

Azospirillum spp. en gramíneas y forrajeras. Revisión

Camila Fernandes Domingues Duarte ^{a*}

Ulysses Cecato ^a

Thiago Trento Biserra ^a

Divaney Mamédio ^a

Sandra Galbeiro ^b

^a Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Departamento de Zootecnia, Av. Colombo, 5790 - Zona 7, Maringá, Paraná, Brasil.

^b Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Londrina, Paraná, Brasil.

* Autor de correspondencia: camilafernandesd@hotmail.com

Resumen:

El *Azospirillum* es un género de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, encontrado en suelos de diferentes regiones del globo terrestre. Estas bacterias cuando se asocian a raíces de plantas, ayudan en la producción y productividad del cultivo, actuando en el aumento de parte aérea y sistema radicular. Estos beneficios se derivan de la excreción de los fitonutrientes de crecimiento, especialmente las auxinas. En las gramíneas forrajeras, la inoculación de estas cepas puede proporcionar mayores ganancias de masa de forraje con menores dosis de N-fertilizante, garantizando la sostenibilidad del sistema de producción del pasto. El uso de *Azospirillum* spp., en gramíneas debe llenar un vacío entre la productividad y la sostenibilidad. La promoción del crecimiento proporcionado por *Azospirillum* se ha descrito en varias gramíneas como la caña de azúcar, el maíz y plantas forrajeras, pero se deben realizar más estudios en diferentes condiciones para diseminar y consolidar su adopción entre los productores. La adopción de la inoculación de esta bacteria puede aumentar la competitividad de los productos agrícolas y ser un diferencial frente a la producción adoptada en la agricultura convencional. En la ganadería la inoculación en pastizales puede aumentar la producción de masa de forraje, y mitigar los riesgos de degradación y mejorar los índices productivos de ese sector.

Palabras clave: Bacterias, Microbiología agrícola, Rizobacterias, *Azospirillum*.

Recibido: 16/06/2018

Aceptado: 30/01/2019

Introducción

La agricultura necesita aliar productividad y sostenibilidad, propósitos totalmente divergentes que están siendo exigidos en consecuencia del aumento poblacional y cambios climáticos, además del comportamiento de los consumidores. En este sentido, es fundamental que se conozca y utilice tecnologías racionales, una vez que el aumento en la producción de granos, carne, leche, entre otros productos, se alcanzan sólo con grandes cantidades de fertilizantes químicos y aberturas de nuevas áreas.

Entre los nutrientes capaces de promover el aumento de la productividad, el nitrógeno (N) es esencial, especialmente en regiones de clima tropical. Se estima que la fertilización nitrogenada genera un costo en el orden del 40 %⁽¹⁾ de la producción, además de su gran potencial contaminante, con graves consecuencias para el medio ambiente.

De este modo, el uso de alternativas sostenibles para la nutrición vegetal, a ejemplo de la exploración del potencial de la fijación biológica de nitrógeno atmosférico (FBN), se vuelve fundamental para aumentar la productividad de las gramíneas. La FBN es realizada por las bacterias diazotróficas, comúnmente conocidas como bacterias promotoras de crecimiento de plantas (BPCPs). La FBN ocurre por la conversión del nitrógeno atmosférico (N₂) en otras sustancias nitrogenadas, con incorporación por la planta a través de la síntesis de proteína y ácidos nucleicos⁽²⁾.

Sin embargo, los beneficios promovidos por las BPCPs van más allá de la FBN⁽³⁾. Estas bacterias también estimulan la producción de hormona de crecimiento como auxinas, citocininas y giberilinas, y mejoran la absorción de otros nutrientes, como el fósforo. La inoculación puede ser considerada una tecnología prometedora para elevar la competitividad del sector agropecuario, incluso por reducir los impactos ambientales derivados del uso sin control de los fertilizantes.

Entre las bacterias promotoras de crecimiento, el género *Azospirillum* es el más estudiado y ganó relevancia mundial en la década de los 70⁽⁴⁾. Algunos resultados demostraron un aumento en la absorción de agua y nutrientes, mayor tolerancia a la sequía y productividad. Estos resultados se derivan del incremento en la producción de sustancias promotoras de crecimiento que alteran la morfología del sistema radicular, con aumento del número y diámetro de raíces secundarias, laterales y adventicias⁽⁵⁾.

En estudios en cultivos de maíz con *Azospirillum* observaron que la inoculación incrementaba en 17 % en la longitud media de las espigas y productividad con respecto al testigo⁽⁵⁾. La inoculación puede reducir el uso de N-fertilizante⁽⁶⁾ y, esa economía puede

alcanzar alrededor de 30 a 50 kg ha⁻¹ de N solamente en el maíz al inicio y al final de la época de las aguas⁽⁷⁾. Según Hungría *et al*⁽⁸⁾, con la sustitución de sólo el 50 % de N-fertilizante el Brasil puede ahorrar hacia 52 y 35 kg ha⁻¹ de N utilizado en el maíz y el trigo respectivamente. Esta disminución resultaría en una economía de aproximadamente 1,200 millones de dólares al año.

Otra gramínea bastante difundida y que requiere altas dosis de nitrógeno es la caña de azúcar. Boddey *et al*⁽⁹⁾ encontraron resultados positivos de la interacción de esa cultura con la BPCPs. Schultz *et al*⁽¹⁰⁾ al inocular *Azospirillum brasilense*, observaron incrementos del 10 % en la productividad de la caña de azúcar en relación al tratamiento sin N-fertilizante. Basándose en esto, los autores concluyeron que la inoculación promueve rendimientos similares a la adición de 120 kg ha⁻¹ N.

