

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 43

ISSN 1679-0154
Dezembro, 2011

Efeito da inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato sobre o crescimento de milho (*Pennisetum glaucum*) fertilizado com fosfato de rochas



ISSN 1679-0154

Dezembro, 2011

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Nome-síntese da Unidade Responsável
Nome completo do ministério da agricultura*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 43

***Efeito da inoculação de
bactérias solubilizadoras de
fosfato sobre o crescimento de
milheto (Pennisetum glaucum)
fertilizado com fosfato de
rochas***

Eliane Aparecida Gomes
Christiane Abreu de Oliveira Paiva
Fernanda Elisa Soares Dias
Flavia Cristina dos Santos
Ivanildo Evódio Marriel

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2011

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: sac@cnpms.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Antônio Carlos de Oliveira

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo

Afonso Viana, João Herbert Moreira Viana, Guilherme Ferreira

Viana e Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento de ilustrações: Alexandre Esteves Neves

Editoração eletrônica: Alexandre Esteves Neves

Foto(s) da capa:

1ª edição

1ª impressão (2011): 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**

Efeito da inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato sobre o crescimento de milheto (*Pennisetum glaucum*) fertilizado com fosfato de rochas / Eliane Aparecida Gomes ... [et al.]. -- Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011.

24 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 43).

1. Microbiologia do solo. 2. Adubação. 3. Solo. I. Gomes, Eliane Aparecida. II. Série.

CDD 631.46 (21. ed.)

© Embrapa 2011

Sumário

Introdução	4
Material e Métodos	6
Resultados e Discussão	8
Referências	18

Efeito da inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato sobre o crescimento de milho (*Pennisetum glaucum*) fertilizado com fosfato de rochas

Eliane Aparecida Gomes¹

Christiane Abreu de Oliveira Paiva²

Fernanda Elisa Soares Dias³

Flavia Cristina dos Santos⁴

Ivanildo Evódio Marriel⁵

Introdução

As atividades agrícolas apresentam destaque na economia nacional pela sua participação no PIB (Produto Interno Bruto), pela geração de empregos diretos e indiretos e no saldo da balança comercial do País. Contudo, o agronegócio brasileiro apresenta alta dependência do mercado externo para obter o suprimento dos fertilizantes utilizados na produção de alimentos, fibras e bioenergia. Atualmente, cerca de 50% dos fertilizantes fosfatados utilizados são importados, o que compromete a sustentabilidade da agricultura (BRASIL, 2009).

Dentre os macronutrientes requeridos pelas culturas, o fósforo (P) é o que mais limita a produtividade agrícola, principalmente nos trópicos, devido à sua baixa disponibilidade nos solos (SOUZA et al., 2004; NOVAIS et al., 2007). Em razão das características químicas destes solos, especialmente os de Cerrado, apenas 10 a 20% do total de fer-

¹Bióloga, Ph.D., Pesquisadora em Microbiologia da Embrapa Milho e Sorgo, eliane@cnpms.embrapa.br

²Engenheira Agrônoma, Doutora, Pesquisadora em Microbiologia, Embrapa Milho e Sorgo, christiane.paiva@cnpms.embrapa.br

³Estudante de Ciências Biológicas, Centro Universitário de Sete Lagoas (UNIFEMM)

⁴Engenheira Agrônoma, D.Sc. em Solos e Nutrição de Plantas, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, fsantos@cnpms.embrapa.br

⁵Engenheiro Agrônomo, Doutor. Pesquisador em Microbiologia, Embrapa Milho e Sorgo, imarriel@cnpms.embrapa.br

tilizantes fosfatados adicionados ao solo são, efetivamente, utilizados pelos vegetais (VANCE et al., 2003). Este nutriente, quando absorvido em baixas concentrações compromete o rendimento das culturas por participar ativamente do fluxo e estoque de energia celular das plantas (STAUFFER; SULEWSKI, 2004), além de ser um constituinte fundamental de biomoléculas, como ácidos nucleicos e ATP.

As aplicações indiscriminadas e excessivas de fertilizantes fosfatados químicos podem ter efeitos negativos sobre a sustentabilidade da agricultura e a segurança do solo e do meio ambiente. Diante disso, são necessárias estratégias alternativas para que os produtores rurais possam garantir rendimentos competitivos, mantendo o estoque de nutrientes dos solos (KHAN et al., 2010). Dentre estas estratégias, ênfase tem sido dada à utilização das formas de P contidas nos fosfatos de rocha, que, apesar de apresentarem baixa solubilidade, a biodisponibilidade do nutriente para as plantas pode ser incrementada na presença de microrganismos solubilizadores de P (MSP) (RAJANKAR et al., 2007; BOJINOVA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009).

