

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA  
E TECNOLOGIA GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*  
EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS-AGRONOMIA

**MILHO E FEIJÃO CULTIVADO EM CAMPO E  
INOCULADO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E  
FUNGO SOLUBILIZADOR DE FOSFATO**

Autor: Moacir Ribeiro Neto  
Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Souchie

Rio Verde, GO  
novembro, 2016

**MILHO E FEIJÃO CULTIVADO EM CAMPO E  
INOCULADO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E  
FUNGO SOLUBILIZADOR DE FOSFATO**

Autor: Moacir Ribeiro Neto  
Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Souchie

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS-AGRONOMIA, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, Área de Concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado.

Rio Verde, GO  
novembro, 2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/IF Goiano Câmpus Rio Verde**

Ribeiro Neto, Moacir..

R484m Milho e feijão cultivado em campo e inoculado com bactérias diazotróficas e fungo solubilizador de fosfato. / Moacir Ribeiro Neto. – Rio Verde.- 2016.

49 fls :il.

Tese (Doutorado) – Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde, 2016.

Orientador: Dr. Edson Luiz Souchie.

**Bibliografia**

1. Co-inoculação. 2. Solubilização biológica de fosfato. 3. Fixação biológica de nitrogênio. I. Título. II. Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde.

633.15

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
AGRÁRIAS-GRONOMIA**

**MILHO E FEIJÃO CULTIVADO EM CAMPO E  
INOCULADO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E FUNGOS  
SOLUBILIZADORES DE FOSFATO**

Autor: Moacir Ribeiro Neto  
Orientador: Dr. Edson Luiz Souchie

TITULAÇÃO: Doutorado em Ciências Agrárias-Agronomia - Área de Concentração  
em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado

APROVADA em 22 de novembro de 2016.

Profª. Dra. Daniela T. da Silva Campos  
Avaliadora externa  
UFMT – Cuiabá/MT

Dr. Fernando Bonafé Sei  
Avaliador externo  
Microquímica – Campinas/SP

Prof. Dr. Marconi Batista Teixeira  
Avaliador interno  
IF Goiano – Campus Rio Verde

Profª. Dra. Haihani Silva Passos  
Avaliadora externa  
IF Goiano – Campus Rio Verde

Prof. Dr. Edson Luiz Souchie  
Presidente da banca  
IF Goiano – Campus Rio Verde

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a minha esposa Luciana Martins Moraes, pelo incentivo da continuidade aos estudos e a minha filha Laura Moraes Ribeiro que sempre me apóia em quase tudo.

Ao meu orientador Edson Luiz Souchie pelo desenrolar de todas as questões relacionadas ao doutorado e grande “chefia” nas opiniões e tomadas de decisões. Dizem que ele é “enrolado”, porém resolve.

Ao pesquisador Dr. Fernando Bonafé Sei, pela paciência e vontade de participar, interagir e dispor do seu conhecimento e experiência na área de Microbiologia Agrícola.

À Isabel Cristina M. C. Jakoby, pela enorme contribuição nas atividades no Laboratório de Microbiologia Agrícola. Com ela e os “isolados”, seguimos em frente.

Ao Lucas Santana, pelas contribuições nos trabalhos de campo.

À SETEC/MEC e ao CNPq pelo apoio financeiro durante a execução do projeto através da Chamada Pública MEC/SETEC/CNPq N° 94/2013: Apoio a Projetos Cooperativos de Pesquisa Aplicada e de Extensão Tecnológica.

À empresa Total Biotecnologia Ltda, pela imprescindível parceria que viabilizou a aprovação do projeto na Chamada Pública supracitada, na qual esta tese é um dos frutos.

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

MOACIR RIBEIRO NETO, filho de Euripedes Ribeiro de Sousa (*in memoriam*) e Glaydys Rossi Ribeiro, nasceu na cidade de Tupaciguara, Estado de Minas Gerais, em 24 de abril de 1969. Ingressou no ensino superior em fevereiro de 1998, quando iniciou o Curso de Bacharelado em Agronomia da FESURV em Rio Verde, atualmente Universidade de Rio Verde (UniRV), com conclusão de sua graduação em junho de 2001. Em março de 2010, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - Agronomia, em nível de Mestrado, desenvolveu sua dissertação na área de Microbiologia Agrícola e concluiu o curso em fevereiro de 2012. Em março de 2013, ingressou no mesmo Programa, em nível de Doutorado, também desenvolvendo sua tese na área de Microbiologia Agrícola, submetendo-se à defesa da tese, requisito indispensável para a obtenção do título de Doutor em Ciências Agrárias - Agronomia, em novembro de 2016.

## ÍNDICE

	Página.
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	2
Fósforo e os fungos solubilizadores de fosfato em milho e feijão .....	3
Nitrogênio e <i>Azospirillum brasilense</i> em milho e feijão.....	4
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	6
OBJETIVO GERAL.....	10
CAPÍTULO I. Milho cultivado em campo e inoculado com bactérias diazotróficas e fungo solubilizador de fosfato.....	11
Resumo.....	11
Abstract.....	12
Introdução.....	13
Objetivo .....	14
Material e Métodos.....	15
Resultados e Discussão.....	17
Conclusões.....	23
Referências Bibliográficas.....	23
CAPÍTULO II. Feijão cultivado em campo e inoculado com bactérias diazotróficas e fungo solubilizador de fosfato.....	25
Resumo.....	25
Abstract.....	26

