



Efeito da inoculação de bactérias endofíticas solubilizadoras de fosfato sobre o crescimento de milho (*Pennisetum glaucum*) fertilizado com fosfato de rocha ⁽¹⁾.

Vitória Palhares Ribeiro ⁽²⁾; Cássia Naiara Soares Almeida ⁽³⁾; Eliane Aparecida Gomes ⁽⁴⁾; Ubiraci Gomes Lana ⁽⁵⁾ Ivanildo Evódio Marriel ⁽⁴⁾, Christiane Abreu de Oliveira ⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos da Fapemig, CNPq e Embrapa Milho e Sorgo.

⁽²⁾ Estudante; Centro Universitário de Sete Lagoas, Sete Lagoas, MG; vitypalhares18@hotmail.com;

⁽³⁾ Estudante de Engenharia Ambiental; Centro Universitário de Sete Lagoas, Sete Lagoas, MG;

⁽⁴⁾ Pesquisador (a) Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 285, 35701-970, Sete Lagoas, MG

⁽⁵⁾ Analista A; Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 285, 35701-970, Sete Lagoas, MG.

RESUMO: O uso crescente de fertilizantes químicos tem ocasionado efeito direto sobre a sustentabilidade das culturas. Isso se deve à demanda emergente do aumento da produção em culturas de grãos e diminuição da dependência de fertilizantes químicos, custos de produção e impactos ambientais. Alternativas como o emprego de microrganismos capazes de liberar fósforo (P) a partir de fontes de fósforo de baixa solubilidade, como os fosfatos naturais, são viáveis. Dentre os microrganismos solubilizadores de P, o grupo dos endófitos facultativos, tem sido pouco estudado quanto à eficiência de espécies deste grupo em promover o crescimento de plantas e aumentar o acúmulo de fósforo em plantas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inoculação de bactérias endofíticas solubilizadoras de P sobre o crescimento e acúmulo de P em milho. Utilizou-se sete estirpes endofíticas como inoculantes, adubação com fosfato de Araxá e/ou superfosfatotriple em cultivo sob condições controladas. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Avaliaram-se massa seca e teor de fósforo da parte aérea e raiz. Apesar de não ter sido observado diferença significativa na massa seca da parte aérea, observaram-se acréscimos significativos de 100 % na massa seca da raiz quando inoculados com as estirpes B2088, B1979 e B2088, e 30% de fósforo na planta. Conclui-se que o crescimento do milho pode ser estimulado pela inoculação com microrganismos endofíticos, sendo os efeitos dependentes do inoculante.

Termos de indexação: fósforo, microrganismos, biossolubilização, fosfato de Araxá, fosfato natural.

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 (DNPM, 2014).

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;), por apresentarem a capacidade de solubilização de fosfatos insolúveis existentes no solo (Whitelaw, 2000; Richardson, 2009) ou pelo aumento da solubilidade de fontes de baixa solubilidade (Khan et al., 2007).

O uso de inoculantes microbianos é considerado uma alternativa ambientalmente correta com relação às aplicações de fertilizantes químicos (Khan et al., 2010). E 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 (Rodríguez; Fraga, 1999), trigo (Whitelaw, 2000; Khan et al., 2007), gramíneas (Nahas et al., 1994), 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.

Assim como os microrganismos de solo, muitos endófitos são conhecidos por promoverem o crescimento da planta por meio da conversão do fósforo insolúvel nas formas solúveis (Dias et al. 2009). A principal razão para o interesse em endófitos é a constatação de que estas bactérias



podem estabelecer uma relação mais estável com a planta do que para as bactérias rizosféricas ou epífitas (Bacon & Hinton, 2011, Har doim et al., 2012).