Os microrganismos solubilizadores de fosfatos, aliados ou não a outros microrganismos benéficos do solo, podem aumentar a taxa de crescimento das plantas (CHABOT et al., 1993; KIM et al., 1998; SINGH; KAPOOR, 1999), por apresentarem a capacidade de solubilização de fosfatos existentes no solo ou adicionados na forma de fertilizantes (WHITELAW, 2000; RICHARDSON, 2009). Além disso, a inoculação com microrganismos solubilizadores de P pode promover o crescimento das plantas pela liberação de hormônios, solubilização de outros nutrientes, como K, além de apresentarem efeito comprovado na interação com micorrizas, fixadores de nitrogênio e promotores de crescimento vegetal (MEDINA et al., 2006; KHAN et al., 2007; RICHARDSON, 2009; VASSILEVA et al., 2010). Apesar de MSP ocorrerem no solo, frequentemente seu número não é suficiente para competirem com outros microrganismos estabelecidos na rizosfera, sendo a quantidade de P liberada por eles insuficiente para um aumento substancial do crescimento vegetal. Dentro deste contexto, a incorpo-

ração de microrganismos específicos como inoculantes de sementes (biofertilizantes), em associação com fontes de P de baixa solubilidade e/ou resíduos orgânicos, pode favorecer a mobilização de nutrientes para as plantas (ILLMER et al., 1995; KIM et al., 1998; WHITELAW, 2000; GOLDSTEIN et al., 2003).

O uso de inoculantes microbianos é considerado uma alternativa ambientalmente correta com relação às aplicações de fertilizantes químicos (KHAN et al., 2010). Biofertilizantes são de baixo custo, são fontes renováveis de nutrientes para as plantas e podem atender a demandas da agricultura orgânica e familiar, pois reduzem o custo de produção. Os biofertilizantes podem ser usados tanto para o tratamento de sementes quanto em aplicação direta no solo.

O uso de microrganismos associados a uma fonte de P de baixa solubilidade, como as rochas naturais, tem tido sucesso em várias culturas com ganhos em produção e crescimento, como alfafa (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999), trigo (WHITELAW, 2000; KHAN et al., 2007), gramíneas e milho (NAHAS et al., 1994b), cana-de-açúcar (STAMFORD et al., 2004), além de milho e trigo em solos alcalinos (SINGH; REDDY, 2011). A grande vantagem deste uso conjunto é a exploração de fontes renováveis para fertilização com P (GOLDSTEIN et al., 1999; KHAN et al., 2007), diminuição dos custos e uso alternativo de rochas dispensáveis para a indústria de fertilizantes, por conterem alto grau de impurezas.

Embora a inoculação de microrganismos solubilizadores de P tenha como resultado um aumento no crescimento e na produtividade de diferentes culturas, resultados indicando a utilização de fosfato de rocha como fertilizante junto com os MSP são escassos (SINGH; REDDY, 2011), necessitando de mais investigações.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inoculação de bactérias solubilizadoras de P sobre o crescimento e a absorção de P do milheto, adubado com fosfato de Araxá e fosfato de Itafós, sob condições controladas. Foram avaliados dois métodos de inoculação, um de forma

direta na semente e outro indireto, pelo pré-processamento da rocha *in vitro* com os microrganismos.

Material e Métodos

O efeito da inoculação de microrganismos na biodisponibilização de fósforo para o milho (*Pennisetum glaucum*), variedade BRS 1501, foi avaliado em dois experimentos de casa de vegetação na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os tratamentos constituíram-se do solo adicionado de dois fosfatos de rocha naturais (Araxá e Itafós), com e sem inoculação das duas estirpes de bactérias. Foram acrescentados também, como tratamentos controle, o solo adicionado de superfosfato triplo e o solo virgem, na presença e ausência das duas estirpes de bactérias, totalizando 12 tratamentos para cada experimento de inoculação.

Foram utilizados dois métodos diferentes de inoculação de MSP: um método com inoculação direta de MSP nas sementes e um método de inoculação de forma indireta, em que as rochas fosfato de Araxá e fosfato de Itafós, utilizadas para a adubação, foram pré-incubadas com os microrganismos para a produção de inoculantes. As bactérias utilizadas como inóculo foram *Bacillus pumilus* (CMMSB32) e *B. subtilis* (CMMSB70) pertencentes à coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo, pré-selecionadas *in vitro* quanto ao potencial de solubilização de P (OLIVEIRA et al., 2009; SILVA, 2010).

No primeiro experimento, para a inoculação direta nas sementes, os microrganismos 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. Para obtenção dos inóculos, os microrganismos foram transferidos para meio de cultura líquido Tryptona de Soja, sendo cultiva-

dos por três dias, a 28°C sob agitação. Em seguida, centrifugou-se a cultura a 4.200 rpm por 10 minutos, descartou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* com solução salina 0,85%. O *pellet* foi ressuspenso novamente em solução salina e o volume ajustado para densidade ótica igual a 1 ($\lambda = 540 \text{ nm}$), correspondente a 10^9 células.mL⁻¹ de inóculo. Em um solo previamente incorporado com 5 g de cada uma das rochas, separadamente, foram adicionados 2 mL do inóculo obtido de cada bactéria por cova (duas sementes) no momento de plantio, totalizando 20 mL de inóculo por vaso (10^9 células.semente⁻¹).