Introdução.....	27
Objetivo .....	28
Material e Métodos.....	28
Resultados e Discussão.....	30
Conclusões.....	33
Referências Bibliográficas.....	33
CONCLUSÃO GERAL.....	36



## ÍNDICE DE TABELAS

	Página.
<b>CAPÍTULO I</b>	
Tabela 1 – pH no sobrenadante de meio Dygs, suplementado com fosfato de Bayóvar e inoculado com fungos solubilizadores de fosfato (FSF), em Rio Verde, GO.....	17
Tabela 2 – Teor de P inorgânico no sobrenadante de meio Dygs, suplementado com fosfato de Bayóvar e inoculado com fungos solubilizadores de fosfato (FSF), em Rio Verde, GO.....	18
Tabela 3. Características químicas e granulométricas do solo da Área Experimental do IF Goiano – Campus Rio Verde, GO (janeiro de 2014).....	19
Tabela 4. Características químicas e granulométricas do solo da Área Experimental do IF Goiano – Campus Rio Verde, GO (janeiro de 2015).....	20
Tabela 5. Produtividade de grãos de milho, cultivado sob doses crescentes de recomendação de NPK e inoculado com micro-organismos promotores do crescimento vegetal, na área experimental do IF Goiano – Campus Rio Verde, GO (fevereiro a junho de 2014).....	20
Tabela 6. Produtividade de grãos de milho, cultivado sob doses crescentes de recomendação de NPK e inoculado com micro-organismos promotores do crescimento vegetal, na área experimental do IF Goiano – Campus Rio Verde, GO (fevereiro a junho de 2015).....	21

Tabela 7. Comparativo de custo com fertilizantes e receita líquida na cultura do milho.....	22
---	----

## CAPÍTULO II

Tabela 1. Características químicas e granulométricas do solo da Área Experimental do IF Goiano – Campus Rio Verde, GO (janeiro, 2015).....	30
--	----

Tabela 2. Produtividade de feijão cultivado, sob doses crescentes da recomendação de NPK e inoculado com micro-organismos promotores do crescimento vegetal, na área experimental do IF Goiano–Campus Rio Verde, GO (março a junho de 2015).....	31
--	----

Tabela 3. Comparativo de custo com fertilizantes e receita líquida na cultura do feijão.....	33
--	----

## RESUMO

RIBEIRO NETO, MOACIR. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – GO, novembro de 2016. **Milho e feijão cultivado em campo e inoculado com bactérias diazotróficas e fungo solubilizador de fosfato.** Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Souchie.

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das culturas mais difundidas no mundo e representa metade dos grãos de leguminosas consumidos. O grão de feijão é rico em fibras e carboidratos, além de ser uma importante fonte de vitaminas hidrossolúveis, como a tiamina, a riboflavina, a niacina e a folacina. Já o milho (*Zea mays* L.) é uma das espécies vegetais mais estudadas, devido sua importância na alimentação direta do homem e dos animais, bem como na produção de produtos alimentícios, bebidas e rações. Diversos processos de ciclagem de nutrientes, principalmente nitrogênio (N) e fósforo (P), são mediados por bactérias diazotróficas e fungos solubilizadores de fosfato (FSF), os quais desempenham relevante papel na nutrição, crescimento e produtividade vegetal. Um desses processos é a fixação biológica do N atmosférico, que é realizada por bactérias diazotróficas, algo estratégico e barato para aportar N aos agrossistemas. Neste contexto, o estudo e a avaliação da eficiência agrônômica de inoculantes, formado por FSF e bactérias diazotróficas, pode trazer uma alternativa para a adubação fosfatada e nitrogenada, promovendo o uso mais eficiente do N e P, aplicados via adubação ou já contidos no solo. Com este trabalho, objetivou-se avaliar a eficiência agrônômica do uso de inoculante formado por FSF e bactérias diazotróficas, sob crescentes recomendações de NPK, nas culturas do milho e feijão, cultivadas em solo de Cerrado.

Três ensaios de campo (dois com milho e um com feijoeiro), foram conduzidos entre 2014 e 2015, utilizando um delineamento experimental de blocos casualizados, esquema fatorial 4 x 4 (quatro doses adubação: 30, 60, 90 e 120% da recomendação de NPK; quatro tratamentos de inoculação: controle não inoculado; um isolado de FSF; um inoculante comercial formulado com *Azospirillum brasilense* - AbV5 e AbV6 e a mistura entre eles), com quatro repetições. Na colheita, foi calculada a produtividade de grãos ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) e realizada análise econômica preliminar dos processos envolvidos na nutrição e rendimento das culturas. Concluiu-se que a co-inoculação de *A. brasilense* e *Penicillium* sp. possibilita incremento da produtividade de grãos de milho e permite redução da demanda por NPK de origem industrial. O custo de produção pode ser reduzido com a co-inoculação de *A. brasilense* e *Penicillium* sp. sem que haja efeitos negativos na produtividade do milho. Maiores médias de produtividade de feijão foram atingidas com a co-inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Penicillium* sp., nas quatro recomendações de NPK testadas. Similarmente à cultura do milho, para o feijoeiro, a co-inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Penicillium* sp. demonstrou ser mais efetiva que a inoculação exclusiva de *Azospirillum brasilense* ou *Penicillium* sp., o que indica sinergismo entre essas espécies microbianas. A co-inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Penicillium* sp. permite reduzir a demanda de NPK sem reduzir o patamar de produtividade de grãos.