O potencial biotecnológico de microrganismos para uso como insumos biológicos está relacionado com a liberação de substâncias que contribuem para o aumento do crescimento das plantas e da aquisição de nutrientes de difícil acesso como o fósforo, se tornando relevante a busca de novos microrganismos eficazes.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inoculação de bactérias endofíticas solubilizadoras em quatro diferentes fontes fosfatadas sobre o crescimento e a absorção de P por milheto, adubado com fosfato de Araxá e superfosfato triplo.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, na Embrapa Milho e Sorgo, com a variedade BRS1501 de milheto. Foram testadas sete estirpes de bactérias 1920; 1923 (*Bacillus pumilus*); 1215 (*Bacillus* sp), 1979 (*Pantoea ananatis*); 2014; 2084 (*Bacillus subtilis*) 2088 (*Bacillus* sp) pertencentes à Coleção de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo e da Embrapa Meio Ambiente as quais foram previamente selecionadas quanto à eficiência de solubilização de P por Oliveira et al. (2009), Abreu et al (2014).

Tratamentos

Os tratamentos estão descritos na Tabela 1. Foram constituídos 32 tratamentos dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições.

Tabela 1 – Tratamentos utilizados para determinação do efeito da inoculação de microrganismos solubilizadores de fósforo em milheto (*Pennisetum glaucum*).

Trat.	Estirpes	Fonte de P
1	0	
2	1920	
3	1923	
4	1215	Sem P
5	1979	
6	2014	
7	2084	
8	2088	
9	0	
10	1920	
11	1923	
12	1215	Fosfato de Araxá (FA)
13	1979	
14	2014	
15	2084	
16	2088	

17	0	
18	1920	
19	1923	
20	1215	½ Superfosfato Triplo + ½ Fosfato Araxá
21	1979	
22	2014	
23	2084	
24	2088	
25	0	
26	1920	
27	1923	
28	1215	Superfosfato Triplo
29	1979	
30	2014	
31	2084	
32	2088	

Cultivo das estirpes e preparo do inoculante

A partir de culturas preservadas, as estirpes foram testadas quanto à pureza em ágar–batata. Colônias isoladas de cada estirpe foram transferidas para erlenmeyers de 125 ml contendo 50 ml de caldo nutritivo e incubadas à temperatura de 28 °C, sob agitação durante 96 horas. Após este período, as culturas foram centrifugadas, ressuspensas em solução salina e ajustadas para DO_{540nm} igual a 1,0.

Posteriormente, as suspensões foram adicionadas ao veículo (carvão), na proporção de 10⁹ células por grama de carvão, constituindo uma concentração final próxima a 10⁸ células por semente. O inoculante (bactéria + carvão) foi peletizado às sementes de milheto com goma de fécula de mandioca (4%).

Cultivo de plantas de milheto

Para o ensaio em casa de vegetação, foram utilizados vasos contendo 4 kg de um Latossolo Vermelho distroférrico típico, com as seguintes características químicas e físicas, antes da aplicação dos insumos: pH H₂O = 5,2, Al = 0,4; Ca = 2,5; Mg = 0,2; T = 11,8 (cmolc dm⁻³); P = 2,2; K = 30,3 (mg dm⁻³); V = 23,2 % e teor de argila = 74,0 dag kg⁻¹. A necessidade de calagem foi calculada para se atingir V = 70%, com aplicação de reagente p.a. 20 dias antes da instalação do experimento. Cerca de 10 dias antes do plantio, foi realizada adubação com solução nutritiva (Somasegaran & Hoben, 1985). Para a adubação fosfática foram utilizadas as rochas Araxá e superfosfato Triplo na dose 300 mg P. cm³ solo, distribuídos de acordo com cada tratamento. Após vinte dias de incubação do solo com adubos e corretivos, foram semeadas 20 sementes de milheto por vaso, deixando-se 10-12 plantas/vaso após o desbaste efetuado aos oito dias após a semeadura. Aos 20 dias após o plantio, os nutrientes foram reaplicados com solução nutritiva meia força.



Coleta e análise das plantas e solo

A coleta das plantas, separadas em parte aérea, raiz e amostras do solo cultivado foram realizadas aos 50 dias após o plantio para análises químicas e microbiológicas. Para determinação da massa seca, as amostras foram submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar, sob temperatura de 65 °C, até atingirem peso constante, e moído em moinho tipo Willey. Análises químicas das plantas de milho foram realizadas para determinação dos teores e conteúdos de fósforo na parte aérea e raiz (Silva, 1999).