No segundo experimento, o método de inoculação foi de forma indireta, ou seja, as rochas utilizadas para a adubação foram pré-incubadas *in vitro* com os microrganismos. Cerca de 5 g de cada rocha em estudo, fosfato de Araxá e fosfato de Itafós, foram adicionadas a 250 mL de meio de cultura líquido NIBRIP (NAUTIYAL, 1999), contendo glicose (10g L⁻¹), Ca₃(PO₄)₂ (2,5g L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (0,10g L⁻¹), KCl (0,2g L⁻¹), MgCl₂.6H₂O (5g L⁻¹) e MgSO₄.7H₂O (0,25g L⁻¹). As bactérias CMMSB32 e CMMSB70, reativadas em meio sólido como no primeiro experimento, foram transferidas para o meio líquido contendo a rocha e incubadas por 10 dias, em temperatura de 28°C, sob agitação. A suspensão contendo as rochas bioprocessadas foi incorporada ao solo no momento do plantio de acordo com cada tratamento.

Os dois experimentos foram conduzidos simultaneamente, com mesma época de plantio e coleta. Nos dois experimentos, foram realizados três cultivos consecutivos, sendo o segundo e o terceiro cultivo para avaliar o efeito residual dos tratamentos com fosfato de rocha. Utilizaram-se vasos de 4 kg de um Latossolo Vermelho Distrófico, coletado em uma área de Cerrado da Embrapa Milho e Sorgo, com baixo teor de P (Tabela 1). Trinta dias antes do plantio, foram realizadas a calagem e a adubação com solução nutritiva, com base na análise química do solo, com exceção do fósforo.

Tabela 1. Análise química do solo utilizado para o experimento em vaso

pH _{H₂O}	P _{Mehlich-1}	K	Ca	Mg	Al	H + Al	SB ⁺	V ⁺⁺	MO
-	mg dm ⁻³				cmol _c dm ⁻³			%	dag kg ⁻¹
5,24	2,17	30,33	2,47	0,20	0,37	9,07	2,74	23,23	5,97

⁺SB: soma de bases; ⁺⁺V: saturação de bases; MO: matéria orgânica (SILVA, 1999).

Para a adubação fosfática foram utilizadas as rochas Araxá e Itafós e superfosfato triplo na dose de 300 mg P .cm⁻³ solo, distribuídos de acordo com cada tratamento.

Após a incubação do solo, foram semeadas 20 sementes de milho por vaso. Aos oito dias após a semeadura, efetuou-se o desbaste, deixando-se 10-12 plantas/vaso. Aos 20 dias após o plantio, os nutrientes foram reaplicados com solução nutritiva meia-força (SOMASEGARAN; HOBEN, 1985). Aos 40 dias após a germinação, na fase de pré-florescimento, cortou-se a parte aérea das plantas e no último plantio foram coletadas a parte aérea, a raiz e o solo para análises químicas.

A massa seca da parte aérea (MSPA) foi obtida após a secagem em estufa com circulação forçada de ar, sob temperatura de 65 °C, até atingir massa constante. Os mesmos procedimentos foram observados no segundo e terceiro cultivos. Análises químicas das plantas de milho foram realizadas para determinação dos teores de fósforo (SILVA, 1999) na parte aérea e nas raízes, após a moagem do material em moinho tipo Willey. Posteriormente, calculou-se o conteúdo de fósforo em cada tratamento, pelo total de massa seca de plantas em cada vaso. A disponibilidade de P no solo foi determinada após extração com a solução Mehlich 1 e os outros nutrientes, segundo Silva (1999).

Os dados foram submetidos à análise de variância, 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

Para avaliar o efeito de dois tipos de inoculação de microrganismos solubilizadores de P na adubação fosfatada, o milheto foi cultivado em casa de vegetação em solo adicionado das rochas fosfato de Araxá e fosfato de Itafós. Foram realizados três cultivos consecutivos, sob condições controladas, utilizando-se dois tipos de inoculação: inoculação direta de microrganismos solubilizadores de P na semente e inoculação indireta com um bioprocessamento prévio das rochas em meio de cultura. Para isso foram selecionadas duas bactérias solubilizadoras de P, *Bacillus subtilis* (CMMSB70) e *B. pumilus* (CMMSB32), da Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo. Em estudos anteriores, estas bactérias apresentaram alta taxa de solubilização de fosfato de Araxá *in vitro*, 16,91% e 18,62% do total de P (CMMSB70 e CMMSB32, respectivamente), após 10 dias de crescimento a 28 °C (SILVA, 2010). Porém, estas mesmas bactérias não foram eficientes na solubilização de Itafós em meio de cultura: 3,21% para CMMSB70 e 2,10% para CMMSB32.

A matéria seca da parte aérea das plantas dos três cultivos dos dois tipos de experimentos está apresentada na Tabela 2. De modo geral, no segundo cultivo, a inoculação direta nas sementes no momento do plantio resultou em tendência de maior acúmulo de massa seca na parte aérea das plantas (MSPA) com relação às plantas cultivadas somente com rochas puras, diferença que não foi observada no primeiro e no terceiro cultivos. No segundo cultivo, no tratamento com fosfato de Araxá e inoculação da bactéria CMMSB32 diretamente nas sementes, a MSPA foi de 10,08 g vaso⁻¹, valor significativamente maior que o tratamento-controle com a rocha pura sem inoculação ou o tratamento com inoculação de CMMSB70. Além disso, na presença de Itafós no solo, o milheto inoculado com CMMSB32 ou CMMSB70 apresentou valores de MSPA significativamente maiores que a rocha sem inoculação (Tabela 2). Estes valores significam incrementos de 24,6%, 31,8% e 41,25% na produção relativa de biomassa da parte aérea de milheto cultivado em solo com fosfato de Araxá inoculado com CMMSB32 e