**Palavras-chave:** co-inoculação, solubilização biológica de fosfato, fixação biológica de N, rizosfera, traços funcionais.

## ABSTRACT

RIBEIRO NETO, MOACIR. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – GO, November, 2016. **Corn and bean grown under field conditions and inoculated with diazotrophic bacteria and P-solubilizing fungus.** Advisor: Prof. Dr. Edson Luiz Souchie.

Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is one of the most widespread crops in the world and represents half of the legume grains consumed. Bean grains are rich in fiber and carbohydrates, as well as being an important source of water-soluble vitamins. Corn (*Zea mays* L.) is one of the most studied plant species, due to its importance in the direct feeding of man and animals, as well as in the production of food products, beverages and feed. Several nutrient cycling processes, mainly nitrogen (N) and phosphorus (P), are mediated by diazotrophic bacteria and P-solubilizing fungi (PSF), which play an important role in plant nutrition, growth and yield. One of these processes is the biological fixation of the atmospheric N, which is carried out by diazotrophic bacteria, something strategic and cheap to contribute N to the agrosystems. In this context, the study and evaluation of the agronomic efficiency of inoculants, formed by PSF and diazotrophic bacteria, can provide an alternative for phosphate and nitrogen fertilization, promoting the most efficient use of N and P, applied through fertilization or already available in the soil. This work aimed to evaluate the agronomic efficiency of PSF inoculant and diazotrophic bacteria, under increasing NPK recommendations in corn and bean grown in Cerrado soil. Three field trials (two with maize and one with bean) were carried out between 2014 and 2015, using a randomized complete block design, 4 x 4 factorial scheme (four fertilization doses: 30, 60, 90 and 120% of the recommended NPK, four inoculation treatments: uninoculated control, one PSF isolate,

one commercial inoculant formulated with *Azospirillum brasilense* - AbV5 and AbV6 and the mixture between them), with four replicates. At harvest, grain yield ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) was calculated and a preliminary economic analysis of the processes involved in crop nutrition and yield was discussed. The co-inoculation of *A. brasilense* and *Penicillium* sp. increases the corn grain yield and reduce the demand for industrial NPK. The cost of production can be reduced with the co-inoculation of *A. brasilense* and *Penicillium* sp. without any negative effects on corn yield. Higher bean yield were reached with the co-inoculation of *A. brasilense* and *Penicillium* sp. in the four NPK recommendations evaluated. Similar to the corn crop, the co-inoculation of *A. brasilense* and *Penicillium* sp. in bean was more effective than the exclusive inoculation of *A. brasilense* or *Penicillium* sp., indicating synergism among these microbial species. Co-inoculation of *A. brasilense* and *Penicillium* sp. reduces NPK demand without reducing grain yield.

**Keywords:** co-inoculation, P-solubilization, biological fixation nitrogen, rhizosphere, microbial functional traits.

## INTRODUÇÃO GERAL

O milho (*Zea mays* L.) é uma das espécies vegetais mais estudadas, por sua importância na alimentação direta do homem e dos animais, bem como na produção de produtos alimentícios, bebidas e rações. Sua importância é estendida na produção de álcool, cola, óleo e amido, além ser grande empregadora do setor agrícola. O Brasil está entre os maiores produtores de milho do mundo, sendo superado pelos Estados Unidos, China e pela União Europeia. Foi produzido um total de 79 milhões de toneladas de milho, no ano de 2013, em aproximadamente 16 milhões de hectares em todo o Brasil, sendo que o Estado de Goiás produziu 7,3 milhões de toneladas em 1,1 milhões de hectares (Conab, 2016).

Similarmente ao milho, o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das culturas mais difundidas no mundo, representando metade dos grãos de leguminosas consumidos (Broughton et al., 2003). O grão de feijão é rico em fibras e carboidratos, além de ser uma importante fonte de vitaminas hidrossolúveis, como a tiamina, a riboflavina, a niacina e a folacina (Costa et al., 2000). Na safra 2015/2016, a área plantada com a cultura do feijoeiro no Brasil foi de mais de 3 milhões de hectares, considerando três safras, ou épocas de colheita sendo que, para o estado de Goiás, a estimativa foi de 110 mil ha, com uma produtividade média de 1.500 kg ha<sup>-1</sup> (Conab, 2016).

Nos diversos agrossistemas existentes, a simbiose leguminosas e rizóbios é a de maior expressão econômica. Neste sentido, o favorecimento desta simbiose no feijoeiro, uma cultura que possui alta importância econômica e social no Brasil, pode incrementar sua produtividade. Os micro-organismos do solo são componentes importantes no sistema solo-planta e estão envolvidos em uma rede de interações que afetam o desenvolvimento vegetal (Barea et al., 2005; Vassilev et al., 2006; Hungria e Kaschuk, 2014). O uso de micro-organismos mutualistas, traduz-se em alternativa capaz de

otimizar a nutrição nitrogenada e a fosfatada (biofertilizantes), além de bioestimular o crescimento vegetal (promotores de crescimento). Dentre os grupos microbianos de estratégica relevância agrônômica, estão as bactérias fixadoras de N e os fungos solubilizadores de fosfato (FSF). Para estes últimos, seu uso como inoculante ou o manejo de suas populações no solo constituem alternativas para a melhoria do suprimento de fósforo (P) às plantas. No entanto, o desenvolvimento dessas tecnologias e de processos que maximizem a solubilização requer melhor conhecimento não só das condições que influem no crescimento, mas também dos mecanismos de solubilização utilizados pelos micro-organismos. Poucos trabalhos têm sido realizados para avaliar a capacidade e o potencial de solubilização em culturas, sob condições de campo, em regiões de clima tropical.