Análise estatística

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, 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise de variância, observou-se efeito significativo para o fator fonte de "P", sobre o crescimento do milho, medido pelo acúmulo de massa seca aos 50 dias de cultivo. De maneira geral, independente da inoculação das diferentes estirpes, houve efeito em relação à fonte de P, da massa seca da parte aérea (MSPA) e conteúdo de fósforo na parte aérea em relação ao tratamento que não recebeu adubação fosfatada.

Para a massa seca da raiz (MSR), o efeito sobre o aumento da massa seca e conteúdo de fósforo na planta de milho foi significativo tanto para a fonte de fósforo utilizada na adubação (inoculante B2088) quanto para o tipo inoculante utilizado, em geral. (**Tabela 2**).

Neste caso, a aplicação dos inoculantes, B2088, B1979 e B2084 ocasionaram acréscimos de até 50% na fitomassa da raiz.

Em geral, o aumento relativo do conteúdo de P na raiz em relação ao tratamento controle sem inoculação (B0), foi significativo para a inoculação com as estirpes B2088, B1979 e B2084, independentemente do tipo de fonte de P (**Tabela 2**).

O aumento da massa seca da raiz (MSR) indica um possível efeito hormonal sobre o crescimento radicular do milho. No entanto, os tratamentos inoculados com as bactérias B2014, B2088, B1979 e B2084, este efeito pode não ter sido somente hormonal, pois ocorreu diferença significativa no acúmulo de fósforo na raiz com relação ao tratamento sem inoculação (**Tabela 2**). Este aumento de fósforo na presença do inoculante foi de 30% com relação ao controle não inoculado (**Figura 1**).

Os resultados sugerem que a solubilização de P pelas estirpes influenciam no acúmulo de P pela planta e aumento de massa seca radicular e esses efeitos dependem da combinação de fosfatos, fatores ambientais e estirpes de microrganismos utilizadas. No entanto, são necessários testes de campo para comprovação destes efeitos, visto que o fósforo possui maior efeito e grande importância sobre a produção e maturação de grãos (Parentoni et al., 2000).

Houve aumento no crescimento da MSR e conteúdo de fósforo nos tratamentos que tiveram inoculação com as estirpes B2014, B2088, B1979 e B2084.

Estes resultados corroboram com os dados de Gomes et al. (2012) e Oliveira et al. (2013) em estudos com milho cultivado com Itafós e inoculado com rizobactérias, quando ocorreu um aumento de 43,1% e 111% na massa seca, e 27,1 e 33,5% do conteúdo de P, respectivamente.

Os resultados aqui encontrados sugerem que há potencial na aplicação de bioinoculantes a partir de microrganismos endofíticos em combinação com fosfato de rocha na substituição e/ou complementação da adubação fosfatada convencional em milho.

CONCLUSÕES

Embora o mecanismo exato pelo qual microrganismos solubilizadoras de P estimulam o crescimento das plantas não sejam claro, eles apresentam potencial para uso como biofertilizantes.

Os resultados desse trabalho demonstram que a solubilização de P depende da estirpe e do tipo de adubação, ou seja, ocorreu diferença à resposta do tipo de inoculante dos endofíticos e tipo de rocha utilizada na adubação fosfatada na raiz.

AGRADECIMENTOS

A Fapemig, CNPq, Embrapa Milho e Sorgo pela infraestrutura e recursos financeiros para a execução do trabalho.

REFERÊNCIAS

ABREU, C.S. Seleção e caracterização de bactérias endofíticas isoladas de plantas de milho com potencial para biossolubilização de rochas fosfáticas. 2014. 47f. ; il. **Dissertação de mestrado**- Universidade de São João Del Rei. Sete Lagoas. 2014.