fosfato de Itafós inoculado com CMMSB32 e CMMSB70, respectivamente (Figura 1). Isso indica que com o tempo houve efeito residual das rochas inoculadas com MSP e demonstra importância da pesquisa de novas fontes de fertilizantes fosfatados de solubilização mais lenta, onde ocorre um aumento gradual da disponibilidade de P (NOVAIS; SMYTH, 1999), principalmente se associado a microrganismos solubilizadores de P. Alguns resultados demonstram um incremento de 25% na produção de matéria seca, e de 52% na absorção de P em trigo cultivado com fosfato de rocha, inoculado com *Penicillium radicum*, em comparação com as testemunhas, em experimentos de casa de vegetação e de campo (WHITELAW, 2000).

Tabela 2. Produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) após três cultivos de milho em resposta à inoculação de bactérias solubilizadoras de P diretamente na semente e inoculação indireta com bioprocessamento das rochas fosfato de Araxá e fosfato de Itafós

Tratamentos	MSPA	MSPA	MSPA	MSPA
	1º cultivo	2º cultivo	3º cultivo	Soma *
	g vaso ⁻¹	g vaso ⁻¹	g vaso ⁻¹	g vaso ⁻¹
Inoculação direta				
Sem rocha + sem inóculo	1,63 a**	1,84 e	2,11 c	5,58 c
Sem rocha + B32	1,68 d	1,63 e	1,91 c	5,23 c
Sem rocha + B70	0,77 d	1,93 e	1,63 c	4,33 c
0 S T + sem inóculo	40,91 a	1,80 e	17,50 a	60,22 a
ST + B32	36,74 b	1,69 e	23,25 a	61,68 a
ST + B70	37,50 b	1,54 e	20,94 a	59,98 a

Tratamentos	MSPA	MSPA	MSPA	MSPA
	1º cultivo	2º cultivo	3º cultivo	Soma*
	g vaso ⁻¹	g vaso ⁻¹	g vaso ⁻¹	g vaso ⁻¹
Araxá + sem inóculo	4,08 c	8,09 b	9,66 b	21,84 b
Araxá + B32	4,03 c	10,08 a	9,90 b	24,02 b
Araxá + B70	3,64 c	7,99 b	7,61 b	19,25 b
Itafós + sem inóculo	3,07 c	4,97 d	8,04 b	16,08 b
Itafós + B32	3,29 c	6,55 c	8,64 b	18,48 b
Itafós + B70	2,87 c	7,02 c	8,35 b	18,25 b
Inoculação indireta				
Sem rocha + sem inóculo	1,65 c	1,48 c	2,82 c	5,96 c
Sem rocha + B32	0,56 c	1,48 c	2,08 c	4,12 c
Sem rocha + B70	1,06 c	1,84 c	2,40 c	5,31 c
ST + sem inóculo	33,5 b	15,87 a	22,92 a	72,37 a
ST + B32	40,48 a	14,64 a	20,94 a	76,07 a
ST + B70	37,23 a	16,78 a	20,52 a	74,53 a
Araxá + sem inóculo	2,10 c	5,42 b	7,73 b	15,27 b
Araxá + B32	1,75 c	6,00 b	6,58 b	14,35 b

Tratamentos	MSPA	MSPA	MSPA	MSPA
	1º cultivo	2º cultivo	3º cultivo	Soma *
	g vaso ⁻¹	g vaso ⁻¹	g vaso ⁻¹	g vaso ⁻¹
Araxá + B70	2,00 c	5,74 b	8,10 b	15,85 b
Itafós + sem inóculo	1,84 c	4,59 b	7,55 b	13,98 b
Itafós + B32	2,00 c	4,32 b	8,17 b	14,50 b
Itafós + B70	1,22 c	5,92 b	7,20 b	14,34 b

ST = superfosfato triplo; * Média da soma da matéria seca da parte aérea em gramas das três coletas; ** Valores seguidos por diferentes letras são estatisticamente diferentes ($P \leq 0,05$).

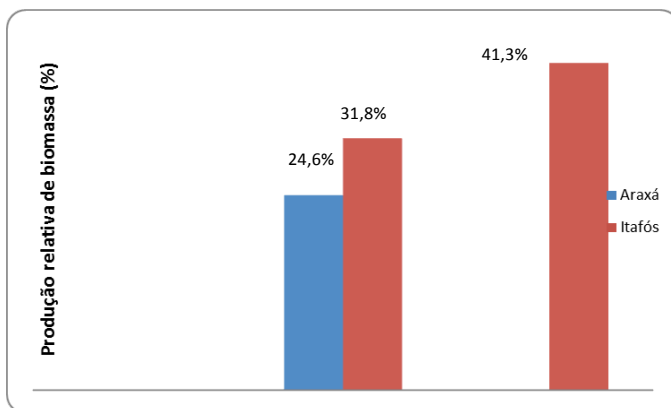


Figura 1. Comparação da produção relativa de biomassa (%) da parte aérea de milho cultivado com dois tipos de rochas sem inoculação (controle) e com inoculação das bactérias CMMSB32 e CMMSB70. Resultados relativos ao segundo cultivo do ensaio com inoculação direta na semente.

