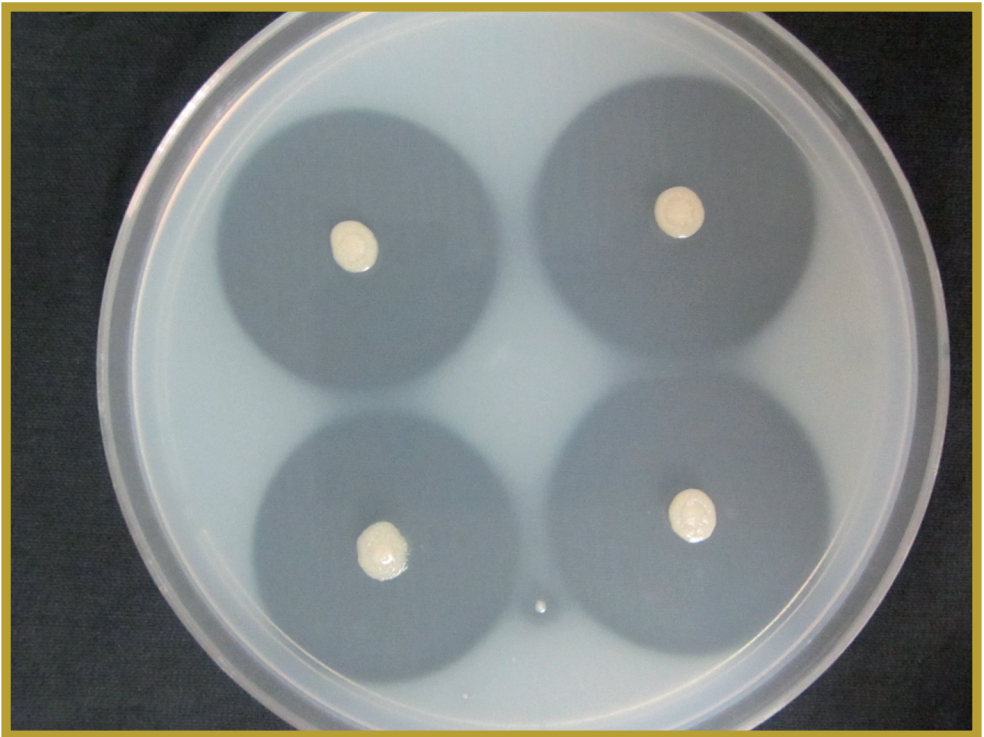


**Metodologia de Aplicação de
Microrganismos Solubilizadores
de Fósforo em Sementes
Visando Melhor Aproveitamento
deste Nutriente pelas Plantas**



ISSN 1679-0154
Dezembro, 2013

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 88

Metodologia de Aplicação de Microrganismos Solubilizadores de Fósforo em Sementes Visando Melhor Aproveitamento deste Nutriente pelas Plantas

Christiane Abreu de Oliveira
Ivanildo Evódio Marriel
Eliane Aparecida Gomes
Bianca Bráz Mattos
Flávia Cristina dos Santos
Maycon Campos de Oliveira
Vera Maria Carvalho Alves

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
Home page: www.cnpms.embrapa.br
E-mail: cnpms.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau
Membros: Dagma Dionísia da Silva, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro,
Monica Matoso Campanha, Maria Marta Pastina, Rosângela Lacerda
de Castro e Antonio Claudio da Silva Barros.

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros
Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro
Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa
Foto(s) da capa: Vitória Palhares

1ª edição

1ª impressão (2013): on line

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Milho e Sorgo**

Metodologia de aplicação de microrganismos solubilizadores de
fósforo em sementes visando melhor aproveitamento deste
nutriente pelas plantas / Christiane Abreu de Oliveira ... [et
al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2013.
29 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa
Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 88).

1. Microbiologia do solo. 2. Fósforo. 3. Nutrição vegetal. 4.
Milheto. I. Oliveira, Christiane Abreu de. II. Série.

CDD 631.46 (21. ed.)

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	14
Conclusão	21
Agradecimentos	25
Referências	25

Metodologia de Aplicação de Microrganismos Solubilizadores de Fósforo em Sementes Visando Melhor Aproveitamento deste Nutriente pelas Plantas

Christiane Abreu de Oliveira¹

Ivanildo Evódio Marrie²

Eliane Aparecida Gomes³

Bianca Bráz Mattos⁴

Flávia Cristina dos Santos⁵

Maycon Campos de Oliveira⁶

Vera Maria Carvalho Alves⁷

Resumo

Uma das alternativas promissoras para a agricultura consiste na utilização de rochas naturais, que possuem baixas taxas de solubilização, mas que em associação com microrganismos do solo, denominados solubilizadores de fósforo (MSP), são capazes de suprir, mesmo que parcialmente, a demanda de fósforo (P) pelas plantas. Dentre os estudos de MSP em plantas, poucos se referem a métodos eficientes de aplicação em sementes ou estudos de veiculação/formulação para

¹Engenheira Agrônoma, D.Sc. em Microbiologia, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, christiane.paiva@embrapa.br. *C.A. Oliveira (autor correspondente): christiane.paiva@embrapa.br

²Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Biologia Celular, Pesquisador em Microbiologia da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, ivanildo.marriel@embrapa.br

³Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas/UFV, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, eliane.a.gomes@embrapa.br

⁴Bióloga, M.Sc. em Microbiologia, Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, bianca.mattos@embrapa.br

⁵Engenheira Agrônoma, Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas/UFV, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, flavia.santos@embrapa.br

⁶Mestre em Microbiologia Agrícola/UFV, Analista B Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, maycon.oliveira@embrapa.br

⁷Engenheira Agrônoma, Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas/UFV, Pesquisadora Embrapa Milho e Sorgo, vera.alves@embrapa.br

inoculantes. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi testar a metodologia mais adequada para a aplicação de bactérias solubilizadoras de P com base na avaliação do crescimento e nutrição de plantas de milho. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os tratamentos constituíram-se de um fatorial $2 \times 2 \times 6 + 2$, sendo os fatores: duas rochas fosfatadas - Fosfato de Itafós (FI) e Fosfato de Araxá (FA), dois veículos de inoculação - carvão e carboximetil celulose (CMC), seis tratamentos relacionados ao tipo de inoculação: um sem bactéria (B0) e com as cinco bactérias solubilizadoras de P do gênero *Bacillus*: B32, B70, B116, B119, B30K. Outros dois tratamentos adicionais foram utilizados como controle, testemunha sem P e adubação com fonte solúvel, superfosfato triplo. O método utilizado de formulação de MSP com carvão ou CMC resultou em aumentos significativos da biomassa de milho e do conteúdo de fósforo na parte aérea em função do tipo de rocha fosfatada e inoculante. Para os inoculantes B116 e B119, o efeito no crescimento e conteúdo de fósforo foi mais pronunciado nos tratamentos formulados com carvão e com adubação de FI. Os resultados aqui encontrados podem contribuir para o uso de metodologias eficientes na aplicação de microrganismos solubilizadores de P em sementes e para a seleção de bactérias eficientes na solubilização do P para as plantas.

Palavras-chave: Fósforo, Inoculante, biofertilizantes, veículos de inoculação, MSP (microrganismos solubilizadores de fósforo)

Approach of P-Solubilizing Microorganisms Seed Application for Better Utilization of This Nutrient by Plants

Christiane Abreu de Oliveira¹

Ivanildo Evódio Marrie²

Eliane Aparecida Gomes³

Bianca Bráz Mattos⁴

Flávia Cristina dos Santos⁵

Maycon Campos de Oliveira⁶

Vera Maria Carvalho Alves⁷

One of the promising alternatives for agriculture is the use of natural stone, which have low rates of solubility but which in combination with soil microorganisms, known solubilizers phosphorus (MSP) are able to supply, even partially, the demand for phosphorus (P) by plants. Among the studies of MSP in plants, few refer to efficient application methods on seed placement or studies / formulation for inoculants. In this sense, the objective of this study was to test the most appropriate methodology for the application of P solubilizing bacteria based on the assessment of growth and plant nutrition of millet. The experimental design was completely randomized, with four replications. The treatments consisted of a 2 x 2 + 6 x 2 factorial , with the factors : two phosphate - phosphate rocks Itafós (FI) and phosphate Araxá (FA) , two vehicles inoculation - coal and carboxymethyl cellulose (CMC) and six related to the type of inoculation treatments : one without bacteria (B0) and the five P -solubilizing bacteria of the genus *Bacillus* : B32 , B70 , B116 , B119 , B30K . Other two additional treatments were used as controls, control without fertilization with P and water soluble, triple superphosphate. The method

used in the formulation of MSP with coal or CMC resulted in significant increases in biomass of millet and phosphorus content in shoots depending on the type of phosphate rock and inoculant. For B116 and B119 inoculants, the effect on growth and phosphorus content was more pronounced in treatments formulated with coal and fertilizer FI. The results here can contribute to the efficient use in the application of methodologies P -solubilizing microorganisms in seeds and for the selection of bacteria effective in solubilizing the P plant .

Key words : P - solubilizing microorganisms , phosphorus , biofertilizers , vehicle inoculation

Introdução

Para atender à demanda atual e obtenção de níveis elevados de produtividade em culturas de grãos, especialmente milho, necessita-se de um manejo adequado das práticas culturais e, dentre estas, merece destaque o manejo da adubação, com ênfase no fósforo (P). Isso porque, no caso do Brasil, para suprir a demanda nacional desse nutriente, o país importa cerca de 50% dos fertilizantes fosfatados utilizados atualmente, o que torna o agronegócio brasileiro com alta dependência do mercado externo, comprometendo a sua sustentabilidade e competitividade em termos globais. Além disso, os aumentos de preços dos fertilizantes fosfatados, a existência de grandes jazidas de fosfatos naturais em diversas regiões do País, a incorporação de novas áreas à agricultura e a baixa disponibilidade de P dos solos brasileiros, em geral, tem feito com que a utilização desses fosfatos seja um atrativo (NOVAIS et al., 2007). Por outro lado, a maioria dos fertilizantes fosfatados, como os superfosfatos ou fosfatos

de amônio, é obtida quimicamente a partir de rocha de fosfato extraída em minas, que envolve gastos significativos de energia provenientes de fontes não renováveis para seu processamento, seu transporte e sua distribuição. Por isso, no mundo, ênfase tem sido dada a estratégias alternativas para adubação fosfatada do solo (KHAN et al., 2010).