Os FSF desempenham importante papel no suprimento de P às plantas e apresentam potencial de uso na forma de inoculante (Souchie et al., 2006; El-Azouni, 2008; Saxena et al., 2016). Entre as populações fúngicas com potencial para solubilização de P, destacam-se os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Silva, 2009).

O FSF influenciam diretamente as plantas, pelo aumento da solubilização de nutrientes e produção de reguladores de crescimento vegetal ou indiretamente, pela supressão de patógenos, por produção de sideróforos ou antibióticos (Asghar et al., 2002).

As bactérias diazotróficas, pela sua habilidade em converter N atmosférico em amônia, passível de utilização pela planta, também são consideradas promotoras de crescimento vegetal. Em razão de sua capacidade de sobreviver em ambientes deficientes em N, essas bactérias podem enriquecer seletivamente a rizosfera, local em que habitam como organismos de vida livre ou estão associadas assimbioticamente às plantas (Dobbelaere et al., 2003).

Em um mundo globalizado onde a preocupação com a valorização dos serviços ambientais e as barreiras ao comércio internacional tendem a aumentar, há evidências de que no século XXI a produção agrícola, pecuária e florestal estará atrelada também aos processos de certificação ambiental que considerem às preocupações da sociedade quanto ao uso racional dos recursos naturais e à preservação do meio ambiente (Carfantan e Brum, 2006).

O estudo e a avaliação da eficiência agrônômica de inoculantes, formado por FSF, combinado com bactérias diazotróficas, pode trazer uma alternativa para a adubação fosfatada e nitrogenada, promover o uso mais eficiente do P e do N, aplicados



via adubação ou já contidos no solo e tornar, desta forma, a agricultura mais sustentável pela maximização dos processos biológicos do solo. O uso desses inoculantes pode reduzir a demanda por adubação fosfatada e nitrogenada e, conseqüentemente, dos custos, riscos de produção e o impacto ambiental do uso de fertilizantes industrializados solúveis no solo.

### **1. Fósforo e os fungos solubilizadores de fosfato em milho e feijão**

O P é um nutriente essencial ao crescimento das plantas e, como tal, é importante para maximizar o potencial produtivo do campo. Geralmente, o P é encontrado no solo em grandes quantidades, mas de um modo indisponível às plantas. O P total do solo pode estar na forma orgânica ou inorgânica, sendo que o P orgânico pode contribuir com até 50% do P nos solos, principalmente em sistema sob plantio direto (Gyaneshwar et al., 2002). O P de origem orgânica, ocorre principalmente na forma indisponível de fosfato inositol (fitato) e outras como fosfomonoésteres, fosfolipídios, ácidos nucleicos e fosfotriésteres (Gyaneshwar et al., 2002), podendo se tornar disponível pela mineralização por enzimas fosfatases liberadas pelas raízes e por micro-organismos (Oliveira et al., 2008). O P inorgânico, na forma de ânions fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4$ ), pode ser imobilizado no solo pela precipitação com cátions, tais como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$  ou adsorvido aos óxidos de ferro e de alumínio, silicatos de alumínio e carbonatos de cálcio, dependendo das propriedades do solo (Marschner et al., 2006; Oliveira et al., 2008).

O uso eficiente do P aplicado ao solo via fertilizante é consequência da interação de vários fatores, tais como: o tipo de solo, a fonte de P, a dose e o modo de aplicação, o sistema e sequência de cultivos. Entre os componentes do solo que são mais importantes para aumentar essa eficiência, destaca-se a matéria orgânica do solo, devido à sua importância na ciclagem deste nutriente, reduzindo sua precipitação e adsorção, favorecendo a solubilização de fosfatos de menor solubilidade (Sousa et al., 2010). A absorção de nutrientes está intimamente relacionada às condições climáticas e, principalmente, à fisiologia da planta (Brandão, 2009).

O P age na respiração, produção e processos de transformação de energia pela planta, bem como na divisão celular. O uso do P na adubação, frequentemente beneficia o enraizamento e favorece a geração de propágulos. A maioria das transformações energéticas dos processos vitais das plantas é realizada à custa da interferência do P. Este nutriente é rapidamente mobilizado nas plantas e, quando há deficiência, o mesmo

se transloca dos tecidos mais velhos para as regiões meristemáticas ativas (Alves et al., 2009).

A promoção do crescimento vegetal, por micro-organismos, ocorre pela produção de metabólitos benéficos às plantas, tais como fitormônios, antibióticos ou sideróforos. Diversos inoculantes, formados por micro-organismos benéficos às plantas, têm promovido o crescimento vegetal em diversas culturas (Sharma et al., 2013).

Dentre os FSF, *Penicillium bilaii* tem sido relatado com um microrganismo do solo com alto potencial de promoção do crescimento vegetal, em nível de campo, em países de clima temperado (Gulden et al., 2000; Vessey et al., 2001). Resultados positivos da promoção do crescimento vegetal, por micro-organismos edáficos, têm sido detectados, na região do Cerrado, sob condições de casa-de-vegetação (Ferreira et al., 2009). Espécies de *Penicillium* aparentemente não exibem especificidade quanto à espécie vegetal e tipo de solo e têm sido detectados como habitantes da rizosfera de diversas plantas com ou sem uso agrícola (Babana e Antoun, 2006; Khan et al., 2008), indicando potencial de uso como inoculante em um amplo espectro de condições edafoclimáticas.