Efeito positivo semelhante também foi observado com a inoculação com o fungo *P. oxalicum* em experimentos de campo (SINGH; REDDY,

2011). Estes autores observaram aumento no crescimento, produção e conteúdo de P de trigo e milho cultivados em sucessão em solos corrigidos com fosfato de rocha.

Com relação à MSPA do milho cultivado com Itafós e inoculação de forma indireta (bioprocessamento prévio da rocha), não ocorreu diferença significativa entre o tratamento inoculado com a estirpe B70 e o de rocha sem inoculação, embora o ganho de massa tenha sido de 29% onde ocorreu a inoculação (Tabela 2). Tais resultados provavelmente se devem ao fato de que a solubilidade depende da granulometria do fosfato ou de sua origem, sendo os fosfatos de rocha de origem sedimentar, como o de Itafós, mais solúveis do que os fosfatos de origem ígnea ou metamórfica (HAMMOND et al., 1986), como o fosfato de Araxá.

Nos demais cultivos dos dois experimentos, com inoculação direta na semente ou inóculo bioprocessado, não houve diferença significativa no teor de MSPA entre os tratamentos comparados com os controles com a rocha pura e com adubação solúvel de superfosfato triplo (Tabela 2).

No primeiro cultivo, a adição de superfosfato triplo favoreceu o crescimento das plantas, pois neste caso, o P encontra-se numa forma prontamente assimilável pelas plantas (HPO_4^{2-} ou $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$), o que não ocorre com as demais fontes (RAIJ, 1991). No segundo cultivo, porém, como não houve suplementação de superfosfato triplo, as rochas fosfáticas Araxá e Itafós, contribuíram para o maior crescimento da parte aérea do milho em relação ao superfosfato triplo e ao controle, com diferença significativa para os dois ensaios.

No segundo cultivo, porém, como não houve suplementação de superfosfato triplo, as rochas fosfáticas Araxá e Itafós, contribuíram para o maior crescimento da parte aérea do milho em relação ao superfosfato triplo e ao controle, com diferença significativa para os dois ensaios.

No segundo cultivo do ensaio com inoculação direta na semente houve um aumento no conteúdo de P da parte aérea (mg P/vaso) nos trata-

mentos onde ocorreu inoculação das bactérias (Tabela 3). No entanto, estas diferenças não foram estatisticamente significantes a 5% de probabilidade. Este aumento foi de 12,62% em rocha Itafós com CMMSB32 e de 33,5% para Itafós com CMMSB70 (Figura 2), em relação ao tratamento com a rocha pura. Para os tratamentos com fosfato de Araxá, não foi observada diferença significativa com a bactéria CMMSB32 e houve uma diminuição do conteúdo de P quando o inóculo foi feito com CMMSB70. A soma dos três cultivos no experimento de inoculação direta na semente também resultou em aumento no conteúdo relativo de P da parte aérea quando a rocha fosfato de Itafós foi adicionada ao solo. Neste caso, o aumento no conteúdo relativo de P foi de 15,86% para CMMSB32 e de 24,75% para CMMSB70 (Tabela 3). Os fosfatos de alta reatividade, sendo mais prontamente disponíveis, favorecem a absorção e o aproveitamento do P, principalmente pelas culturas de ciclo curto (BEDIN et al., 2003). Isto indica que o aumento da biodisponibilidade de fósforo para as plantas de milheto dependeu da estirpe de bactéria e da rocha.

Apesar de vários microrganismos apresentarem a capacidade de solubilização de P *in vitro*, alguns autores observaram variações no desempenho desses microrganismos *in situ*, em experimentos de casa de vegetação e no campo (KHAN et al., 2007). Segundo estes autores, embora estas bactérias solubilizem fosfato de rocha *in vitro*, esta capacidade pode ser afetada no solo, uma vez que a colonização do solo e das raízes das plantas por microrganismos inoculados depende da interação com a microbiota nativa do solo e sua capacidade de utilizar diversos substratos no solo (KHAN et al., 2007).

Para compensar este fato, os processos de formulação de inoculantes e produção de biofertilizantes envolvem o teste de estirpes candidatas e de veículos/formulações que sejam eficientes na manutenção da sobrevivência dos microrganismos, bem como baixo custo e outras características desejáveis. Nesse contexto, polímeros como carboximetilcelulose e amido têm sido os mais utilizados com veículos inoculantes, pois

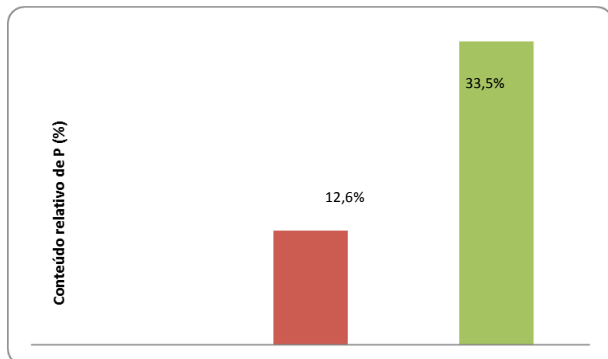


Figura 2. Comparação do conteúdo relativo de P (%) da parte aérea de milheto cultivado com fosfato de Itafós sem inoculação (controle) e com inoculação das bactérias CMMSB32 e CMMSB70. Resultados relativos ao segundo cultivo do ensaio com inoculação direta na semente.

são apropriados para proteger o microrganismo contra estresses ambientais e ao mesmo tempo prolongar sua atividade no solo, na rocha ou nos resíduos associados (FERNANDES JÚNIOR et al., 2009; ROHR, 2007).