Uma das alternativas promissoras consiste na utilização de rochas naturais, que possuem baixas taxas de solubilização (STOCKDALE et al., 2002), mas que em associação com microrganismos do solo como inoculantes, denominados solubilizadores de fósforo (MSP), são capazes de suprir, mesmo que parcialmente, a demanda de fósforo pelas plantas. Estudos recentes em condições de campo têm demonstrado que, por exemplo, em arroz, o uso destes inoculantes poderia reduzir em até 50% o uso de adubos fosfatados (RAJAPAKSHA et al., 2011; HINSINGER, 2001).

Outra vantagem do uso destes microrganismos como bioinoculantes, além da solubilização da rocha, é a capacidade de também disponibilizar o fósforo complexado a Ca, Fe e Al no solo, principalmente pela liberação de ácidos orgânicos (WHITELAW, 2000; GOLDSTEIN et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2009), além de mineralizar o fósforo orgânico do solo e resíduos orgânicos liberando enzimas fosfatases (RICHARDSON et al., 2009; OGBO, 2010; VASSILEVA et al., 2010; JORQUERA et al., 2011; MANDER et al., 2012) e fitases (GREINER, 2006).

As características mais importantes do emprego de microrganismos imobilizados na solubilização de fosfatos insolúveis e do solo estão relacionadas com a sua longevidade e estabilidade catalítica. Com relação aos microrganismos,

estes podem funcionar bem em condições de laboratório, mas a dificuldade está em se ajustar uma formulação para o inoculante de modo que o produto seja capaz de manter a população do microrganismo e proporcionar resultados equivalentes em condições de campo (STEPHENS; RASK, 2000; SILVA et al., 2012). Neste sentido, o veículo utilizado para inocular uma estirpe deve proteger as células bacterianas proporcionando a manutenção de grande quantidade de células viáveis no solo e na semente até o período em que surgem as raízes (DEAKER et al., 2004).

No Brasil, maior mercado nesta área, a produção de inoculantes iniciou-se na década de 1950 (FREIRE, 1968), sendo a turfa o veículo mais utilizado pela indústria até o presente. Contudo, este recurso natural está cada vez mais escasso, sendo que no país, por exemplo, há poucas turfeiras de qualidade adequadas para a produção de inoculantes, havendo, portanto, a necessidade de importação deste substrato, o que acarreta elevação do custo de produção (BUCHER; REIS, 2008; FERNANDES JÚNIOR et al., 2009).

Com o intuito de reduzir o custo do inoculante e de produzir inoculantes com maior qualidade, diversos estudos têm sido conduzidos no sentido de desenvolver veículos alternativos à turfa (FERNANDES JÚNIOR et al., 2009). Veículos inoculantes de baixo custo e com potencial para aplicação na agricultura têm sido alvo de intensas pesquisas como, por exemplo, bagaço de cana, serragem, turfa derivada de cacau, casca de arroz, farelo de trigo, carvão vegetal, fosfato de rocha, pó de carvão, lignita, entre outros (PANDEY; MAHESHWARI, 2007). Polímeros biodegradáveis, como a carboximetilcelulose (CMC) e o amido, têm sido utilizados como veículos inoculantes para rizóbio e

têm sido apontados como veículos ecologicamente seguros, pois promovem o encapsulamento das células, liberando-as após a degradação do material no ambiente, e protegem as células contra estresses ambientais, podendo, assim, favorecer a multiplicação e sobrevivência das células, quando aplicados ao solo (FERNANDES JÚNIOR, 2006; RHOR, 2007; SILVA et al., 2012). No caso de outros inoculantes já existentes no mercado, como os de rizóbio e *Azospirillum*, estas metodologias já estão bem estabelecidas. Entretanto, para o uso de MSP como inoculantes, poucos estudos relatam métodos eficientes de aplicação das células em sementes com veículos de diferentes materiais e/ou formulações. Como proposto por Stephens e Rask (2000), para que se possa formular e produzir comercialmente os inoculantes, é necessária a integração dos parâmetros físicos, químicos e biológicos, permitindo assim elevadas populações do microrganismo-alvo e maior tempo de sobrevivência. Os mesmos autores relatam que formulações inadequadas são frequentemente as barreiras mais comuns para a comercialização dos inoculantes.