Los beneficios que se han observado para el maíz, una gramínea forrajera, también puede esperarse a las gramíneas forrajeras tropicales y, éstas pueden beneficiarse con la inoculación del *Azospirillum*, y revertir o minimizar los riesgos de degradación mientras mejoran la producción de masa de forraje. Boddey *et al*⁽⁹⁾ constataron que algunas bacterias de la rizosfera de las gramíneas forrajeras son capaces de fijar el N₂, lo que garantiza nuevas perspectivas sobre el uso de forrajes en los trópicos con utilización de menores cantidades de N-fertilizante. La inoculación con estirpes de *A. brasilense* benefició la *Brachiaria* spp., con aumentos promedio del 13 % en la producción de masa de forraje⁽¹⁾.

Género *Azospirillum*

Este género de bacterias fue descubierto por la Dra. Johana Dobereiner y ganó importancia en la década de los 70 por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. En razón de la aptitud de fijar nitrógeno en vida libre, esa bacteria fue denominada *Azospirillum*⁽¹¹⁾. Este género presenta gran distribución geográfica, siendo encontrada en regiones de clima templado y tropical⁽¹⁾.

Las bacterias del género *Azospirillum* se clasifican como Gram-negativas de vida libre, con formato de bastón y movimiento activo, y poseen de 0.8 a 2 µm de diámetro entre y de 2 a 4 µm de longitud y gránulos intracelulares de poli-hidroxiburitrato⁽¹²⁾. Según algunos autores⁽¹¹⁾, estas bacterias son estrictamente aerobias, cuando se les suministran fuentes nitrogenadas o microaerófilas cuando están en un ambiente libre de N₂, es decir, cuando necesitan realizar FBN. Sin embargo, estos autores observaron que para promover un ambiente microaerofílico las bacterias en medio semisólido producen una película delgada en forma de velo, con concentración de oxígeno esencial para la fijación del nitrógeno y para iniciar su crecimiento.

El *Azospirillum* posee un metabolismo de carbono y nitrógeno flexible que aumenta su capacidad de competir por la colonización de la rizósfera⁽¹²⁾, además de que se los

denominan diazótrofos endófitos facultativos por colonizar tanto el interior como la superficie de las raíces⁽⁸⁾. La colonización ocurre principalmente en la zona de elongación y la zona de los pelos radicales⁽¹¹⁾. Cuando están presentes en la rizósfera, estas colonizan tanto la capa de mucigel alrededor de las raíces (colonización externa) como los espacios intercelulares de las raíces (colonización interna).

Esa bacteria se desarrolla bien en temperatura óptima entre 28 y 41°C y es altamente competitiva mientras que coloniza la rizósfera, haciendo el uso de diferentes fuentes de nitrógeno como amoníaco, nitrito, nitrato, nitrógeno molecular y aminoácidos, y fuentes de carbono como ácidos orgánicos (malato, piruvato, succinato y fructosa), para el mantenimiento de su metabolismo⁽¹⁰⁾.

A la fecha se tienen identificadas en el Mundo 15 especies de *Azospirillum*: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. doebereinerae*, *A. oryzae*, *A. melinis*, *A. canadiense*, *A. zae*, *A. rugosum*, *A. palatum*, *A. picis* y *A. thiophilum*. Sin embargo, las especies más investigadas son *A. lipoferum* y *A. brasilense*, las cuales son de ocurrencia más común en gramíneas y forrajeras de regiones tropicales⁽¹⁾. Trentini⁽¹²⁾ relató que no todas las especies pueden ser encontradas colonizando plantas en diferentes localidades, el *A. amazonense*, por ejemplo, sólo fue aislado en Brasil.

El *A. brasilense* se distribuye ampliamente en los suelos tropicales y subtropicales lo que contribuyó para la su difusión y utilización en diversos estudios⁽¹³⁾. Los ensayos comprobaron el uso de esta bacteria promueve el crecimiento vegetal y, en consecuencia el aumento de la productividad⁽¹⁴⁾. *A. brasilense* exhibe resultados satisfactorios cuando asociado a las plantas de la familia *Poaceae* como maíz, avena, trigo y arroz⁽¹⁵⁾.

Inoculante para plantas

El inoculante es un producto que contiene microorganismos vivos que promueven el crecimiento vegetal a través de diferentes mecanismos, conocido mundialmente como biofertilizante. Su producción a nivel comercial en América Latina comenzó en 1898⁽¹⁶⁾, y en la actualidad el mercado brasileño se destaca en el mundo⁽¹⁷⁾. El uso de inoculantes mejora la competitividad del sector agropecuario, dado que esta es una tecnología prometedora y sostenible capaz de sustituir en parte la fertilización nitrogenada⁽¹⁸⁾.

El Ministério da Agricultura, Pecuária de Abastecimento (MAPA)⁽¹⁹⁾, exige que los inoculantes comerciales presenten al menos 10^9 células por gramo o mililitro del producto al final de su período de validez y deberán elaborarse con soporte estéril y estar libres de microorganismos no especificados hasta el factor de dilución de 1×10^{-5} . Algunas características son determinantes para que los inoculantes sean efectivos en la promoción del crecimiento vegetal, como la cepa utilizada y su competitividad, el número de células necesarias o viables para la rápida colonización de la rizósfera y del tejido vegetal⁽²⁰⁾. Se

menciona⁽²¹⁾ que en la producción es necesario utilizar vehículos no tóxicos, solubles en agua y asociados a estirpes competitivos.

El éxito de la inoculación depende de la selección de estirpes eficientes y resistentes al estrés, ya que las bacterias diazotróficas se encuentran en diversos tipos de suelo y su persistencia está condicionada a la salinidad, el pH y la humedad del suelo⁽²²⁾. Se ha observado que las bacterias del género *Azospirillum* promovían el crecimiento vegetal a través de algunos mecanismos, como por ejemplo la mayor tolerancia a los agentes ambientales estresores, producción de fitohormonios y FBN⁽²³⁾.

En el año 1996 la Universidad Federal do Paraná, específicamente el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular estableció una asociación con la Embrapa Soja para la realización de proyectos de investigaciones y ensayos de laboratorio para probar la eficiencia agronómica del *Azospirillum* en nivel de campo. El desarrollo de los ensayos siguieron todas las normativas recomendado por la legislación establecidas por el MAPA para inoculantes, que resultó en la selección de estirpes de *Azospirillum* que presentaron mayor supervivencia en el suelo y mayor promoción de crecimiento de plantas⁽¹⁶⁾.