Além disso, o aumento na MSPA, como uma consequência da inoculação microbiana, pode não necessariamente estar associada à solubilização de P, comumente observada sob condições de laboratório. Neste caso, outros mecanismos, tais como produção de hormônios de crescimento, como ácido indol acético, que atuam na promoção do crescimento das plantas, vitaminas e aminoácidos, podem estar envolvidos nos efeitos dos microrganismos solubilizadores de P (RICHARDSON, 2009; MITTAL et al., 2008).

Freitas et al. (1997) também observaram que inoculantes de *Bacillus* e *Xanthomonas* aumentaram o crescimento, mas não a absorção de P de canola (*Brassica napus*), sugerindo que a resposta das plantas a estas bactérias pode estar associada à produção de hormônio de crescimento e não pela solubilização de P. Neste trabalho, o inoculante mais eficiente foi um isolado de *B. thuringiensis* que aumentou signi-

Tabela 3. Disponibilidade de P no solo após três cultivos de milho, teor e acúmulo de P na parte aérea e na raiz, em resposta à inoculação de bactérias solubilizadoras de P diretamente na semente e inoculação indireta com bioprocessamento das rochas fosfato de Araxá e fosfato de Itafós

Tratamentos	P solo final do experimento** mg dm ⁻³	Teor P		Teor P		Teor P		Teor P raiz		Acúmulo P		Acúmulo P		Acúmulo P	
		parte aérea 1º cultivo g kg ⁻¹	parte aérea 2º cultivo g kg ⁻¹	parte aérea 3º cultivo g kg ⁻¹	parte aérea 1º cultivo g kg ⁻¹	parte aérea 2º cultivo g kg ⁻¹	parte aérea 3º cultivo g kg ⁻¹	soma g kg ⁻¹	1º cultivo mg vaso ⁻¹	2º cultivo mg vaso ⁻¹	3º cultivo mg vaso ⁻¹	parte aérea 1º cultivo mg vaso ⁻¹	parte aérea 2º cultivo mg vaso ⁻¹	parte aérea 3º cultivo mg vaso ⁻¹	soma mg vaso ⁻¹
Inoculação direta															
Testemunha [†]	2,1	0,93 b***	0,91 a	1,04 b	1,05 b	1,51 b	1,05 b	1,51 b	1,83 c	2,28 c	5,62 c				
ST + sem inóculo	28	1,03 b	6,10 a	4,26 a	1,16 b	42,87 a	1,16 b	42,87 a	11,79 a	36,83 a	91,49 a				
Araxá + sem inóculo	37	1,26 a	1,28 b	1,25 b	1,06 b	5,28 b	1,06 b	5,28 b	9,87 a	11,68 b	26,83 b				
Araxá + B32	35	1,32 a	0,99 b	1,23 b	1,03 b	5,29 b	1,03 b	5,29 b	9,95 a	11,91 b	27,15 b				
Araxá + B70	22	1,27 a	0,92 b	1,03 b	1,45 b	4,69 b	1,45 b	4,69 b	7,68 a	8,04 b	20,41 b				
Itafós + sem inóculo	29	1,21 a	1,00 b	0,98 b	1,49 b	3,49 b	1,49 b	3,49 b	5,03 b	7,93 b	16,45 b				
Itafós + B32	22	1,31 a	0,86 b	1,04 b	1,20 b	4,15 b	1,20 b	4,15 b	5,67 b	9,24 b	19,06 b				
Itafós + B70	32	1,19 a	0,92 b	1,24 b	1,04 b	3,52 b	1,04 b	3,52 b	6,72 b	10,28 b	20,52 b				
Inoculação indireta															
Testemunha	2,6	1,11a	0,94 c	1,35 b	1,14 a	1,98 b	1,14 a	1,98 b	1,42 b	3,95 c	7,35 c				
ST + sem inóculo	25	1,04a	1,89 a	2,05 a	1,12 a	31,16 a	1,12 a	31,16 a	28,1 a	49,9 a	109,16 a				
Araxá + sem inóculo	23	1,20a	1,24 b	1,46 b	0,94 b	2,29 b	0,94 b	2,29 b	6,02 b	11,54 b	19,85 b				
Araxá + B32	16	1,31a	1,17 b	1,52 b	1,09 a	2,29 b	1,09 a	2,29 b	5,75 b	8,55 b	16,59 b				
Araxá + B70	33	1,39a	1,34 b	1,24 b	1,17 a	2,78 b	1,17 a	2,78 b	7,50 b	10,88 b	21,16 b				
Itafós + sem inóculo	35	1,34a	1,15 b	1,36 b	1,02 b	2,47 b	1,02 b	2,47 b	5,00 b	10,62 b	18,09 b				
Itafós + B32	39	1,16a	1,24 b	1,40 b	1,24 a	2,19 b	1,24 a	2,19 b	5,03 b	10,05 b	17,27 b				
Itafós + B70	32	1,39a	1,07 c	1,58 b	1,17 a	1,74 b	1,17 a	1,74 b	6,74 b	11,52 b	20,00 b				