## **2. Nitrogênio e *Azospirillum brasilense* em milho e feijão**

Na rizosfera das plantas ou endofiticamente são encontrados diversos grupos filogenéticos bacterianos, com capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) - diazotróficos, de produção de auxinas e outros promotores de crescimento. Estas bactérias podem viver livres em diversos ecossistemas, estabelecer simbioses ou associar-se às plantas (diazotróficas associativas). As bactérias diazotróficas associativas podem contribuir para o crescimento vegetal, não só pelo fornecimento de N, mas também por outros mecanismos como produção de fitormônios, solubilização de fosfatos, antagonismo a fitopatógenos entre outros (Moreira et al., 2010).

O N é o nutriente requerido em maior quantidade pela maioria das culturas. O reservatório de N, presente na matéria orgânica do solo, é limitado e pode ser esgotado rapidamente após alguns cultivos. Além disso, as condições de temperatura e umidade, predominantes no território brasileiro, aceleram os processos de decomposição da matéria orgânica e as perdas de N, resultando em solos com baixos teores desse nutriente, capazes de fornecer, em média, apenas 10 a 15 kg de N por cultivo. Deve-se considerar ainda que a preservação da matéria orgânica com uma relação C/N adequada é importante para a manutenção dos micro-organismos do solo, sem os quais a

sustentabilidade dos agrossistemas torna-se inviável (Hungria, 2011). Fertilizantes nitrogenados, utilizados em plantas não leguminosas, constituem um dos custos mais altos da agricultura. Portanto, um dos objetivos da agricultura sustentável é o aproveitamento eficiente do N atmosférico (Graham e Vance, 2000).

Segundo Kluthcouski et al. (2006), em condições climáticas adversas, condicionadas pelo teor de matéria orgânica do solo, textura do solo, época e método de aplicação do fertilizante, o N torna-se um nutriente facilmente perdido por lixiviação, volatilização e desnitrificação no solo, atingindo perdas, nas regiões subtropicais, que alcançam entre 20 a 78% da quantidade total aplicada (Fontoura, 2009). Em decorrência disso, a eficiência da adubação é reduzida situando-se, no máximo, entre 50 e 60% (Kluthcouski et al., 2006).

Diversos processos de ciclagem de nutrientes, tendo em vista o N, são mediados por micro-organismos do solo, desempenhando um papel de suma importância para nutrição das plantas. Um desses processos é a FBN, habilidade exclusiva dos diazotróficos. Os estudos com diazotróficos são estratégicos, pelo incremento de N nos diversos ecossistemas, naturais ou manejados (Moreira et al., 2010).

Segundo Araujo (2008), há diversas evidências de que a inoculação das sementes de milho com *Azospirillum brasilense* seja responsável pelo aumento da taxa de acúmulo de massa seca, o que parece estar relacionado ao aumento da atividade das enzimas fotossintéticas e de assimilação de N. Essa bactéria diazotrófica possibilita os seguintes benefícios aos vegetais: é endofítica, ou seja, penetra as raízes das plantas; apresenta antagonismo a agentes patogênicos; produz fitormônios; não é muito sensível às variações de temperatura e ocorre em todos os tipos de solo e clima.

Barassi et al. (2008) relatam as respostas fisiológicas induzidas por *Azospirillum brasilense*, tais como a melhoria em parâmetros fotossintéticos das folhas, incluindo o teor de clorofila e condutância estomática, maior teor de prolina na parte aérea e raízes, melhoria no potencial hídrico, incremento no teor de água do apoplasto, maior elasticidade da parede celular, maior produção de biomassa, maior altura de plantas, incremento em vários pigmentos fotossintéticos, tais como clorofila “a”, “b” e pigmentos fotoprotetivos auxiliares: violaxantina, zeaxantina, aeroxantina, luteína, neoxantina e beta-caroteno, que resultariam em plantas mais verdes e mais resistentes ao estresse hídrico.

O sucesso da inoculação das sementes de milho e de feijão com bactérias fixadoras de N, depende da aplicação correta do inoculante nas sementes. O tratamento

de sementes com fungicidas e inseticidas tem efeito negativo na sobrevivência dos micro-organismos inoculados na semente e pode reduzir a nodulação do feijão, por exemplo, com conseqüente efeito negativo na produtividade. Os fungicidas disponíveis no mercado possuem diferenças na intensidade dos efeitos negativos sobre os micro-organismos inoculados em sementes. Desta forma, os agricultores devem evitar o uso de fungicidas altamente tóxicos e realizar o tratamento de sementes de forma correta, seguindo as recomendações dos fabricantes (Araújo e Araújo, 2006).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A. S. F.; ARAÚJO, R. S. Sobrevivência e nodulação do *Rhizobium tropici* em sementes de feijão tratadas com fungicidas. **Ciência Rural**, v. 36, p. 973-976, 2006.

ARAÚJO, S. C. Realidade e perspectivas para o uso de *Azospirillum* na cultura do milho. **Revista Informações Agronômicas**, v. 122, p. 4-6, 2008.

ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, p. 231-237, 2002.

BABANA, A. H.; ANTOUN, H. Effect of Tilemsi phosphate rock-solubilizing microorganisms on phosphorus uptake and yield of field-grown wheat (*Triticum aestivum* L.) in Mali. **Plant and Soil**, v. 287, p. 51-58, 2006.