No entanto, considerando a hipótese de biossolubilização de fosfatos de rocha por microrganismos como interação benéfica no desenvolvimento das culturas de grãos e futuro desenvolvimento de formulações comerciais, objetivou-se com esse trabalho avaliar o efeito de bactérias solubilizadoras de fósforo, em formulação com carvão ativado e CMC, sobre o crescimento e a nutrição do milho. O intuito é extrair deste estudo uma metodologia adequada para aplicação de microrganismos solubilizadores de fosfato em sementes, que também possibilitará o “screening” futuro de estirpes eficientes em testes de casa de vegetação e campo para recomendação como inoculantes.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG (19°28'S e 44°15'W). Foram utilizados vasos de 5 kg de capacidade, preenchidos com 4 kg de solo, Latossolo Vermelho distrófico típico, com as seguintes características químicas e físicas, antes da aplicação dos insumos: pH H₂O = 5,2; Al = 0,4 cmolc dm⁻³; Ca = 2,5 cmolc dm⁻³; Mg = 0,2 cmolc dm⁻³; SB (soma de bases) = 11,8 cmol_c dm⁻³; P = 2,2 mg dm⁻³; K = 30,3 mg dm⁻³; V (saturação de bases) = 23,2 % e teor de argila = 74,0 dag kg⁻¹.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os tratamentos constituíram-se de um fatorial 2 x 2 x 6 + 2, sendo os fatores estudados as duas rochas fosfatadas: fosfato de Itafós (FI) e fosfato de Araxá (FA); dois veículos de inoculação: carvão ativado moído e Carboximetilcelulose (CMC em gel); seis tratamentos relacionados ao tipo de inoculação: um sem bactéria (B0) e com as cinco bactérias solubilizadores de P do gênero *Bacillus*: B32, B70, B116, B119, B30K. Outros dois tratamentos adicionais foram utilizados como controle: testemunha sem P e adubação com fonte solúvel, superfosfato triplo (ST).

Produção dos inoculantes

Os microrganismos utilizados neste trabalho fazem parte da Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo e foram isolados a partir de áreas de cultivo de milho, com baixa disponibilidade de fósforo e cultivo orgânico. Estas estirpes foram testadas previamente quanto à eficiência de

solubilização de P em meio líquido contendo fósforo orgânico e inorgânico, por Oliveira et al. (2009) e por Silva (2010), tendo apresentado eficiência na liberação de P.

Para a preparação dos inoculantes (Figura 1), os microrganismos preservados em ágar-batata sólido, imersos em óleo mineral estéril, foram reativados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA: batata (200 g L^{-1}), dextrose (20 g L^{-1}) e ágar (15 g L^{-1}), utilizando-se o método de estrias para obtenção de colônia pura dos isolados. Posteriormente, cada estirpe foi transferida para cultivo em caldo de soja triplicaseína, durante 72 h, à temperatura de $29 \text{ }^\circ\text{C}$, sob agitação de 350 RPM. Após uma semana de crescimento, os inóculos foram centrifugados por 10 minutos, a 6000g . As suspensões bacterianas, ressuspendidas em solução salina [$0,85\%$ (m/v) NaCl], foram ajustadas para a absorbância igual ou superior a 1, em comprimento de onda igual a 550 nm. Posteriormente, as suspensões foram adicionadas ao veículo (carvão ativado vegetal moído ou CMC em gel), na proporção de 30% (m/v) do total de inoculante líquido (500 ml inoculante / ha). O inoculante (bactéria + veículo) foi peletizado às sementes de milho com goma de fécula de mandioca 3% (m/v) em água. Depois de concluída a inoculação, foi realizado o plantio. O CMC foi preparado na concentração de $1,5\%$ (m/v) em solução aquosa de glicerol $7,5\%$ (v/v) (adaptado de RHOR, 2007), sendo geleificado a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ em chapa aquecida sob agitação. Após a dissolução, o gel foi resfriado até $25 \text{ }^\circ\text{C}$, o pH ajustado para 7,0 e autoclavado. Para uso, este foi aquecido em banho-maria a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ até fluidez.

Adubação, Plantio e Coleta das Plantas

Trinta dias antes do plantio, foi realizada a correção da acidez do solo e adubação com solução nutritiva de Somasegaran e Hoben (1985), com base na análise química do solo, com exceção do fósforo. A necessidade de calagem foi calculada para se atingir $V = 70\%$, com aplicação de reagentes p.a. de CaCO_3 e MgO . Para a adubação fosfatada, utilizaram-se 300 mg P.dm^{-3} de P_2O_5 de cada tipo de fosfato de rocha. Após incubação do solo com adubos e corretivos, foram semeadas 20 sementes de milho CMS 01 deixando-se 10 plantas/vaso após o desbaste, efetuado aos oito dias. Aos 20 dias após o plantio, os nutrientes foram reaplicados com solução nutritiva com a metade da dose inicial de plantio (SOMASEGARAN; HOBEN, 1985).

A colheita foi realizada aos 45 dias após a semeadura, na fase de pré-florescimento. As plantas foram cortadas rente ao solo. Foi avaliada a produtividade de matéria seca da parte aérea das plantas de milho, bem como a soma desses cultivos e o teor de fósforo da parte aérea.

Para determinação da massa seca dos tecidos vegetais, as amostras de tecido foram submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar, em temperatura de 65 °C, até atingirem massa constante. Após serem moídas em moinho tipo Willey, análises químicas da parte aérea das plantas de milho foram realizadas para determinação dos teores de P (SILVA, 1999). Posteriormente, calculou-se o conteúdo de fósforo das plantas em cada tratamento por meio do produto da massa seca e teores de P. A disponibilidade de P no solo e os outros nutrientes foram determinados, segundo Silva (1999).

Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas utilizando-se o teste Scott-Knott a 5% de probabilidade, por meio do programa SISVAR (FERREIRA, 2008).