De acuerdo a Hungría⁽¹⁶⁾ se desarrollaron 18 ensayos de campo que se dividieron en dos conjuntos con nueve ensayos cada uno. El primer conjunto consistió en la evaluación de inoculantes turfosos conteniendo solamente una cepa de *A. brasilense* o *A. lipoferum* en cinco ensayos con tres cosechas de maíz y cuatro ensayos con dos cosechas de trigo. El segundo conjunto comprendió cuatro ensayos con maíz y cuatro con trigo, utilizando una mezcla de dos cepas de *A. brasilense* (Ab-V5 y Ab-V6) en inoculantes turfosos o líquidos.

Estos ensayos resultaron en la liberación por el MAPA de las cepas de *A. brasilense* Ab-V4, Ab-V5, Ab-V6 y Ab-V7 para la producción comercial de inoculantes. Aunque solo están produciendo inoculantes con las cepas Ab-V5 y Ab-V6, ya que presentaron resultados satisfactorios en los cultivos de maíz y trigo⁽¹⁶⁾.

Conforme a los resultados obtenidos en los ensayos citados anteriormente, se optó por la comercialización de los inoculantes líquidos en relación a los turfosos, debido a su facilidad de aplicación. En 2010, se desarrolló un inoculante líquido que contenía *Azospirillum* y moléculas protectoras para las condiciones tropicales, desarrollado por la asociación entre Embrapa y la iniciativa privada.

Las cepas de *Azospirillum* se comercializan en varios países del mundo, como Argentina, México, Italia, Francia, Australia, Pakistán, Alemania, Estados Unidos, África, Bélgica, India y Uruguay⁽²⁴⁾. Esta exitosa comercialización de *Azospirillum* es el resultado de los beneficios proporcionados a los cultivos agrícolas. Okon y Labandera-Gonzalez⁽²⁵⁾ señalaron que el uso de inoculantes que contenían *Azospirillum* mostró una tasa de éxito entre 60 y 70 % con ganancias de productividad de 5 a 30 % en varios cereales.

Modo de acción de las bacterias *Azospirillum*

El *Azospirillum* spp., actúa por diferentes mecanismos en el suministro de nitrógeno a las plantas (Cuadro 1).

Cuadro 1: Modo de acción de las bacterias *Azospirillum*

Modo de acción	Autor
Producción de reguladores vegetales (auxinas, citocininas y giberelinas)	Lambrecht <i>et al</i> ⁽²⁷⁾
Reducción asimilatoria de nitrato	Fages ⁽²³⁾
Fijación biológica del N ₂	Fernandes Júnior ⁽²⁴⁾
Resistencia al estrés hídrico	Cohen <i>et al</i> ⁽³⁴⁾
Aumento del sistema radical	Okon y Labandera-Gonzalez ⁽²⁵⁾
Mayor absorción de agua y nutrientes	Okon y Labandera-Gonzalez ⁽²⁵⁾
Control biológico	Unno <i>et al</i> ⁽²⁶⁾

La producción de reguladores vegetales es uno de los principales mecanismos, ya que altera el crecimiento de las plantas, modifica la morfología de las raíces y maximiza el uso del suelo, que a su vez intensifica la reducción del nitrato asimilable disponible en el suelo y, la FBN⁽²⁴⁾.

Otro modo de acción del *Azospirillum* ocurre a través de la reducción del nitrato (NO₃⁻) en las raíces, promoviendo el crecimiento vegetal debido al menor gasto de energía en la reducción de nitrato a amoníaco, y esta energía es asignada en otros procesos vitales. Fages⁽²³⁾ verificó que estas bacterias pueden influir en la actividad de la glutamina sintetasa en las raíces de las plantas de maíz. Según algunos investigadores⁽²⁶⁾ la glutamina sintetasa es extremadamente importante en el proceso de incorporación del nitrógeno, y es esencial para que las plantas expresen todo su potencial productivo. El *Azospirillum* puede actuar indirectamente en las plantas, protegiendo y reduciendo la aparición de hongos o patógenos del suelo, a través de varios mecanismos, tales como la producción de sideróforos, quitinasas, glucanasas y antibiosis.

El aumento del sistema radical es también uno de los mecanismos que puede resultar en una mayor absorción de minerales y agua. Este aumento es causado por la producción de sustancias promotoras del crecimiento radical⁽²⁵⁾. La principal hormona producida es la auxina, específicamente el ácido 3-indolacético (AIA)⁽¹⁵⁾.

Las estirpes de *Azospirillum* también producen otros compuestos indólicos, citocininas y giberilinas⁽⁸⁾. Según Lambrecht *et al*⁽²⁷⁾, hay al menos tres vías de biosíntesis para la producción de AIA en *Azospirillum*, dos de las cuales dependen del triptófano [índole-3-acetamida (IAM) y indol-3-piruvato (IpyA)]. El ácido 3-indolacético es la principal fuente de *Azospirillum*⁽²⁴⁾; sin embargo, hay algunos informes de que el ácido 3-

inodolbutírico también se secreta⁽²³⁾. Se reporta que el ácido 3-inodolbutírico es una importante fuente de reserva en el género *Azospirillum*⁽²⁸⁾.

Madhaiyan *et al*⁽²⁹⁾ verificaron que *A. brasilense* produjo ácido 3-indolacético, y cuando se inocularon con semillas de tomate y pimiento rojo, la longitud media de la raíz fue de 9.68 y 6.76 cm, mientras que los tratamientos controles presentaron 7.21 y 6.20 cm, respectivamente. Los autores aún observaron que el *Azospirillum* promovió un aumento en la parte aérea de estas plantas, confirmando su capacidad en promover el crecimiento de las plantas.

El AIA puede ser un indicador que mantiene la relación simbiótica y la interacción planta-*Azospirillum*⁽³⁰⁾. Esta señalización es moldeada por procesos coevolutivos entre las bacterias y su planta huésped⁽³¹⁾.