BAREA, J. M.; POZO, M. J.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Microbial cooperation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 1761-1778, 2005.

BROUGHTON, W. G.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. **Plant and Soil**, v. 252, p. 55-128, 2003.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. v. 3. Safra 2015/16 - N. 9 - 9º Levantamento, Junho, 2016.

COSTA, H. S.; RIOS-RUIZ, W. F.; LAMBAIS, M. R. Salicylic acid inhibits arbuscular mycorrhizae formation and changes chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase expression in bean roots. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 19-25, 2000.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, p.107-149, 2003.

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.

FERREIRA, R. F.; CARDOSO, I. C. M.; SILVA, C. F.; SOUCHIE, E. L.; CARNEIRO, M. A. C. Rice response to inoculation with P-solubilizing microorganisms from Brazilian Cerrado. **Bioscience Journal**, v. 25, p. 1-7, 2009.

FOLONI, J. S. S.; ROSOLEM, C. A.; GARCIA, R. A. Efeito da calagem e sulfato de amônio no algodão. II – Concentração de cátions e ânions na solução do solo e absorção de nutrientes pelas plantas. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 30, p. 433-442, 2006.

GRAHAN, P. H.; VANCE C. P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field and Crop Research**, v. 65, p. 93-106, 2000.

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v. 245, p. 83-93, 2002.

GULDEN, R. H.; VESSEY, J. K. *Penicillium bilaii* inoculation increases root-hair production in field pea. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 80, p. 801-804, 2000.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento abaixo custo**, Londrina, Embrapa Soja, 36p. 2011.

HUNGRIA, M.; KASCHUK, G. Regulation of  $N_2$  fixation and  $NO_3^-/NH_4^+$  assimilation in nodulated and N-fertilized *Phaseolus vulgaris* L. exposed to high temperature stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 98, p. 32-39, 2014.

KHAN, S. A.; HAMAYUN, M.; YOON, M.; KIM, H-Y.; SUH, S-Y.; HWANG, S-K.; KIM, J-M.; LEE, I-Y.; CHOO, Y-S.; YOON, U-H.; KONG, W-S.; LEE, B-M.; KIM, J-G. Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. **BMC Microbiology**, v. 8, p. 231–40, 2008.

KLUTHCOUSKI, J.; AIDAR, H.; THUNG, M.; OLIVEIRA, F. R. A.; COBUCCI, T. **Manejo antecipado do nitrogênio nas principais culturas anuais**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, Série Documentos, 188. 2006. 64 p.

MARSCHNER, P.; SOLAIMAN, Z; RENGEL, Z. Rhizosphere properties of *Poacea* genotypes under P-limiting conditions. **Plant and Soil**, v. 283, p.11-24, 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, p. 74-99, 2010.

OLIVEIRA, C. A.; GOMES, E. A.; MARRIEL, L. E.; LANA, U. G. P.; CARNEIRO, N. P.; GUIMARÃES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; ALVES, V. M. C. Micro-organismos solubilizadores de fosfato isolados da rizosfera de genótipos de milho em plantio direto e convencional. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 04, Sete Lagoas, MG, 2008.

SAXENA, J.; RAWAT, J.; SANWAL, P. Enhancement of growth and yield of glycine max plants with inoculation of phosphate solubilizing fungus *Aspergillus niger* K7 and biochar amendment in soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, p. 2334-2347, 2016.

SHARMA, S. B.; SAYYED, R. Z.; TRIVEDI, M. H.; GOBI, T. A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **Springer Plus**, v. 2, p. 587-601, 2013.

SILVA, E. A. D. **Contribuições da micorrização e do *Aspergillus niger*, como solubilizador de fosfato, no crescimento de milho, em diferentes solos**. 62f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita”, Ilha Solteira, 2009.

SOUCHIE, E. L.; SAGGIN-JUNIOR, O. J.; SILVA, E. M. K.; CAMPELLO, E. F. C. AZCÓN, R.; BAREA, J. M. Communities of P-solubilizing bacteria, fungi and Arbuscular mycorrhizal fungi in grass pasture and secondary forest of Paraty, RJ-Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, p. 183-193, 2006.

SOUSA, D. M. G.; REIN, T. A.; GOEDERT, W. J.; LOBATO, E.; NUNES, R. S. Fósforo. In: PROCHNOW, L. I.; CASARIN, V.; STIPP, S. R. (eds.). **Boas práticas para uso eficiente de fertilizantes: Nutrientes**. Piracicaba, IPNI, v. 2. p. 67-132, 2010.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; NIKOLAEVA, I. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 137-144, 2006.

VESSEY, J. K.; HEISNGER, K. G. Effect of *Penicillium bilaii* inoculation and phosphorus fertilization on root and shoot parameters of field-grown pea. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 81, p. 361-366, 2001.

## **OBJETIVO GERAL**

Avaliar a eficiência agronômica do uso de inoculantes formados por FSF e bactérias diazotróficas, combinados a crescentes recomendações de NPK, nas culturas do milho e do feijão cultivadas em solo de Cerrado.