[†]Testemunha = Sem rocha + sem inóculo

**P no solo no início do experimento foi igual 2,17 mg dm⁻³

***Valores seguidos por diferentes letras são estatisticamente diferentes (P ≤ 0,05).

ficantemente o número e o peso de vagem e a produção de sementes de canola, mesmo no tratamento sem fosfato de rocha. *X. maltophilia* aumentou a altura da planta, enquanto os outros isolados de *Bacillus* aumentaram o peso de vagem. Segundo estes autores, estes resultados demonstram o potencial de uso destas bactérias como inoculantes para canola, mas indicam que a solubilização de P não foi o mecanismo responsável pela resposta positiva do crescimento.

Por outro lado, outros autores demonstraram o potencial do uso de *Bacillus* solubilizadores de fosfato como inoculantes para plantas. Raj et al. (1981) observaram que inoculantes contendo *B. circulans* e *B. megaterium* var. *phosphaticum* aumentaram o peso e a absorção de P de milheto em estudos de câmara de crescimento. Similarmente, Gaiind e Gaur (1991) relataram que um inoculante de *B. subtilis* aumentou a biomassa, a produção de grãos e a absorção de P e de N de *Vigna radiata* (feijão-mungo-verde) cultivado em campo em um solo deficiente de P corrigido com fosfato de rocha. Em outro estudo, Datta et al. (1982) observaram que um isolado de *B. formus* solubilizador de P e produtor de ácido indol acético aumentou a produção de grãos e a absorção de P de arroz em um solo deficiente de P corrigido com fosfato de rocha.

Neste trabalho, a adição de fosfato de rocha ou de superfosfato triplo aumentou o teor de P no solo em comparação ao solo-controle sem adição de rocha (Tabela 3), não sendo observada, no entanto, diferença entre os tratamentos inoculados ou não inoculados. O pH do solo também sofreu uma ligeira elevação pela adição das fontes fosfatadas, não sendo observadas diferenças no pH do solo onde foi feita a inoculação dos microrganismos em comparação ao solo não inoculado. Alguns trabalhos relatam que a diminuição do pH favorece maiores níveis de solubilização do P devido à produção de ácidos orgânicos (EL-AZOUNI, 2008; SRIVIDYA et al., 2009).

Embora o mecanismo exato pelo qual microrganismos solubilizadoras de P estimulam o crescimento das plantas não seja claro, eles apre-

sentam potencial para uso como biofertilizantes. Os resultados desse trabalho demonstram que a solubilização de P depende da estirpe e do tipo de rocha utilizada, bem como da dinâmica entre as estirpes e a fonte de fósforo (SILVA, 2010). Estudos adicionais devem ser conduzidos visando examinar o efeito dessas bactérias solubilizadoras de P em casa de vegetação e em campo, utilizando veículos como turfa, carbóximetil celulose ou carvão para proteção das bactérias no solo, além de experimentos sob condições de campo para examinar seu impacto em genótipos de milho. Além disso, é importante avaliar a produção de fitohormônios e de enzimas, como fosfatases, liberadas por estes microrganismos.

Referências

BEDIN, I.; FURTINI NETO, A. E.; RESENDE, A. V.; FAQUIN, V.; TOKURA, A. M.; SANTOS, J. Z. L. Fertilizantes fosfatos e produção de soja em solos com diferentes capacidades tampão de fosfato. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 27, p. 639-646, 2003.

BOJINOVA, D.; VELKOVA, R.; IVANOVA, R. Solubilization of Morocco phosphorite by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, p. 7348-7353, 2008.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. **Oficina sobre fertilizantes no Brasil**. Brasília, 2009. Contrato Ministério de Ciência e Tecnologia e Centro de Estudos Estratégicos MCT/FSAG-CGEE/Consultoria No 056/2009.

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M. P. Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 39, p. 941-947, 1993.

DATTA M.; BANIK, S.; GUPTA, R. K. Studies on the efficacy of a

phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soils of Nagaland. **Plant and Soil**, The Hague, v. 69, p. 365-373, 1982.

EL-AZOUNI, I. M. Effect of phosphate solubilizing fungi on growth and nutrient uptake of soybean (*Glycine max* L.) plants. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 4, p. 592-598, 2008.

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.

FREITAS, J. R.; BANERJEE, M. R.; GERMIDA, J. J. Phosphate-solubilization rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.) **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 24, p. 358-364, 1997.

GAIND, S.; GAUR, A. C. Thermotolerant phosphate solubilizing microorganisms and their interactions in mungbean. **Plant and Soil**, The Hague, v. 133, p. 141-149, 1991.