BACON, C. W.; HINTON, D.M. *Bacillus mojavensis*: Its Endophytic Nature, the Surfactins, and Their Role in the Plant Response to Infection by *Fusarium verticillioides*. In: MAHESHWARI, D.K (Ed.). *Bacteria in Agrobiolgy: Plant*



Growth Responses, Berlin Heidelberg Springer-Verlag, p. 21-39. 2011.

Chabot, B.F., T.W. Jurik and J.F. Chabot. Influence of instantaneous and integrated light flux density on leaf anatomy and photosynthesis. *Am. J. Bot.* 86:940–945. 1998.

DNPM-Departamento Nacional de produção Mineral. Sumário Mineral. Brasília, vol, 34. 2014. Disponível em <WWW.dnpm.gov.br/dnpm/sumarios/sumario-mineral-2014.

FERREIRA, D.F. **Sisvar** versão 5.3. DEX/UFLA, 2010.

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 and Biophysics Acta**, v. 1647, p. 266-271, 2003.

GOMES, E. A., OLIVEIRA, C. A., MARRIEL, I. E., Santos, F.G., et al. Efeito da inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato sobre o crescimento de milho (*Pennisetum glaucum*) fertilizado com fosfato de rochas. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. , v.43, p.1 - 24, 2012.

HARDOIM, P.R., VAN OVERBEEK, L.S., VAN ELSAS, J.D. Dynamics of seedborne rice endophytes on early plant growth stages. **PLoS ONE**. Accepted, 2012.

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

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, P. 1, 73 - 98, 2010.

Kim, S.K., and D.A. Melton. Pancreas development is promoted by cyclopamine, a hedgehog signaling inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13036-13041. 1998

NAHAS, E.; CENTURION, J.F.; ASSIS, L.C. Efeito das características químicas dos solos sobre os microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v.18, p.49-53, 1994.

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**, v. 41, p.1782–1787, 2009.

PARENTONI, S. N., VASCONCELLOS, C. A., ALVES, V. M. C., PACHECO, C. A. P., SANTOS, M. X., GAMA, E. E. G., MEIRELLES, W. F., CORREA, L. A., PITTA, G. V. E., BAHIA FILHO, A. F. C., Eficiência na utilização de fósforo em genótipos de milho. In: Anais do **Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, n. 23, p.92, Uberlândia, Brasil, 2000.

RICHARDSON, A.E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 897-906, 2009.

RODRÍGUEZ, H., FRAGA, R., GONZALEZ, T., BASHAN, Y. Genetics of Phosphate Solubilization and its Potential Applications for Improving Plant Growth-Promoting Bacteria. **Plant and Soil**, 287:15–21, 2006.

SILVA, F.C. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília: **Embrapa Solos / Embrapa Informática Agropecuária**, 1999. 370p.

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.

SOMASEGARAN, P. & HOBEN, H. J. Methods in legume - Rhizobium technology. University of Hawaii Niflta. **Biological Nitrogen Fixation**, p. 54-63, 1985.

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

Tabela 2- Massa seca e conteúdo de fósforo na raiz, em resposta à inoculação de bactérias endofíticas solubilizadores de fósforo com o bioprocessamento das rochas fosfato de Araxá e Superfosfato triplo.

