zailan, M. Z.; Yaaku, H.; Jusoh, S. 2016. Yield and nutritive value of four Napier (*Pennisetum purpureum*) cultivars at different harvesting ages. Agriculture and Biology Journal of North America 7:213-219. <https://doi.org/10.5251/abjna.2016.7.5.213.219>

#### 4.8 – FIGURAS E TABELAS



**Figura 1.** Precipitação; Temperatura máxima, mínima e média durante o experimento, de dezembro de 2018 a março de 2019 (INMET, 2019).

**Tabela 1.** Características agrônômicas e produtivas da planta inteira de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* associado ou não à adubação nitrogenada na região semiárida

Item <sup>1</sup>	Nitro <sup>2</sup>	Doses (L ha <sup>-1</sup> )				EPM <sup>3</sup>	p-valor <sup>5</sup>			
		0	10	20	30		BacL <sup>4</sup>	BacQ <sup>4</sup>	N <sup>4</sup>	Bac x Nitro <sup>4</sup>
Alt (m)	Sem	3,00	3,12	3,11	3,05	0,07	0,02 <sup>a</sup>	0,19	0,02	0,17
	Com	2,94	3,33	3,21	3,42					
DC (mm)	Sem	12,46	13,14	13,46	12,44	0,53	0,58	0,03 <sup>b</sup>	0,22	0,96
	Com	12,69	13,70	13,82	13,19					
TP (cm)	Sem	29,19	29,66	30,14	30,62	1,06	0,32	0,10	0,44	0,78
	Com	28,30	30,55	31,03	29,73					
PMS (kg ha <sup>-1</sup> )	Sem	19.843	18.519	22.310	28.512	2.793	0,02 <sup>c</sup>	0,13	0,49	0,57
	Com	18.513	20.832	22.366	22.039					

<sup>1</sup>Item: Alt - altura de planta, DC - diâmetro de colmo, TP - tamanho de panícula, PMS - produção de matéria seca. <sup>2</sup>Nitro - fertilização nitrogenada. <sup>3</sup>EPM - erro padrão da média. <sup>4</sup>BacL- bactéria efeito linear, <sup>4</sup>BacQ - bactéria efeito quadrático, <sup>4</sup>N - efeito nitrogênio, <sup>4</sup>Bac x Nitro - efeito da interação entre bactéria e nitrogênio.

<sup>5</sup>Equações: <sup>a</sup> $\hat{Y} = 3,041 + 0,0074*x$ ,  $r^2 = 0,58$ ; <sup>b</sup> $\hat{Y} = 12,5559 + 0,13290x - 0,004165*x^2$ ,  $R^2 = 0,98$ ; <sup>c</sup> $\hat{Y} = 18.936 + 0,198*x$ ,  $r^2 = 0,97$ . Ao nível de significância ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 2.** Composição químico-bromatológica da planta inteira de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* associado ou não à adubação nitrogenada na região semiárida

Item <sup>1</sup> %	Nitro <sup>2</sup>	Doses (L ha <sup>-1</sup> )				EPM <sup>3</sup>	p-valor <sup>5</sup>			
		0	10	20	30		BacL <sup>4</sup>	BacQ <sup>4</sup>	N <sup>4</sup>	Bac x Nitro <sup>4</sup>
MS	Sem	23,96	24,92	24,03	25,94	0,67	0,36	0,60	0,86	0,37
	Com	24,23	24,25	25,13	25,69					
MM	Sem	10,88	11,42	11,56	12,07	0,28	0,73	0,86	0,25	0,74
	Com	10,96	11,11	11,26	11,25					
PB	Sem	10,44	10,41	10,25	10,17	0,06	0,01 <sup>a</sup>	0,46	0,91	0,11
	Com	10,45	10,27	10,28	10,26					
FDN	Sem	64,00	63,53	63,62	62,19	0,60	0,18	0,83	0,67	0,85
	Com	64,00	64,03	63,08	63,35					
FDA	Sem	41,37	41,93	42,52	41,98	0,54	0,76	0,99	0,60	0,51
	Com	42,39	42,85	41,18	42,71					
LIG	Sem	9,34	8,09	9,37	7,64	0,42	0,34	0,97	0,07	0,16
	Com	9,52	10,01	8,754	9,79					
FDNi	Sem	39,44	36,86	36,48	38,42	1,36	0,37	0,83	0,14	0,58
	Com	34,37	36,97	34,32	37,29					
CT	Sem	75,68	75,17	75,19	74,76	0,41	0,14	0,91	0,25	0,79
	Com	75,60	75,62	75,45	75,49					
CNF	Sem	11,68	11,64	11,57	12,58	1,13	0,46	0,82	0,96	0,95
	Com	11,49	11,58	12,38	12,14					
NDT	Sem	47,14	47,04	46,90	47,36	0,55	0,64	0,84	0,93	0,88
	Com	46,93	46,86	47,41	47,11					