La síntesis de fitohormonas por *A. brasilense* puede ser diferente en cada estirpe. En un estudio⁽⁶⁾ se observó que la estirpe 42 M produjo niveles más altos de AIA en relación a sp7, Cd, Az39, 40 y 42. El AIA tiene la capacidad de alterar la fotosíntesis, la biosíntesis de algunos metabolitos y otras fitohormonas como las citocininas y giberelinas⁽³²⁾. Las citocinas en las plantas regulan la división celular y la formación de nuevos tejidos en la parte aérea y raíces⁽³³⁾. Las giberelinas regulan el crecimiento de las plantas, promueven la división y el alargamiento de raíces primarias⁽³⁰⁾.

Las estirpes de *Azospirillum* pueden secretar ácido abscísico y están relacionadas con el mecanismo y la defensa del estrés hídrico en las plantas⁽³⁴⁾. El ácido abscísico es una fitohormona que induce la respuesta al estrés hídrico, ambiental y salino⁽³⁵⁾. Cohen *et al*⁽³⁴⁾ inocularon *A. lipoferum* en plantas de maíz y verificaron altos niveles de ácido abscísico, lo que aumentó la tolerancia de las plantas a la sequía. Según estos autores, esta tolerancia al estrés ambiental proporcionado por el *Azospirillum* puede estar relacionada con el ácido abscísico y también con las prolina y las poliaminas. Las poliaminas (cadaverina, espermina y espermidina) son polímeros orgánicos que están asociados con el crecimiento radical y la supresión del estrés en las plantas⁽³³⁾.

Al inocular las plántulas de arroz con *A. brasilense*⁽³⁶⁾, constataron que la producción de cadaverina aumentó el crecimiento de raíces y redujo el estrés osmótico. En las plantas de maíz inoculado con *A. brasilense*, Rodríguez-Salazar *et al*⁽³⁷⁾ observaron una mayor resistencia a la sequía y una mayor producción de biomasa.

Las bacterias promotoras de crecimiento tienen la capacidad de actuar como agentes de control biológico⁽³⁵⁾. El control biológico puede deberse al parasitismo, la producción de antibióticos, toxinas y enzimas, la interferencia en el proceso de reconocimiento planta-huésped y la inducción de resistencia⁽³³⁾.

Las bacterias facultativas, como las del género *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Azospirillum* y *Bacillus*, producen y secretan algunas sustancias secundarias que actúan como antibióticos, fungicidas, antivirales y agentes inmunosupresores⁽³¹⁾. Estos autores aún concluyeron que los mayores beneficios del uso de bacterias endofíticas en el control biológico de patógenos son la colonización natural de la rizósfera y la invasión de los tejidos internos de las plantas, esenciales para el éxito en el tratamiento de enfermedades que afectan las partes subterráneas de las plantas.

Aunque el género *Azospirillum* no se considera un biocontrolador, existen estudios que demuestran el control de algunas enfermedades, como las causadas por *Agrobacterium tumefaciens*⁽²⁵⁾. Este género de bacteria promotora de crecimiento produce algunos compuestos químicos que, al entrar en contacto con la planta, modifican el metabolismo y la actividad de defensa de ésta.

La defensa biológica se puede observar en dos vías metabólicas, que incluyen el ácido jasmónico y el ácido salicílico⁽¹⁷⁾. La resistencia sistémica inducida por las bacterias se activa mediante la vía de señalización del ácido jasmónico y del etileno⁽¹⁵⁾.

El *A. brasilense* también fue efectivo en el control biológico de *Agrobacterium tumefaciens* y de hongos fitopatogénicos. Sin embargo, el modo de inhibición aún no está bien definido⁽²⁵⁾. Estos autores identificaron una sustancia del grupo de las auxinas llamada fenilacético, como un compuesto antimicrobiano producido por *Azospirillum*. Tal sustancia se ha utilizado en el mecanismo de defensa y en la competencia bacteriana en el huésped.

Coinoculación con rizobio

La técnica de inoculación mixta con bacterias que hacen o no simbiosis es una alternativa en el cultivo de leguminosas⁽³⁸⁾. Según Ferlini⁽³⁹⁾ la técnica esta basada en el uso de diferentes microorganismos que producen un efecto sinérgico, y son capaces de superar los resultados productivos obtenidos cuando se usan por separado.

Así, la co-inoculación se basa en la mezcla de inoculantes, y los ensayos realizados en un medio de cultivo indicaron que algunas mezclas proporcionan la interacción sinérgica entre las bacterias, a través del suministro de nutrientes, remoción de productos de inhibidores o por el estímulo a través de mecanismos físicos o bioquímicos⁽³⁵⁾. El *A. brasilense* produce un efecto benéfico cuando se asocia con rizobio en las leguminosas, debido a la producción de fitohormona que resulta en mayor desarrollo del sistema radicular y permite una mayor explotación del volumen de suelo⁽³⁸⁾.

Para Bashan y Holguin⁽³⁵⁾ la coinoculación entre *Azospirillum* y otros microorganismos puede considerarse una de las principales barreras, y puede que sea el tema principal que se abordará en ensayos futuros. Las inoculaciones mixtas presentan mayores tasas de

éxito, ya que en estas plantas la nutrición es equilibrada y la absorción de nitrógeno, fósforo y de los demás minerales es efectivamente mejorada y, en consecuencia, aumento de la productividad⁽⁵⁾. Por lo tanto, la inoculación mixta estimula y beneficia la función de los nódulos, como el número total y el peso del nódulo. La inoculación combinada de *Bradyrhizobium japonicum* y *A. brasilense* en soja proporcionó mejores rendimientos incluso en condiciones de déficit hídrico y nutrientes⁽³⁹⁾. Resultados similares fueron observados por Benintende *et al*⁽⁴⁰⁾ al estudiar la coinoculación de *A. brasilense* y *B. japonicum* con y sin déficit hídrico. Los autores también notaron que en condición de déficit hídrico la coinoculación proporcionó un aumento en el peso de los nódulos y en ambas condiciones hídricas, la coinoculación aseguró mejores rendimientos y una mayor acumulación de materia seca.