Inoculante	Fontes de P							
	Sem adubação		Fosfato de Araxá (FA)		Super triplo (ST)		^{1/2} ST+ ^{1/2} FA	
	¹ MS (g)	² P (mg.vaso ⁻¹)	¹ MS (g)	² P (mg.vaso ⁻¹)	¹ MS (g)	² P (mg.vaso ⁻¹)	¹ MS (g)	² P (mg.vaso ⁻¹)
B0	1,97 b A	3,93 b A	2,27 b A	5,90 b A	1,65 b A	2,93 b A	1,37 b A	2,10 b A
B1215	2,17 b A	5,01 b A	2,11 b A	4,71 b A	2,19 b A	5,48 b A	1,99 b A	4,24 b A
B1923	1,63 b A	2,81 b A	1,93 b A	3,92 b A	1,53 b A	2,79 b A	1,19 b A	1,49 b A
B1920	2,35 b A	5,64 b A	2,31 b A	5,77 b A	1,93 b A	3,81 b A	1,32 b A	1,87 b A
B2014	3,16 a A	10,24 a A	2,44 b A	6,56 b A	2,75 a A	7,79 b A	2,86 a A	8,74 a A
B2084	3,92 a A	15,46 a A	3,10 a A	11,91 a A	3,53 a A	12,48 a A	3,18 a A	10,44 a A
B1979	3,39 a A	12,26 a A	3,11 a A	9,71 a A	3,23 a A	10,54 a A	3,49 a A	12,27 a A
B2088	3,63 a A	13,35 a A	3,26 a B	11,20 a A	3,95 a A	15,71 a A	2,64 a A	11,54 a B

¹ MS= MASSA SECA DE RAIZ

² CONTEUDO DE FÓSFORO EM mg/vaso

***Valores seguidos por diferentes letras minúsculas entre linhas (inoculantes) e maiúscula entre colunas (fonte de P) são estatisticamente diferentes (P ≤ 0,05).

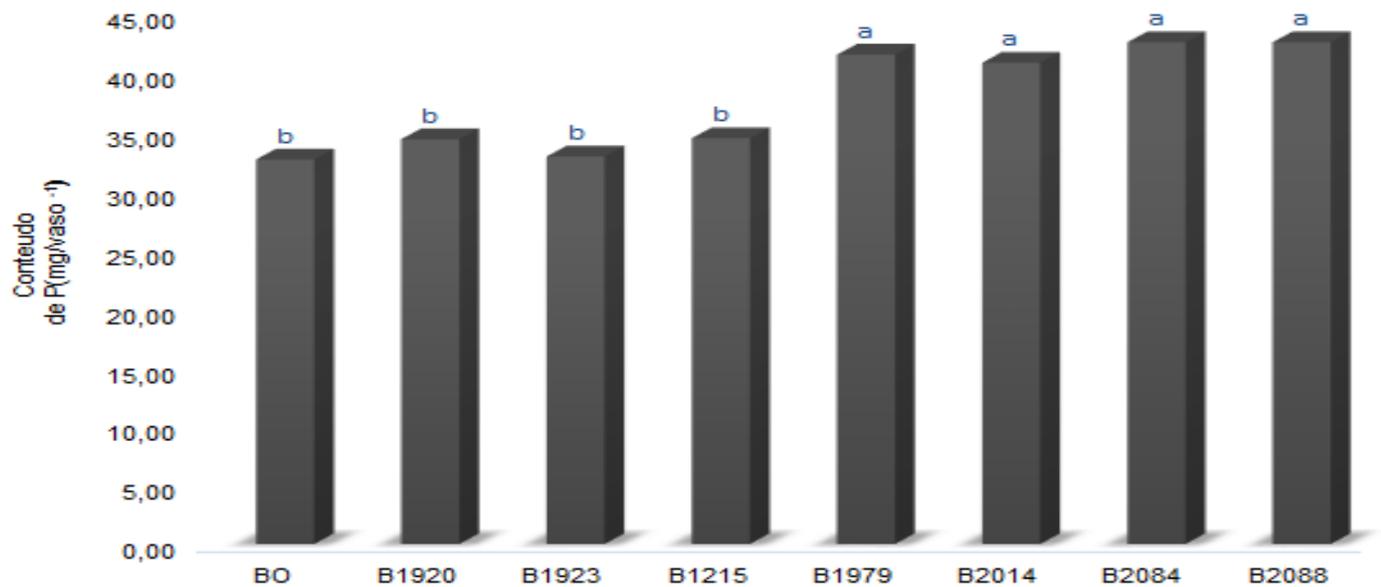


Figura 1- Média do conteúdo de fósforo (P) (mg/vaso de fósforo por vaso) na planta inteira de milho aos 50 dias de cultivo sob condições controladas. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).