<sup>1</sup>Item: MS - matéria seca; MM - matéria mineral; FDN - fibra em detergente neutro; FDA - fibra em detergente ácido; LIG - lignina; CEL - celulose; CT - carboidratos totais; CNF - carboidratos não fibrosos; NDT - nutrientes digestíveis totais. <sup>2</sup>Nitro – fertilização nitrogenada. <sup>3</sup>EPM - erro padrão da média. <sup>4</sup>BacL - bactéria efeito linear; <sup>4</sup>BacQ - bactéria efeito quadrático; <sup>4</sup>N - efeito nitrogênio; <sup>4</sup>Bac x Nitro - efeito da interação entre bactéria e nitrogênio. <sup>5</sup>Equações -  $\hat{Y} = 10,43 - 0,00759 * x$ ,  $r^2 = 0,98$ . Ao nível de significância ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 3.** Cinética ruminal da matéria seca da planta inteira de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* associado ou não à adubação nitrogenada na região semiárida

Item <sup>1</sup>	Nitro <sup>2</sup>	Doses (L ha <sup>-1</sup> )				EPM <sup>3</sup>	p-valor <sup>5</sup>			
		0	10	20	30		BacL <sup>4</sup>	BacQ <sup>4</sup>	N <sup>4</sup>	Bac x Nitro <sup>4</sup>
Fração "a"	Sem	27,56	25,18	24,89	26,43	0,65	0,05 <sup>a</sup>	0,29	0,09	0,28
	Com	25,76	26,31	25,23	23,98					
Fração "b"	Sem	37,64	36,10	39,76	34,77	1,77	0,38	0,83	0,80	0,32
	Com	38,59	37,52	36,03	37,38					
"c", (%/hora)	Sem	2,75	2,75	2,50	3,00	0,03	0,08	0,09	0,99	0,57
	Com	2,50	2,50	2,50	3,50					
Bp, %	Sem	63,66	63,49	64,73	60,93	1,52	0,06	0,49	0,64	0,48
	Com	64,35	63,82	61,27	61,35					
DE, (k=5%/h)	Sem	38,83	39,54	37,01	38,96	0,65	0,59	0,16	0,53	0,31
	Com	37,85	38,15	37,70	39,46					
FI, %	Sem	36,35	36,51	35,27	39,07	1,52	0,06	0,49	0,64	0,48
	Com	35,65	36,18	38,74	38,65					

<sup>1</sup>Item: c - taxa de degradação da fração b, Bp - fração potencialmente degradável padronizada, DE - degradabilidade efetiva, FI - fração indegradável. <sup>2</sup>Nitro - fertilização nitrogenada. <sup>3</sup>EPM - erro padrão da média. <sup>4</sup>BacL - bactéria efeito linear, <sup>4</sup>BacQ - bactéria efeito quadrático, <sup>4</sup>N - efeito do nitrogênio, <sup>4</sup>Bac x Nitro - efeito da interação bactéria e nitrogênio. <sup>5</sup>Equação =  $\hat{y} = 26,36 - 0,042 * x$ ,  $r^2 = 0,42$ . Ao nível de significância ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 4.** Cinética ruminal da fração fibrosa da planta inteira de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* associado ou não à adubação nitrogenada na região semiárida