Los estudios sobre el crecimiento y nodulación de raíces de soja coinoculada con *Azospirillum* y *Bradyrhizobium* mostraron que el *Azospirillum* estimula el crecimiento radicular y también puede mejorar el inicio y el desarrollo de los nódulos. Este efecto positivo de la coinoculación de *A. brasilense* y *B. japonicum* se debe a la excreción de productos metabólicos del *A. brasilense*, especialmente de los compuestos reguladores de crecimiento de raíz, el ácido inodolacético⁽³⁶⁾. Estos autores también relataron un mayor número de nódulos y un mayor porcentaje de plantas noduladas en plantas de soja coinoculadas.

Efecto del *Azospirillum* en las gramíneas forrajeras

La degradación de los pastizales es considerada uno de los mayores problemas de la ganadería. Macedo⁽⁴¹⁾ estimó que alrededor del 80 % de las áreas cubiertas por pastizales en todo el territorio brasileño presentan alguna etapa de degradación.

De los factores que conducen a la degradación de los pastizales, el bajo suministro de nutrientes para las plantas es considerado uno de los más importantes, resultando en baja calidad y productividad del pasto⁽⁴²⁾. Entre los nutrientes, el N se considera el principal factor limitante para el crecimiento y el desarrollo de los pastos tropicales⁽⁴³⁾, lo que implica su suministro a través de fertilización mineral. Sin embargo, es una práctica costosa y perjudicial al medio ambiente, ya que alrededor del 50 % de N se pierde por volatilización o lixiviación⁽¹⁴⁾.

En este sentido, la explotación del potencial de la fijación biológica del nitrógeno atmosférico (FBN) en gramíneas tropicales, se vuelve fundamental para restablecer la productividad y la calidad del forraje. La FBN es realizada por bacterias diazotróficas, comúnmente conocida como bacterias promotoras de crecimiento de plantas (BPCPs). La FBN ocurre por la conversión del N₂ en otras sustancias nitrogenadas, siendo asimilado por la planta a través de la síntesis de proteína y ácidos nucleicos⁽¹⁾.

En el ecosistema de pastizales, la FBN es fundamental en el ciclo del nitrógeno y las bacterias diazotróficas pueden desempeñar un papel importante en el suministro de N a las plantas. Por eso, el uso de esta tecnología parece ser prometedor, contribuyendo a la promoción del crecimiento y nutrición de las plantas forrajeras, convirtiendo la inoculación en una alternativa viable en sustitución total o parcial del N-fertilizante, contribuyendo así a la conservación de los recursos naturales⁽⁴⁴⁾.

A pesar de los beneficios promovidos por las BPCPs en los cultivos agrícolas (maíz, trigo, arroz), sus efectos sobre las plantas forrajeras aún son restringidos y carecen de estudios. Con eso, la evaluación de los efectos de las BPCPs en el establecimiento y mantenimiento de los pastos se vuelve fundamental en la búsqueda de una explotación económica y sostenible.

Siguiendo el contexto de la sostenibilidad, Bergamaschi⁽⁴⁵⁾ señaló el potencial de la FBN para el reemplazo total o parcial de la fertilización nitrogenada, ya que la inoculación puede ayudar a reducir el uso de N-fertilizante proveniente de combustibles fósiles no renovables. Hungría⁽⁸⁾ también llama la atención sobre los beneficios de la reducción de la contaminación ambiental derivada de la producción y el uso de N-fertilizantes y, en consecuencia, la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero.

Okon y Vanderleyden⁽⁵⁾ compilaron datos de 22 años de experimentos con inoculación a campo y concluyeron que el *Azospirillum* spp., promovió ganancias en varias especies de gramíneas en diferentes condiciones ambientales. Los autores también señalaron que las ganancias están más allá de la FBN, también modificando la producción de raíces y, en consecuencia, la superficie de absorción y volumen de suelo explotado. También observaron un aumento en la materia seca y un mayor crecimiento foliar en las plantas *Setaria italica* cultivadas en vasos y inoculadas con *A. brasilense*⁽⁴⁶⁾.

Al estudiar los efectos de la inoculación de bacterias diazotróficas en gramíneas forrajeras nativas del Pantanal, investigadores constataron que los efectos de la inoculación se volvieron notables a los 60 y 90 días de cultivo⁽⁴⁷⁾. Los autores también verificaron que la asociación de *A. brasilense* y *A. lipoferum* proporcionó una mayor producción de materia seca de la parte aérea, raíces y acumulación de N. La inoculación de *A. brasilense* en pasto natural también verificó una mayor producción de materia seca del pasto en relación al control⁽⁴⁸⁾.

Reis *et al*⁽¹⁴⁾ observaron que la inoculación favoreció la producción simultánea de materia seca de la parte aérea y raíces y altos niveles de fósforo (P) y N, debido a la mayor eficiencia de uso de estos nutrientes; esta mayor tasa de acumulación de materia seca está posiblemente relacionada con el aumento de la actividad de las enzimas fotosintéticas y la asimilación de N⁽⁸⁾. También se ha verificado un aumento en la producción de materia seca del pasto Marandú en el tratamiento con la inoculación, señalándola como una alternativa sostenible para aumentar la producción de forraje⁽⁴⁹⁾.

Fiori *et al*⁽⁵⁰⁾ también constataron la efectividad de la inoculación con *Azospirillum* para aumentar la productividad de las gramíneas. Algunos autores justificaron esta mayor productividad debido a la excreción de hormonas vegetales mejoradoras de la absorción de macro y micronutrientes⁽³⁵⁾.

Guimarães *et al*⁽⁵¹⁾ encontraron aumentos del 9 % en el número de hojas y el 12 % en el número de macollos por planta en el pasto Marandú inoculado con *A. brasilense*; aunque no observaron diferencias en la altura de plantas inoculadas en comparación con las fertilizadas con N.