Resultados e Discussão

Uma alternativa considerável ao uso de fertilizantes químicos para a adubação fosfatada tem sido a utilização de inoculantes de MSP, em conjunto com rochas fosfatadas e adubo solúvel. A fim de estabelecer condições ótimas para a formulação de inoculantes com microrganismos solubilizadores de fósforo, foram testados dois tipos de veículos de inoculação e dois tipos de fosfato de rocha para adubação fosfatada de milho, utilizado como planta-teste, sendo cinco bactérias do gênero *Bacillus*, eficientes na solubilização *in vitro* de P, os inoculantes.

O uso de inoculantes, já bem estabelecido para a correção de nitrogênio (HUNGRIA et al., 2007), tem se mostrado uma alternativa interessante para a adubação fosfatada em diversas culturas (RAJAPAKSHA et al., 2011; HINSINGER, 2001). Para a aplicação destes inoculantes, a turfa tem sido largamente utilizada. Uma vez que a turfa é um recurso natural escasso, de difícil manuseio e composição variável, alguns trabalhos sugerem a avaliação de outros veículos a serem utilizados para a formulação de inoculantes. Neste trabalho, foram comparados carvão ativado e CMC com a finalidade de avaliar o potencial desses veículos na formulação de inoculantes.

A metodologia de inoculação utilizada (Figura 1), tanto para o CMC quanto para o carvão, foi eficiente para agregação do

inoculante à semente. Segundo Vincent (1970), para a produção de um inoculante em larga escala é necessário observar três pontos: a seleção da estirpe, o crescimento em meio líquido e a impregnação no suporte/veículo adequado previamente selecionado e tratado. Um bom veículo deve apresentar: abundância, baixo custo, favorecer o desenvolvimento e a sobrevivência do microrganismo, durante distribuição e armazenamento do produto, servir como meio nutritivo e não apresentar inibidores ao crescimento.

Aos 36 dias após germinação, diferenças visuais no crescimento das plantas foram observadas em função do tipo de veículo utilizado (CMC ou carvão ativado), bactéria inoculada e fosfato de rocha utilizado para o suprimento de P (Figuras 2 e 3). Na Figura 3, observamos o efeito da rocha no crescimento da parte aérea do milho, quando adubado com fosfato de Araxá e Itafós e inoculado com a estirpe B32.

Ao final do experimento, aos 45 dias, as plantas foram coletadas, e estes efeitos observados aos 36 dias foram confirmados pela análise de variância da matéria seca e pelo conteúdo de fósforo da parte aérea (Tabelas 1 e 2). Em geral, o crescimento da massa seca de milho variou em função do tipo de rocha e inoculante (Tabela 1). O efeito do tipo de veículo utilizado no processo de inoculação sobre o crescimento da planta de milho dependeu do tipo de fosfato de rocha e da bactéria inoculada. Para os tratamentos adubados com FI, o veículo carvão ativado foi o que acarretou maior média da matéria seca de milho ($p < 0,05$), independentemente do tipo de inoculante.

Diferenças estatísticas entre os tratamentos não inoculado e com inoculação ocorreram em função do tipo de veículo e da bactéria. No tratamento de milho formulado com a bactéria B70, CMC e adubado com FA, a matéria seca foi maior tanto em relação ao tratamento não inoculado (24%) quanto também em relação ao tratamento que recebeu o carvão como veículo de inoculação ($p < 0,05$). Os inoculantes B116 e B119, formulados com carvão, promoveram um aumento de 111% e 76% da biomassa de milho, respectivamente, com diferenças estatísticas em relação ao tratamento sem inoculação para o FI.

Os resultados encontrados para P total da parte aérea das plantas de milho, aos 45 dias, foram semelhantes aos encontrados para a matéria seca (Tabela 2). O conteúdo de P, em geral, variou com o tipo de rocha e inoculante. O efeito do tipo de veículo ocorreu dentro da interação com a rocha e/ou com a bactéria ($p < 0,05$).

Os inoculantes B70 e B119 proporcionaram um aumento significativo do conteúdo interno da planta em relação ao controle não inoculado, ou seja, o efeito destas bactérias não foi somente o de incremento ao crescimento, mas também o de promover maior acúmulo de P nos tecidos da parte aérea de milho. Este efeito também foi dependente do tipo de formulação e fosfato de rocha, ou seja, só ocorreu para o inoculante B70 formulado com CMC e adubação de FA e para B119 formulado com carvão e adubação com FI. Analisando diferentes formulações de CMC e amido para aplicação de bactérias diazotróficas endofíticas em cana-de-açúcar, da Silva et al. (2012) concluíram que, assim como em outros estudos anteriores, o melhor veículo para uma bactéria necessariamente não é o melhor para outra. No nosso caso, além do veículo

e tipo de bactéria utilizada como inoculante, o tipo de rocha parece influenciar no processo de promoção do crescimento e acúmulo de P na planta.