Item <sup>1</sup>	Nitro <sup>2</sup>	Doses (L ha <sup>-1</sup> )				EPM <sup>3</sup>	p-valor <sup>5</sup>			
		0	10	20	30		BacL <sup>4</sup>	BacQ <sup>4</sup>	N <sup>4</sup>	Bac x Nitro <sup>4</sup>
Bp (%)	Sem	58,37	56,77	58,65	54,52	1,97	0,03 <sup>a</sup>	0,95	0,90	0,46
	Com	59,90	58,09	54,60	55,04					
"c" (%/h)	Sem	1,75	2,00	2,50	2,00	0,03	0,02 <sup>b</sup>	0,40	0,77	0,54
	Com	1,50	1,75	2,25	2,50					
TC (% hora)	Sem	13,61	11,94	11,00	11,85	1,46	0,01 <sup>c</sup>	0,75	0,51	0,23
	Com	16,05	14,44	11,74	8,90					
DE (k=5%/h)	Sem	15,46	15,80	18,10	15,73	1,32	0,02 <sup>d</sup>	0,95	0,66	0,15
	Com	14,00	14,44	15,81	19,18					
FI, %	Sem	41,63	43,23	41,36	45,49	1,97	0,03 <sup>e</sup>	0,95	0,90	0,46
	Com	40,11	41,91	45,40	44,96					

<sup>1</sup>Item: Bp - fração potencialmente degradável padronizada, c - taxa de degradação, TC - tempo de colonização, DE - degradabilidade efetiva, FI - fração indegradável, <sup>2</sup>Nitro - fertilização nitrogenada. <sup>3</sup>EPM - erro padrão da médi. <sup>4</sup>BacL - bactéria efeito linear, <sup>4</sup>BacQ - bactéria efeito quadrático, <sup>4</sup>N - efeito do nitrogênio, <sup>4</sup>Bac x Nitro - efeito da interação bactéria nitrogênio. <sup>5</sup>Equação -  $^a\hat{Y} = 59,073 - 0,1387*x$ ,  $r^2 = 0,98$ ;  $^b\hat{Y} = 1,675 + 0,0238*x$ ,  $r^2 = 0,79$ ;  $^c\hat{Y} = 14,719 - 0,1519*x$ ,  $r^2 = 0,98$ ;  $^d\hat{Y} = 14,564 + 0,1001*x$ ,  $r^2 = 0,92$ ;  $^e\hat{Y} = 40,93 + 0,1388*x$ ,  $r^2 = 0,98$ . Ao nível de significância (p<0,05).

**Tabela 5.** Perdas, pH da silagem de milho inoculado de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* associado ou não à adubação nitrogenada na região semiárida

Item <sup>1</sup>	Nitro <sup>2</sup>	Doses (L ha <sup>-1</sup> )				EPM <sup>3</sup>	p-valor <sup>5</sup>			
		0	10	20	30		BacL <sup>4</sup>	BacQ <sup>4</sup>	N <sup>4</sup>	Bac x Nitro <sup>4</sup>
PG % MS	Sem	3,23	4,18	3,59	3,81	0,24	0,60	0,18	0,16	0,23
	Com	3,30	3,17	3,83	3,08					
PE Kg/t MV	Sem	35,88	37,11	37,33	34,15	0,79	0,45	0,27	0,25	0,37
	Com	34,24	36,95	34,46	35,06					
pH	Sem	3,42	3,28	3,20	3,32	0,07	0,45	0,27	0,10	0,84
	Com	3,22	3,16	3,18	3,18					

<sup>1</sup>Item: PG - perda por gases em % de matéria seca, PE - perda por efluente em tonelada por matéria verde, pH - potencial hidrogeniônico. <sup>2</sup>Nitro - fertilização nitrogenada. <sup>3</sup>EPM - erro padrão da média. <sup>4</sup>BacL - bactéria efeito linear, <sup>4</sup>BacQ - bactéria efeito quadrático, <sup>4</sup>N - efeito do nitrogênio, <sup>4</sup>Bac x Nitro - efeito da interação bactéria nitrogênio. Ao nível de significância (p<0,05).



**Tabela 6.** Composição químico-bromatológica da silagem de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* associado ou não à adubação nitrogenada na região semiárida