El *A. brasilense* en pastizales proporcionó un aumento de aproximadamente 40 kg ha⁻¹ año⁻¹ de N vía FBN en las especies de *Pennisetum* y *Panicum*⁽²⁵⁾. Franche *et al*⁽⁵²⁾ observaron que la FBN puede introducir de 7 a 10 kg ha⁻¹ mes⁻¹ de N durante el verano, variando según el genotipo, siendo que el 39 % del N necesario para el desarrollo y productividad de la planta puede ser obtenido por esa vía. También fue verificado que la tasa de acumulación de MS en las parcelas inoculadas fue de 15 kg ha⁻¹ día⁻¹, siendo superior a la ausencia de inoculación y fertilización, que obtuvo valores de 4 kg ha⁻¹ día⁻¹.

En la *Brachiaria brizantha* Staf cv. Marandu⁽⁴⁹⁾, verificaron que el tratamiento con inoculación de *A. brasilense* presentó un mejor rendimiento en comparación con las plantas no inoculadas y fertilizadas con N, lo que resultó en mayor macollamiento y mayor período de pastoreo. Guimarães *et al*⁽⁵¹⁾ observaron un aumento alrededor del 8 % en los números de hojas y del 7 % en el número de macollo en los tratamientos inoculados. En el sistema radicular de *B. Brizantha*, verificaron una mayor producción de masa seca de raíces en plantas inoculadas con *Azospirillum*⁽³³⁾.

El uso de *Azospirillum* asociado la producción de forraje tiene resultados favorables, contribuyendo positivamente sobre la masa seca, el contenido de N y la altura de la planta, convirtiendo la inoculación en una alternativa viable en sustitución parcial del N-fertilizante. Por eso, el uso de bacterias promotoras de crecimiento está en línea con la necesidad de combinar la producción animal con la conservación del medio ambiente. Esto indica que el interés en la biotecnología del suelo tiende a aumentar porque es en gran parte responsable de la conservación y fertilidad del suelo y nutrición de la planta.

Sin embargo, se necesitan más estudios sobre los mecanismos y efectos de la inoculación sobre la MS, el contenido de N y la altura de la planta, especialmente con respecto al área foliar y proteína cruda, de modo que se puedan hacer recomendaciones con respecto a su uso asociado al N-fertilizante⁽¹⁾. Todavía hay una escasez de datos concluyentes que indiquen si los efectos de la inoculación se deben a la FBN o si son efectos hormonales.

Efecto del *Azospirillum* en el maíz

El rendimiento del maíz es el resultado de la combinación del potencial genético, las condiciones ambientales y la fertilidad del suelo. Sin embargo, los rendimientos máximos se alcanzan con la aplicación de grandes cantidades de fertilizantes, particularmente los nitrogenados.

La combinación de maíz y *Azospirillum* spp., puede resultar en una mayor productividad y reducción en el costo de producción. Según Fancelli⁽⁷⁾, la inoculación de *Azospirillum* en el cultivo de maíz puede generar una reducción en el uso del N-fertilizantes, del orden de 30 a 50 kg ha⁻¹.

La inoculación de *A. brasilense* en el maíz resultó en el aumento de la tasa de acumulación de masa seca y fotosintética⁽⁸⁾. Okon y Vanderleyden⁽⁵⁾ observaron que la inoculación con *Azospirillum* es más ventajosa cuando se asocia con genotipos no mejorados y cultivados con baja disponibilidad de N. Los autores también encontraron una mayor producción de masa seca, rendimiento de grano y acumulación de N en las plantas.

Al evaluar los beneficios de la inoculación con *A. brasilense*, se observó un aumento del 9 % en la producción de granos de maíz⁽⁵³⁾. Braccini *et al*⁽⁵⁴⁾ obtuvieron mejores resultados con el uso de *Azospirillum* inoculado en semillas de maíz, con aumento promedio del 70 % de masa seca de raíces y del 43.5 % en la masa seca de parte aérea. Al evaluar los efectos del uso de *A. brasilense* en el maíz, Hungria *et al*⁽⁸⁾ encontraron un aumento del 30 % en la productividad en los tratamientos inoculados.

Proceso de inoculación

La inoculación es una operación simple y fácil, que consiste en mezclar las semillas con el inoculante. En el momento de la inoculación, el producto debe ser mezclado a las semillas, en el cual debe ser realizado a la sombra, preferentemente por la mañana (evitando que los rayos solares maten las bacterias), en tambor rotatorio, con hormigón, o con máquinas de tratamiento de semillas, u otros mecanismos, siempre que sean eficientes en la distribución. Tomar cuidado para que la distribución del inoculante en las semillas sea uniforme, verificando que cada semilla quede cubierta por el inoculante, a medida que sean sembradas. Otro factor importante en el momento de la inoculación es la utilización de semillas de buena calidad, y siempre respetar la dosis a ser aplicada de inoculante/kg de semillas de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Después del tratamiento de las semillas con el inoculante, es necesario dejar secar por unos 30 min antes de la siembra y mantener las semillas inoculadas protegidas del sol y del calor. Sin embargo, para inoculantes turbulentos se recomienda la utilización de solución azucarada para humedecer las semillas u otra sustancia adhesiva (goma arábica, polvillo de araruta, polvillo de mandioca, harina de trigo y diversos tipos de celulos y

polímeros). En este caso, se recomienda agregar una solución azucarada en la concentración del 10 % (100 g de azúcar para un litro de agua), añadiendo y homerizando en las semillas, en la porción de 250 a 300 ml de solución azucarada por 50 kg de semillas. En primer lugar, las semillas deben mezclarse con la solución azucarada y la posterior mezcla de la turba en la cantidad recomendada por el fabricante⁽⁸⁾.