Para garantir a produtividade de grãos de milho é consumido, em média, numa única colheita, o equivalente a 33% de todo o P disponível. Como é difícil alterar a velocidade do ciclo biogeoquímico, no sentido de aumentar significativamente a taxa de formação de solo, torna-se necessário repor o P retirado pela colheita dos grãos de outra forma. O método predominantemente adotado pela agricultura moderna consiste na adubação química. Entretanto, uma das maneiras de retornar nutrientes ao solo, dentro do conceito da sustentabilidade, é o uso de inoculantes à base de microrganismos. Assim, os resultados aqui encontrados podem contribuir para o uso de metodologias eficientes na aplicação de microrganismos solubilizadores de fósforo em sementes e para a seleção de bactérias eficientes na solubilização do P para as plantas.

1. Isolamento, purificação e propagação da estirpe teste. a - Halo de solubilização

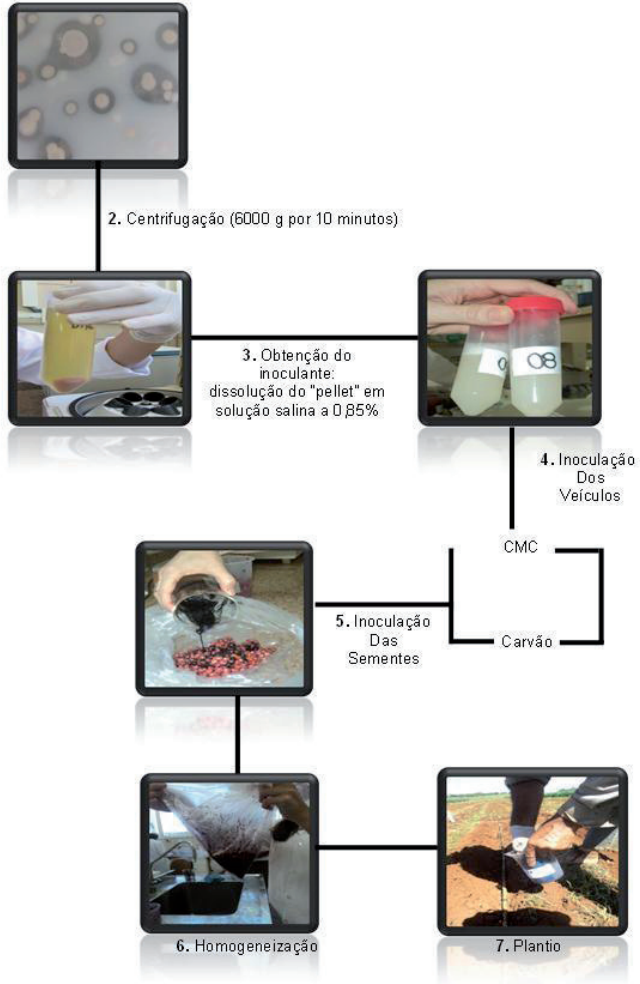
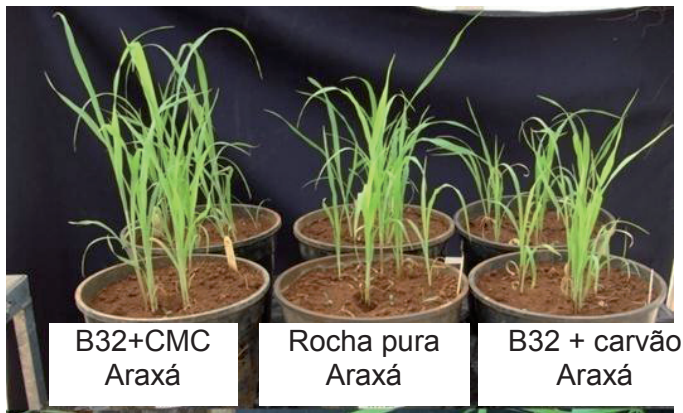
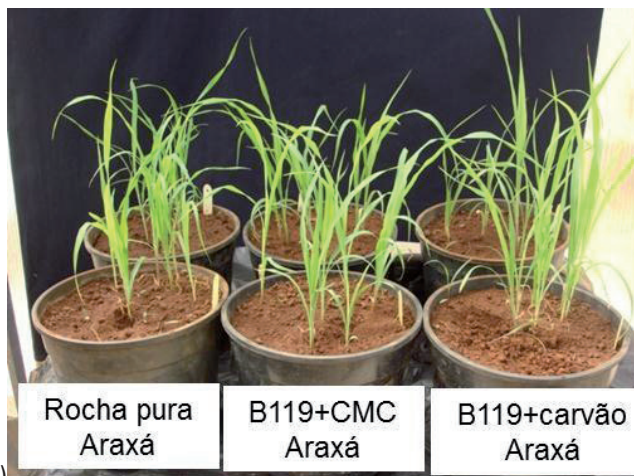


Figura 1. Metodologia de aplicação de microrganismos solubilizadores de fósforo (MSP) em sementes de milho, utilizando os veículos CMC e carvão ativado.



(A)



(B)

Figura 2. Crescimento de milho em casa de vegetação aos 36 dias após germinação, adubado como FA, como fonte de P e inoculado com a bactéria solubilizadora de fosfato B32 (A) e B119 (B), com dois métodos de aplicação do microrganismo, em carvão ativado e CMC.