## CAPÍTULO I

### MILHO CULTIVADO EM CAMPO E INOCULADO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E FUNGO SOLUBILIZADOR DE FOSFATO

(Normas de acordo com a revista Pesquisa Agropecuária Tropical)

RESUMO: As associações de plantas com micro-organismos têm sido estudadas, mas sua exploração na agricultura, ainda é baixa. O interesse no uso de inoculantes microbianos que promovem o crescimento das plantas e a produção aumentou, pois fertilizantes nitrogenados são caros e podem prejudicar o ambiente pela contaminação da água com nitratos, a acidificação dos solos e as emissões de gases de efeito estufa. Com este trabalho, objetivou-se avaliar a eficiência agrônômica da inoculação de bactérias diazotróficas e FSF, na cultura do milho, cultivada em solo de Cerrado. Dois ensaios com milho foram conduzidos em campo, nas safrinhas de 2014 e 2015. Os ensaios foram implantados na área experimental do IF Goiano – Campus Rio Verde. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, esquema fatorial 4 x 4 (quatro doses adubação: 30, 60, 90 e 120% da recomendação de NPK; quatro tratamentos de inoculação: controle não inoculado; um isolado de FSF, um inoculante comercial formulado com *Azospirillum brasilense* - AbV5 e AbV6, e a mistura entre eles), com quatro repetições. Ambos os ensaios foram conduzidos por 138 dias. Na colheita foi calculada a produtividade de grãos (kg ha<sup>-1</sup>) e realizada análise econômica preliminar dos processos envolvidos na nutrição e rendimento das culturas. A co-inoculação de *A. brasilense* e *Penicillium* sp. possibilita incremento da produtividade de

grãos de milho e permite redução da demanda por NPK de origem industrial. O custo de produção pode ser reduzido com a co-inoculação de *A.brasilense* e *Penicillium* sp. sem que haja efeitos negativos na produtividade do milho.

Palavras-chave: inoculação, solubilização biológica de fosfato, fixação biológica de N

## MAIZE AND COMMON BEAN GROWN IN THE FIELD AND INOCULATED WITH DIAZOTROPHIC BACTERIA AND P-SOLUBILIZING FUNGI

**ABSTRACT:** Associations of plants with microorganisms have been studied, but their exploitation in agriculture, is still low. Interest in the use of microbial inoculants that promote plant growth and production has increased because nitrogen (N) fertilizers are expensive and can harm the environment by contaminating water with nitrates, soil acidification and greenhouse gas emissions. This work aimed to evaluate the agronomic efficiency of the inoculation of diazotrophic bacteria and P-solubilizing fungus (PSF) in the corn crop, grown in Cerrado soil. Two field trials with corn were carried out in the second harvest of 2014 and 2015. The trials were installed in the experimental area of the IF Goiano-Campus Rio Verde. The experimental design was a randomized complete block design, 4 x 4 factorial scheme (four fertilization rates: 30, 60, 90 and 120% of the NPK recommendation, four inoculation treatments: uninoculated control, one PSF isolate, a commercial inoculant: *Azospirillum brasilense* - AbV5 and AbV6, and the mixture between them), with four replicates. Both trials were carried out for 138 days. Grain yield ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) was calculated and a preliminary economic analysis of the processes involved in crop nutrition and yield was discussed. The co-inoculation of *A. brasilense* and *Penicillium* sp. increases the corn grain yield and reduce the demand for industrial NPK. The cost of production can be reduced with the co-inoculation of *A. brasilense* and *Penicillium* sp. without any negative effects on corn yield.

Keywords: inoculation, phosphate solubilization, biological nitrogen fixation

### 1. INTRODUÇÃO

A demanda por fertilizantes químicos na agricultura tem sido historicamente um dos fatores inter-relacionados, como o crescimento da população mundial, o crescimento econômico, a produção agrícola, entre outros (Morel et al. 2012). O

interesse no uso de inoculantes microbianos que promovem o crescimento das plantas e a produção, aumentou porque fertilizantes nitrogenados são caros e podem prejudicar o ambiente através da contaminação da água com nitratos, a acidificação dos solos e as emissões de gases de efeito estufa (Adesemoye et al. 2009, Hungria et al. 2013).

Segundo Owen et al. (2015), o crescente interesse pela agricultura de baixo input, nos últimos anos, tem favorecido o desenvolvimento e uso de inoculantes microbianos comerciais (bactérias e, ou fungos) para incrementar a mobilização de nutrientes, especialmente P, e sua disponibilização às culturas de interesse agrônômico. As associações de plantas com micro-organismos têm sido estudadas, mas sua exploração em agricultura, para substituir parcial ou totalmente os fertilizantes nitrogenados e fosfatados ainda é baixa (Hungria et al. 2013). Além disso, as plantas só podem utilizar uma pequena quantidade de fosfato a partir de fontes químicas, já que 75 a 90% do P adicionado é precipitado por meio de complexos e rapidamente torna-se fixado no solo (Sharma et al. 2013).

Bernd et al. (2014) relatam que a qualidade nutricional e a facilidade de adaptação tornam o milho um cereal de importância mundial, principalmente nos Estados Unidos, China e Brasil. Relatam ainda que o milho é uma das culturas mais exigentes em fertilizantes, sobretudo nitrogenados e fosfatados.

Cerca de 42 milhões de toneladas de fertilizantes nitrogenados são aplicados anualmente em escala global para a produção dos três principais cereais: trigo, arroz e milho. Anualmente,  $8 \times 10^{10}$  kg de  $\text{NH}_3$  são produzidos por indústrias de fertilizantes nitrogenados, enquanto  $2,5 \times 10^{11}$  kg de  $\text{NH}_3$  são fixadas pela FBN (Cheng 2008). O nitrogênio que é fornecido pela FBN é menos propenso à lixiviação, volatilização e desnitrificação e, portanto, é considerado um processo biológico estratégico que favorece a sustentabilidade nos agrossistemas (Dixon & Kahn 2004).