Item <sup>1</sup> %	Nitro <sup>2</sup>	Doses (L ha <sup>-1</sup> )				EPM <sup>3</sup>	p-valor <sup>5</sup>			
		0	10	20	30		BacL <sup>4</sup>	BacQ <sup>4</sup>	N <sup>4</sup>	Bac x Nitro <sup>4</sup>
MS	Sem	24,89	24,03	23,94	24,32	0,39	0,74	0,32	0,13	0,10
	Com	24,36	25,14	26,41	24,09					
MM	Sem	9,70	10,74	10,18	11,53	0,30	0,13	0,29	0,87	0,20
	Com	10,84	10,08	10,28	10,72					
PB	Sem	7,96	10,10	9,79	10,51	0,49	0,12	0,13	0,62	0,09
	Com	9,76	10,13	10,02	9,27					
FaPB	Sem	38,15	25,44	38,42	33,42	2,56	0,52	<sup>a</sup> 0,01	0,85	0,27
	Com	41,07	26,25	30,64	35,90					
FDN	Sem	68,66	67,29	68,04	68,74	0,46	0,16	0,60	0,02	0,40
	Com	68,50	69,30	70,29	70,16					
FDA	Sem	49,01	48,35	49,70	50,55	0,62	<sup>b</sup> 0,01	0,78	0,01	0,58
	Com	49,18	50,61	51,75	52,33					
LIG	Sem	10,09	9,27	9,81	10,80	0,63	<sup>c</sup> 0,02	0,96	0,38	0,16
	Com	7,59	9,97	10,03	10,50					
FDNi	Sem	35,23	35,77	34,96	34,99	1,20	0,95	0,78	0,67	0,85
	Com	35,80	35,99	36,67	35,24					
CT	Sem	79,34	76,15	77,03	74,95	0,75	0,07	0,68	0,82	0,053
	Com	76,40	76,78	76,71	77,01					
CNF	Sem	10,68	8,86	8,99	6,22	1,13	<sup>d</sup> 0,04	0,98	0,11	0,56
	Com	7,90	7,48	6,42	6,85					
NDT	Sem	45,20	44,97	44,78	43,69	0,47	<sup>e</sup> 0,03	0,69	0,06	0,82
	Com	44,41	44,11	43,51	43,45					

<sup>1</sup>Item: MS - matéria seca, MM - matéria mineral, PB - proteína bruta, FaPB - fração "a" da proteína bruta, FDN - fibra em detergente neutro, FDA - fibra em detergente ácido, LIG - lignina, FDNi - fibra em detergente neutro indigestível, CT - carboidratos totais, CNF - carboidratos não fibrosos, NDT nutrientes digestíveis totais. <sup>2</sup>Nitro - fertilização nitrogenada. <sup>3</sup>EPM: erro padrão da média. <sup>4</sup>BacL - bactéria efeito linear, <sup>4</sup>BacQ - bactéria efeito quadrático, <sup>4</sup>N - efeito do nitrogênio, <sup>4</sup>Bac x Nitro - efeito da interação bactéria e nitrogênio. <sup>5</sup>Equação - <sup>a</sup> $\hat{Y} = 38,0568 - 1,10327x - 0,034725x^2$ ,  $R^2 - 0,51$ ; <sup>b</sup> $\hat{Y} = 48,9413 + 0,08288x$ ,  $R^2 - 0,97$ ; <sup>c</sup> $\hat{Y} = 8,8982 + 0,05727x$ ,  $r^2 - 0,98$ ; <sup>d</sup> $\hat{Y} = 9,2318 - 0,08727x$ ,  $r^2 - 0,98$ ; <sup>e</sup> $\hat{Y} = 44,879 - 0,0409x$ ,  $r^2 - 0,97$ . Ao nível de significância ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 7.** Cinética ruminal da matéria seca da silagem de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* associado ou não à adubação nitrogenada na região semiárida

Item <sup>1</sup>	Nitro <sup>2</sup>	Doses (L ha <sup>-1</sup> )				EPM <sup>3</sup>	p-valor <sup>5</sup>			
		0	10	20	30		BacL <sup>4</sup>	BacQ <sup>4</sup>	N <sup>4</sup>	Bac x Nitro <sup>4</sup>
Fração "a"	Sem	26,02	27,40	24,97	26,17	0,56	0,06	0,30	0,09	0,29
	Com	25,76	26,31	25,23	23,98					
Fração "b"	Sem	37,64	36,10	39,76	34,77	1,52	0,38	0,84	0,81	0,33
	Com	38,59	37,52	36,03	37,38					
"c", (%/hora)	Sem	0,028	0,028	0,025	0,030	0,0026	0,083	0,095	0,998	0,576
	Com	0,025	0,025	0,025	0,035					
DP, %	Sem	63,66	63,49	64,73	60,93	1,30	0,069	0,49	0,65	0,49
	Com	64,35	63,82	61,27	61,35					
DE, (k=5%/hora)	Sem	38,83	39,54	37,01	38,96	0,31	0,59	0,16	0,54	0,31
	Com	37,85	38,15	37,70	39,46					
FI, %	Sem	36,35	36,51	35,27	39,07	1,30	0,07	0,49	0,65	0,49
	Com	35,65	36,18	38,74	38,65					