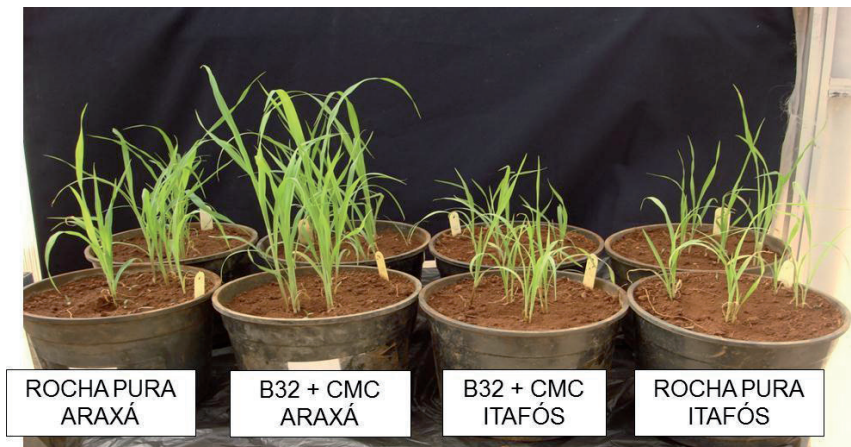


Figura 3. Crescimento de milho em casa de vegetação aos 36 dias após germinação, adubado com FA ou FI, como fonte de P e inoculado com a bactéria solubilizadora de fosfato B32, com dois métodos de aplicação do microrganismo, em carvão ativado e CMC.

Conclusão

A metodologia de aplicação de microrganismos solubilizadores de fósforo com diferentes veículos na formulação do inoculante permitiu ganhos significativos de produtividade da matéria seca de milho e acúmulo de fósforo da planta em função do tipo de rocha, veículo e bactéria com relação ao tratamento sem inoculantes.

O inoculante B70, formulado com CMC, e B119, formulado com carvão ativado, foram mais eficientes no aumento da massa seca de milho e acúmulo de fósforo na parte aérea.

O método de formulação com carvão ativado, em tratamentos adubados com FI, em geral, teve maior efeito no aumento da massa seca de milho em relação ao CMC.

Tabela 1. Produtividade da matéria seca de milho (g.vaso⁻¹) aos 45 dias de cultivo em casa de vegetação, com adubação dos fosfatos de rocha Araxá e Itafós em combinação com cinco tipos de inoculantes de bactérias solubilizadoras de P e dois tipos de veículos de inoculação, carboxi-metil celulose (CMC) e carvão ativado.

Inoculantes	Matéria Seca ¹ g.vaso ⁻¹					
	Fosfato de Araxá		Média	Fosfato de Itafós		Média
	CMC	Carvão	2,73B	CMC	Carvão	1,09A
Sem inoculação	3,00aA	3,00bA		0,95aA	0,95aA	1,97b
B30K	2,53aA	2,13aA		0,52aA	0,75aA	1,48a
B32	2,77aA	2,05aA		1,43aA	0,99aA	1,81b
B116	1,91aA	2,85bB		0,89aA	2,01bB	1,91b
B70	3,72bB	2,82bA		0,67aA	1,31aA	2,13b
B119	2,66aA	3,32bA		0,91aA	1,68bA	2,14b
Médias	2,76A	2,70A		0,90A	1,28B	
Média geral (Veículos)	CMC		1,83A	Carvão		1,99A
CV (%)	30,29					

¹Médias de quatro repetições, seguidas de mesma letra minúscula entre linhas e maiúscula entre colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Conteúdo de P da parte aérea de milho aos 45 dias de cultivo em casa de vegetação, com adubação dos fosfatos de rocha Araxá e Itafós, em combinação com cinco tipos de inoculantes de bactérias solubilizadores de P e dois tipos de veículos de inoculação, carboxi-metil celulose (CMC) e carvão ativado.

Inoculantes	Conteúdo de fósforo (Parte aérea) ¹					
	mg.vaso ⁻¹					
	Fosfato de Araxá		Fosfato de Itafós		Média	
	CMC	Carvão	CMC	Carvão	4,77B	1,77A
Sem inoculação	5,13aA	5,13bA	1,57aA	1,57aA		3,35b
B30K	4,91aB	3,31aA	0,89aA	1,16aA		2,56a
B32	5,11aB	3,38aA	2,27aA	1,42aA		3,04a
B116	3,80aA	4,96bA	1,66aA	3,21aA		3,41b
B70	6,52bB	4,77bA	1,11aA	2,13aA		3,63b
B119	4,76aA	5,45bA	1,53aA	2,75bA		3,62b
Médias	5,03A	4,50A	1,51A	2,04A		
Média geral (Veículos)	CMC		Carvão		3,26A	3,25A
CV (%)	31,93%					

¹Médias de quatro repetições, seguidas de mesma letra minúscula entre linhas e maiúscula entre colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Agradecimentos

À Fapemig e ao CNPq, pelo apoio financeiro. À Embrapa Milho e Sorgo.

Referências

BUCHER, C. A.; REIS, V. M. **Biofertilizante contendo bactérias diazotróficas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 17 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 247).