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. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1647, p. 266-271, 2003.

GOLDSTEIN, A. H.; BRAVERMAN, K.; OSORINO, N. Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate limited desert environment and a mineral phosphates solubilizing (MPS) rhizobacterium. **FEMS Microbiology Ecology**, Haren, v. 30, p. 295-300, 1999.

HAMMOND, L. L.; CHIEN, S. H.; MOKWUNYE, A. U. Agronomic value of unacidulated and partially acidulated phosphate rocks indigenous to the tropics. **Advances in Agronomy**, New York, v. 40, p. 89-140, 1986.

ILLMER, P. A.; BARBATO, A.; SCHINNER, F. Solubilization of hardly soluble AIPO₄ with P-solubilizing microorganisms. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, p. 260-270, 1995.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; AHMAD, 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.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; WANI, P. A. Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture. A review. **Agronomy Sustainable Development**, v. 27, p. 29-43, 2007.

KIM, K. Y.; JORDAN, D.; McDONALD, G. A. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 26, p. 79-87, 1998.

MEDINA, A.; VASSILEVA, M.; BAREA, J. M.; AZCON, R. The growth enhancement of clover by *Aspergillus*-treated sugar beet waste and *Glomus mosseae* inoculation in Zn contaminated soil. **Applied and Soil Ecology**, Amsterdam, v. 33, p. 87-98, 2006.

MITTAL, V.; SINGH, O.; NAYYAR, H.; KAUR, J.; TEWARI, R. Stimulatory effect of phosphatesolubilizing fungal strains (*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*) on the yield of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. GPF2). **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 718-727, 2008.

NAHAS, E.; CENTURION, J. F.; ASSIS, L. C. Efeito das características físicas e químicas dos solos sobre a população microbiana. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 8, n. 1, p. 49-53, 1994a.

NAHAS, E.; FORNASIERI, D. J.; ASSIS, L. C. Resposta à inoculação de fungo solubilizador de fósforo em milho. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 51, p. 463-469, 1994b.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 170, p. 265-270, 1999.

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: UFV, 2007. p. 471-550.

NOVAIS, R. F. de.; SMYTH, T. J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 399 p.

OLIVEIRA, C. A.; ALVES, V. M.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; MUZZI, M. R. S.; CARNEIRO, N. P.; GUIMARÃES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; SÁ, N. M. H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 1782-1787, 2009.

RAJ, J.; BAGYARAJ, D. J.; MANJUNATH, A. Influence of soil inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhiza and a phosphate dissolving bacterium on plant growth and 32P-uptake. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 13, p. 105-108, 1981.

RAJANKAR, P. N.; TAMBekar, D. H.; WATE, S. R. Study of phosphate solubilization efficiencies of fungi and bacteria isolated from saline belt of Purna river basin. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 3, p. 701-703, 2007.

ROHR, T. G. **Estudo reológico da mistura carboximetilcelulose/amido e sua utilização como veículo de inoculação bacteriano**. 2007. 124 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

RICHARDSON, E. A. Regulating the phosphorus nutrition of plants: molecular biology meeting agronomic needs. **Plant and Soil**, The Hague, v. 322, p. 17-24, 2009.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, New York, v. 17, p. 319-339, 1999.

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

SINGH, H.; REDDY, M. S. Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. **European Journal of Soil Biology**, New Jersey, v. 47, p. 30-34, 2011.

SINGH, S.; KAPOOR, K. K. Inoculation with phosphate solubilizing microorganisms and a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 28, p. 139-144, 1999.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. Methods in legume-*Rhizobium* technology. University of Hawaii Niftal. **Biological Nitrogen Fixation**, New South Wales, p. 54-63, 1985.

SOUZA, D. M. G. de; LOBATO, E.; REIN, T. A. Adubação com fósforo. In: SOUZA, D. M. G. de; LOBATO, E. (Ed.). **Cerrado: correção do solo e**

adubação. 2. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2004. p. 147-168.

SRIVIDYA, S.; SOUMYA, S.; POOJA, K. Influence of environmental factors and salinity on phosphate solubilization by a newly isolated *Aspergillus niger* F7 from agricultural soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 1864-1870, 2009.

STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S.; JÚNIOR, W. P. S.; DIAS, S. L. Biofertilizantes de rocha fosfatada com acidithiobacillus como adubação alternativa de caupi em solo com baixo P disponível. **Revista Analytica**, v. 9, p. 48-53, 2004.

STAUFFER, M. D.; SULEWSKI, G. Fósforo essencial para a vida. In: SIMPÓSIO SOBRE FÓSFORO NA AGRICULTURA BRASILEIRA, 2003, São Pedro, SP. **Fósforo na agricultura brasileira: anais**. Piracicaba: POTAFOS, 2004. p. 1-11.

RAIJ, B. van. **Fertilidade do solo e adubação**. São Paulo: Agronômica Ceres; Piracicaba: POTAFOS, 1991. 343 p.

VANCE, C. P.; UHDE-STONE, C.; ALLAN, D. L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, Oxford, v. 157, p. 423-447, 2003.

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 and Biotechnology**, Berlin, v. 85, p. 1287-1299, 2010.

WHITELAW, M. A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