Cuando el proceso de inoculación se realiza de manera correcta, las semillas presentan en su superficie una fina capa de inoculante. En este proceso, es de extrema importancia verificar si todas recibieron el inoculante, para que las plantas puedan contribuir con la fijación de nitrógeno y consecuentemente, expresar todo su potencial genético.

La siembra con las semillas inoculadas debe realizarse preferentemente el mismo día, con el objetivo de obtener más microorganismos viables. En caso de que esto no sea posible, se recomienda que las semillas deben almacenarse en galpones ventilados, extendiendo las semillas sobre una superficie lisa, en capas de menos de 30 cm de altura⁽¹²⁾. Por tratarse de microorganismos vivos y sensibles a ambientes calientes⁽¹⁶⁾ recomienda realizar la siembra con un máximo de 24 h después de la inoculación. En caso de que este tiempo sea superado, se debe reinocular las semillas, con el objetivo de mejorar su eficiencia.

Durante la siembra, el depósito de semillas en la máquina puede calentarse (temperatura superior a 35 °C), y así se debe interrumpir inmediatamente la actividad y enfriar la caja, pues el calor puede matar a las bacterias. Además, tampoco se recomienda que la inoculación sea realizada directamente en la caja sembradora, pues de esa forma, dificultaría la cobertura uniforme de las semillas con el inoculante, haciendo poco eficiente el proceso de inoculación⁽¹⁶⁾.

Para la inoculación de semillas en pequeñas cantidades, se pueden usar bolsas plásticas, cuencas o baldes limpios y esterilizados con alcohol 70 %. Cuando la inoculación se realiza de forma correcta, las semillas presentan en su superficie una fina capa de inoculante. La operación debe seguir los mismos criterios para los realizados en tambor giratorio o hormigonera, es decir, hecha a la sombra y dejadas para secarse por 30 min antes de la siembra, y las dosis deben ser calculadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante, la máxima eficiencia del inoculante⁽¹²⁾.

En pequeñas áreas la técnica de inoculación directamente en el surco de siembra de la cultura del frijol puede convertirse en una alternativa interesante. Esta aplicación puede realizarse con un pulverizador manual o motorizado directamente en el surco de siembra. El inoculante debe mezclarse con agua, siguiendo la recomendación del fabricante, y el pulverizador no se puede utilizar para la aplicación de defensivos agrícolas, lo que puede disminuir la viabilidad de las bacterias y hacer que este método sea ineficiente. El operador debe estar con todos los equipos de protección individual (EPI) necesarios.

Consideraciones finales

El uso de *Azospirillum* spp., en gramíneas debe llenar un vacío entre la productividad y la sostenibilidad. El uso de inoculantes basados en este microorganismo tiene el potencial de reducir el uso de fertilizantes nitrogenados sin afectar la productividad, generando una mayor economía y rentabilidad para el sector agropecuario.

La promoción del crecimiento proporcionado por *Azospirillum* se ha descrito en varias gramíneas como la caña de azúcar, el maíz y plantas forrajeras, pero se deben realizar más estudios en diferentes condiciones para diseminar y consagrar su adopción entre los productores.

La adopción de la inoculación de esta bacteria puede aumentar la competitividad de los productos agrícolas y ser un diferencial frente a la producción adoptada en la agricultura convencional. En la ganadería la inoculación en pastizales puede aumentar la producción de masa de forraje y mitigar los riesgos de degradación y mejorar los índices productivos de ese sector.

Literatura citada:

1. Hungria M, Nogueira MA, Araujo RS. 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. *Agr Ecosyst Environ* 2016;(221):125-131.
2. Nunes FS, Raimondi AC, Niedwieski AC. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. *Química Nova* 2003;26(6):872-879.
3. Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Plant Sci* 2003;(22):107-149.
4. Döbereiner J, Marriel IE, Nery M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can J Microbiol* 1976;(22):1464-1473.
5. Okon Y, Vanderleyden J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants, *Appl Environ Microbiol* 1997;63(7):366-370.
6. Cheng NC, Novakowski JH, Sandini I, Domingues L. Substituição da adubação nitrogenada de base pela inoculação com *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. In.: *Seminário Nacional de Milho Safrinha*, 11. Anais... Lucas do Rio Verde: Fundação Rio Verde; 2011:377-382.
7. Fancelli AL. Boas práticas para o uso eficiente de fertilizantes na cultura do milho. Piracicaba: IPNI - International Plant Nutrition Institute Brazil, (IPNI. Informações Agronômicas, 131). 2010.

8. Hungria M, Campo R, Souza E, Pedrosa F. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 2010;(331):413–425.
9. Boddey RM, Xavier D, Alves BJR, Urquiaga S. Brazilian agriculture: the transition to sustainability. *J Crop Produc* 2003;(9):593-621.
10. Schultz N, Morais RF, Silva JA, *et al.* Avaliação agronômica de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. *Pesq Agropec Bras* 2012;(47):261-268.
11. Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Ptacek D, Okon Y, Vanderleyden J. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biol Fertil Soil* 2002; (36):284–297.
12. Trentini DB. Identificação dos alvos celulares das proteínas de transdução de sinal PII do diazotrófico de vida livre *Azospirillum amazonense* [tesis maestria]. Brasil, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2010.
13. Zambrano ER, Jiménez Salgado T, Tapia Hernández A. Estudio de bacterias asociadas a orquídeas (Orchidaceae). *Lankesteriana* 2007;(71-2):322-325.
14. Reis VM, Baldini JI, Baldini VLD, Dobereiner J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm Trees. *Plant Sci* 2000;(19):227-247.
15. Hartmann A, Baldani JI. The genus *Azospirillum*. In: Dworkin M editor. *The Prokaryotes*. 1st ed. New York, New York: Springer; 2006:115-140.
16. Hungria M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. *Embrapa Soja – Documentos* 325, 2011.
17. Silva MF, Reis VM. Produção, caracterização e aplicação de anticorpo policlonal contra *Azospirillum amazonense* estirpe AM 15. *Rev Cien Agro* 2009;68(1):1-11.
18. Chueire LMO. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16s rRNA. *Rev Bras Cienc Solo* 2003;27(5):833-840.
19. Silveira ÉL. Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva [doctoral thesis]. Brasil, SP: Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal; 2008.
20. MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº36 de 3 de agosto de 2004- Anexo I. Diário oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, nº 153 de 10 de agosto, 2004. Brasília, DF, BRA: Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento; 2004.