DEAKER, R.; ROUGHLEY, R. J.; KENNEDY, I. R. Legume seed inoculation technology: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, n. 8, p. 1275-1288, 2004.

FERNANDES JÚNIOR, P. I. **Composições poliméricas a base de carboximetilcelulose (CMC) e amido como veículos de inoculação de rizobio em leguminosas**. 2006. 43 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; ROHR, T. G.; OLIVEIRA, P. J. de; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Polymers as carriers for rhizobial inoculant formulations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, p. 1184-1190, 2009.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.

FREIRE, J. R. J. Trabalhos em rizobiologia no Rio Grande do Sul. In: REUNIÃO LATINO AMERICANA. INOCULANTES

LEGUMINOSA, 4., 1968, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: [s.n.], 1968. p. 19-24.

GOLDSTEIN, A.; LESTER, T.; BROWN, J. Research on the metabolic engineering of the direct oxidation pathway for extraction of phosphate from ore has generated preliminary evidence for PQQ biosynthesis in *Escherichia coli* as well as a possible role for the highly conserved region of quinoprotein dehydrogenases. **Biochemistry et Biophysics Acta**, Amsterdam, v. 1647, p. 266-271, 2003.

GREINER, R. Phytate-degrading enzymes: regulation of synthesis in microorganisms and plants. In: TURNER, B. L.; RICHARDSON, A. E.; MULLANEY, E. J. (Ed.). **Inositol phosphates: linking agriculture and environment**. London: CAB International, 2006. p. 78-96.

HINSINGER, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. **Plant and Soil**, The Hague, v. 237, p. 173-195, 2001.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica de nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80 p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).

JORGUERA, M. A.; CROWLEY, D. E.; MARSCHNER, P.; GREINER, R.; FERNANDEZ, M. T.; ROMERO, D.; MENEZES-BLACKBURN, D.; MORA, M. L. Identification of propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. from

the rhizosphere of pasture plants on volcanic soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 75, p. 163-172, 2011.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; AHMED, M.; OVES, M.; WANI, P. A. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi - current perspective. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 56, n. 1, p. 73-98, 2010.

MANDER, C.; WAKELIN, S.; YOUNG, S.; CONDRON, L.; O'CALLAGHAN, M. Incidence and diversity of phosphate-solubilizing bacteria are linked to phosphorus status in grassland soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 44, p. 93-101, 2012.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J.; NUNES, F. N. Fósforo. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 471-550

OGBO, F. C. Conversion of cassava wastes for biofertilizer production using phosphate solubilizing fungi. **Bioresource Technology**, Essex, v.101, p. 4120-4124, 2010.

OLIVEIRA, C. A.; ALVES, V. M. C.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; SCOTTI, M. R. S. M.; CARNEIRO, N. M.; GUIMARÃES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; SÁ, N. M. A. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian cerrado biome. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 25, p. 1-6, 2009.

PANDEY, P.; MAHESHWARI, D. K. Bioformulation of *Burkholderia* sp. MSSP with a multispecies consortium for growth promotion of *Cajanus cajan*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, p. 213-222, 2007.

RAJAPAKSHA, R. M. C. P.; HERATH, D.; SENANAYAKE, A. P.; SENEVIRATHNE, M. G. T. L. Mobilization of rock phosphate phosphorus through bacterial inoculants to enhance growth and yield of wetland rice. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 42, n. 3, p. 301-314, 2011.

RHOR, T. G. **Estudo reológico da mistura carboximetilcelulose/ amido e sua utilização como veículo de inoculação bacteriano**. 2007. 124 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

RICHARDSON, A. E.; BAREA, J.; MCNEILL, A. M.; PRIGENT-COMBARET, C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, The Hague, v. 321, p. 305-339, 2009.

SILVA, F. C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia; Rio de Janeiro: Embrapa Solos; Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 1999. 370 p.

SILVA, M. F.; ANTÔNIO, C. de S.; OLIVEIRA, P. J. de; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; SOARES, L. H. de B.; REIS, V. M. Survival of endophytic bacteria in polymer-based inoculants and efficiency of their application to sugarcane. **Plant and Soil**, The Hague, v. 356, p. 231-243, 2012.

SILVA, U. de C. **Prospecção da diversidade de comunidade microbiana do solo para o aproveitamento agrícola de fontes de fósforo de baixa solubilidade.** Sete Lagoas: UNIFEMM, 2010.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Methods in legume: rhizobium technology.** Hawaii: University of Hawaii Niftal, 1985.

STEPHENS, J. H. G.; RASK, H. Inoculant production and formulation. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 249-258, 2000.

STOCKDALE, E. A.; SHEPARD, M. A.; FORTUNE, S.; CUTTLE, S. P. Soil fertility in organic farming systems: fundamentally different? **Soil Use and Management**, Oxford, v. 18, p. 301-308, 2002.

VASSILEVA, M.; SERRANO, M.; BRAVO, V.; JURADO, E.; NIKOLAEV, I.; A.; MARTOS, V.; VASSILEV, N. Multifunctional properties of phosphate-solubilizing microorganisms grown on agro-industrial wastes in fermentation and soil conditions. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 85, p. 1287-1299, 2010.

WHITELAW, M. A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 69, p. 99-151, 2000.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