<sup>1</sup>Item: c - taxa de degradação da fração b; Bp - fração potencialmente degradável padronizada; DE - degradabilidade efetiva; FI - fração indegradável. <sup>2</sup>Nitro - fertilização nitrogenada. <sup>3</sup>EPM - erro padrão da média. <sup>4</sup>BacL - bactéria efeito linear; <sup>4</sup>BacQ - bactéria efeito quadrático; <sup>4</sup>N - efeito do nitrogênio; <sup>4</sup>Bac x Nitro - efeito da interação bactéria e nitrogênio. Ao nível de significância ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 8.** Cinética ruminal da fração fibrosa da silagem de milho inoculado com *Azospillum brasilense* associado ou não à adubação nitrogenada

Item <sup>1</sup>	Nitro <sup>2</sup>	Doses (L ha <sup>-1</sup> )				EPM <sup>3</sup>	p-valor <sup>5</sup>			
		0	10	20	30		BacL <sup>4</sup>	BacQ <sup>4</sup>	N <sup>4</sup>	Bac x Nitro <sup>4</sup>
Bp (%)	Sem	58,37	56,77	59,16	54,52	1,68	ª0,04	0,89	0,83	0,38
	Com	59,90	58,09	54,60	55,04					
“c” (%/h)	Sem	0,018	0,020	0,020	0,020	0,002	ª0,01	0,74	0,74	0,39
	Com	0,015	0,018	0,023	0,025					
TC (%hora)	Sem	13,61	11,94	13,60	11,85	1,17	ª0,01	0,74	0,97	0,12
	Com	16,05	14,44	11,74	8,90					
DE (k=5%/h)	Sem	15,46	15,80	15,26	15,73	0,82	ª0,01	0,27	0,67	0,06
	Com	14,00	14,44	15,81	19,18					
FI, %	Sem	41,63	43,23	40,84	45,49	1,68	ª0,04	0,89	0,83	0,38
	Com	40,11	41,91	45,40	44,96					

<sup>1</sup>Item: Bp - fração potencialmente degradável padronizada, c - taxa de degradação, TC - tempo de colonização, DE - degradabilidade efetiva, FI - fração indegradável, <sup>2</sup>Nitro - fertilização nitrogenada. <sup>3</sup>EPM - erro padrão da média. <sup>4</sup>BacL - bactéria efeito linear, <sup>4</sup>BacQ - bactéria efeito quadrático, <sup>4</sup>N - efeito do nitrogênio; <sup>4</sup>Bac x Nitro - efeito da interação bactéria nitrogênio. <sup>5</sup>Equação -  $^a\hat{y} = 59,098 - 0,1361*x$ ,  $r^2 - 0,95$ ;  $^b\hat{y} = 0,0165 - 0,000213*x$ ,  $r^2 - 0,98$ ;  $^c\hat{y} = 14,849 + 0,1389*x$ ,  $0,95$ ;  $^d\hat{y} = 14,41925 + 0,085925*x$ ,  $r^2 - 0,84$ ;  $^e\hat{y} = 40,9025 + 0,136125*x$ ,  $r^2 - 0,96$ . significância ao nível de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O semiárido necessita de estratégias e tecnologias específicas para o sucesso na produção agropecuária, isso devido as suas condições edafoclimáticas. E com a realização deste estudo demonstra que é possível empregar tecnologia sustentável. Sendo que a associação do milho com o *Azospirillum brasilense* foi capaz de proporcionar boa produção de proteína bruta e nutrientes digestíveis totais por hectare, sendo uma excelente alternativa.

Contudo, os resultados deste trabalho são relevantes, pois a adubação nitrogenada de 50 kg por hectare não influenciou em maior produção do milho, demonstrando que somente a aplicação da bactéria de 30 litros foi suficiente para incrementar ganhos expressivos. Com base nisto, o *Azospirillum brasilense* demonstra ser uma boa estratégia para reduzir custos nas fazendas agropecuárias.