21. Deaker R, Roughley RJ, Kennedy IR. Legume seed inoculation technology: a review. *Soil Biol Bioch* 2004;(36):1275–1288.
22. Fernandes Júnior PI. Composições poliméricas a base de Carboximetilcelulose (CMC) e Amido como veículos de inoculação de Rizóbio em leguminosas [tesis maestría]. Brasil, RJ: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2006.
23. Fages J. *Azospirillum* inoculants and field experiments. En: Okon Y, editor. *Azospirillum/plant associations*. Boca Raton: CRC. 1994:87-109.
24. Mehnaz S. *Azospirillum*: a biofertilizer for every crop. In: Arora NK editor. *Plant microbes symbiosis: Applied facets*. 2015.
25. Okon Y, Labandera-Gonzalez CA. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol Bioch* 1996;(26):1591-1601.
26. Unno H. Atomic structure of plant glutamine synthetase. *J Biol Chem* 2006;281(39):29287-29296.
27. Lambrecht M, Okon Y, Vande Broek A, Vandereleyden J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol* 2000;(8):298-300.
28. Duca S, Verderio E, Serafini-Fracassini D, *et al.* The plant extracellular transglutaminase: what mammal analogues tell. *Amino Acids* 2014;(46):777–792.
29. Madhaiyan M, Poonguzhali S, Kwon SW, *et al.* *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010;(60):2490–2495.
30. Malhotra M, Srivastava S. Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. *Eur J Soil Biol* 2009;(45):73-80.
31. Walker TS, Bais HP, Grotewold E, *et al.* Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol* 2003;(132):44–51.
32. Ilyas N, Bano A. *Azospirillum* strains isolated from roots and rhizosphere soil of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under different soil moisture conditions. *Biol Fert Soils* 2010;46(4):393–406.
33. Spaepen S, Vanderleyden J, Okon Y. Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. *Adv Bot Res* 2009;(51):283–320.
34. Cohen AC, Bottini R, Pontin M, *et al.* *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. *Physiol Plant* 2015;(153):79–90.

35. Bashan Y, Holguin G, Bashan LE. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canad J Microbiol* 2004;(50):521-577.
36. Cassán F, Maiale S, Masciarelli O, *et al.* Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *Eur J Soil Biol* 2009;(45):12–19.
37. Rodríguez-Salazar J, Suárez R, Caballero-Mellado J, Iturriaga G. Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants. *Microbiol Lett* 2009;(296):52–59.
38. Bárbaro IM. Técnica alternativa: co-inoculação de soja com *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* visando incremento de produtividade. 2008.
39. Ferlini HA. Co-Inoculación en Soja (*Glycine max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*. 2006.
40. Benintende S, Uhrich W, Herrera M, *et al.* Comparación entre coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense* e inoculación simple con *Bradyrhizobium japonicum* en la nodulación, crecimiento y acumulación de N en el cultivo de soja. *Agriscient* 2009;(27):71-77.
41. Macedo MCM. Pastagens no ecossistema Cerrado: evolução das pesquisas para o desenvolvimento sustentável. Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia. Goiânia. 2005:56-84.
42. Batista K. Resposta do capim-marandu a combinações de doses de nitrogênio e enxofre [tesis maestría]. Brasil, SP: Universidade de São Paulo; 2002.
43. Werner JC. Adubação de pastagens de *Brachiaria* spp. In: Anais do XI Simpósio Sobre Manejo de Pastagens. 1994.
44. Vogel GF, Martinkoski L, Ruzicki M. Efeitos da utilização de *Azospirillum brasilense* em poáceas forrageiras: Importâncias e resultados. *Agropec Científic no Semi-Árido* 2014;(10):01-06.
45. Bergamaschi C. Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas às raízes e colmos de cultivares de sorgo [tesis maestría]. Brasil, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
46. Fallik E, Okon Y. The response of maize (*Zea mays*) to *Azospirillum* inoculation in various types of soils in the field. *World J Microb Biot* 1996;(12):511-515.
47. Brasil MS, Baldani JI, Baldani BLD. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal Sul Matogrossense. *R Bras Ciênc Solo* 2005;(29):179-190.

48. Itzigsohn R, Burdman S, Okon Y, Zaady E, et al. Plant-growth promotion in natural pastures by inoculation with *Azospirillum brasilense* under suboptimal growth conditions. *Arid Soil Res* 2000;(13):151-158.
49. Oliveira PPA, Oliveira WS, Barioni WJ. Produção de forragem e qualidade de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu com *Azospirillum brasilense* e fertilizada com nitrogênio. Embrapa pecuária sudeste, São Carlos, SP, 2007.
50. Fiori CCL, Bartchechen A, Watanabi SH, Guarido RC. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasiliense* na produtividade da cultura do milho (*Zea mays* L). *Campo Digit@l* 2010;(5):56-59.
51. Guimarães SL, Bonfim-Silva EM, Polizel AC, Campos TS. Produção de capim marandu inoculado com *Azospirillum* spp. *Enciclopédia Biosfera* 2011;(7):13-21.
52. Franche CK, Lindstrom C, Elmerich AB. Nitrogen fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil* 2009;(321):35-59.
53. Barros Neto CR. Efeito do nitrogênio e da inoculação de sementes com *Azospirillum brasiliense* no rendimento de grãos de milho. 2008. 29 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Setor de Ciências Agrárias e de Tecnologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná.
54. Braccini AL, Dan LGM, Piccinin GG, Albrecht LP, Barbosa MC, Ortiz AHT. Seed inoculation with *Azospirillum brasilense*, associated with the use of bioregulators in maize. *Revista Caatinga* 2012;(25):17-23.