Os inoculantes contendo *Azospirillum* foram testados em condições de campo na Argentina, com resultados positivos em matéria de crescimento das plantas e, ou produção de grãos (Cassán & Garcia de Salamone 2008). No Brasil, experimentos de campo para avaliar o desempenho de cepas de *A. brasilense* isoladas de plantas de milho mostrou eficácia tanto em milho como trigo. Tais resultados respaldaram as primeiras linhagens de inoculantes para ser produzido e usado comercialmente em trigo e milho no país (Hungria et al. 2010). Segundo esses autores, pode-se fazer a substituição parcial do adubo nitrogenado em associação com *Azospirillum* sp. Essa

inoculação economizaria cerca de US\$ 1,2 bilhões por ano, o que implicaria na menor dependência de fertilizantes nitrogenados industrializados em todo o mundo.

Bactérias diazotróficas capazes de associar às plantas de milho são amplamente encontradas no solo e na planta. Especificamente, *Azospirillum lipoferum* e *A. brasiliense*, existem em abundância no solo, rizosfera e no interior dos tecidos de plantas de milho (Roesch 2003) e possuem alto potencial de uso como inoculante, nesta cultura.

Lima et al. (2011) consideram que há necessidade de fertilizantes fosfatados e nitrogenados para a produção de plantas de modo a produzir ganhos econômicos e ecológicos. Destacam ainda, que a inoculação conjunta (co-inoculação) de bactérias diazotróficas e de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) possuem eficiência comprovada em diversas pesquisas quanto aos benefícios na nutrição, crescimento e proteção vegetal.

Gomes et al. (2010), avaliando o potencial de bactérias e fungos rizosféricos de milho na solubilização de fosfato de ferro em meio de cultura detectaram que os fungos foram mais eficientes que as bactérias, devido sua maior adaptação à acidez do meio. Similarmente, Barroso & Nahas (2008), avaliando a eficiência de solubilização de fosfato de ferro pelo fungo *Aspergillus niger* mostraram que a produção de ácidos foi o principal mecanismo de solubilização.

A utilização de bactérias diazotróficas e micro-organismos solubilizadores de fosfatos tem papel importante no fornecimento de N e P para diferentes culturas (Baldotto et al. 2012), podendo agir como biofertilizantes e aumentar o crescimento e rendimento de plantas. Segundo Moraes (2016), a resposta da cultura do milho a fertilizantes é bem conhecida, no entanto, a combinação de inoculantes microbianos com fertilizantes tem demonstrado resultados variáveis. Segundo Owen et al. (2015), resultados contraditórios, em nível de campo, geralmente são detectados devido às limitações das metodologias de estudo, uso de padrões inadequados e conhecimento insuficiente sobre os mecanismos subjacentes, efetivamente envolvidos na promoção do crescimento vegetal.

## 2. OBJETIVO

Avaliar a eficiência agrônômica da inoculação de bactérias diazotróficas e FSF na cultura do milho, cultivada em solo de Cerrado.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Solubilização do fosfato de Bayóvar *in vitro* por *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.

Antes da realização dos ensaios de eficiência agrônômica da inoculação de bactérias diazotróficas e FSF no milho, em laboratório, foi feita a quantificação da capacidade de solubilização de fosfato pelos isolados fúngicos M1 e F1 do gênero *Aspergillus* sp. e M2 (*Penicillium* sp.).

Para tanto, o ensaio foi conduzido no Laboratório de Microbiologia Agrícola do IF Goiano – Campus Rio Verde, no mês de janeiro de 2014. Foram testados três isolados fúngicos supracitados. O pré-inóculo foi preparado em meio Dygs, a densidade de esporos quantificada em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para  $2,0 \times 10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ .

Os isolados foram inoculados em vials de vidro com 7 mL de meio Dygs suplementado com  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  de fosfato de Bayóvar. Foi inoculado 1 mL de cada pré-inóculo contendo  $2,0 \times 10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ . O pH inicial do meio foi ajustado para 6,0 e os tratamentos incubados a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 7 dias.

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com três repetições, esquema fatorial  $4 \times 4$ , sendo quatro tratamentos de inoculação (M1, M2, F1 e controle não inoculado) e 4 tempos (4, 5, 6 e 7 dias após a inoculação). Foram avaliados o pH do sobrenadante, utilizando-se um pHmetro de bancada, e o teor de P inorgânico solúvel por espectrofotometria.

Em cada tempo de incubação, os isolados e o controle foram centrifugados (4.000 rpm, por 30 min), e retirou-se 1 mL do sobrenadante de cada repetição para quantificação do P inorgânico, pelo método colorimétrico da vitamina C modificado (Braga e De Fellipo, 1974). A curva padrão foi preparada com meio Dygs esterilizado e uma solução estoque de ácido fosfórico ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) de onde retirou-se 0, 100, 200, 400, 600, 800 e  $1000 \mu\text{L}$ , para construir a curva de calibração de P.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott (5%), utilizando o software estatístico SISVAR (Ferreira, 2011).

### 3.2 Eficiência agrônômica da inoculação de bactérias diazotróficas e FSF em milho safrinha cultivado em Rio Verde, GO

Dois ensaios com a cultura do milho foram conduzidos em campo, nas safrinhas de 2014 e 2015. Especificamente, os ensaios foram implantados na área experimental do IF Goiano – Campus Rio Verde (latitude 17° 32' 35" S e longitude 51° 02' 42" O, com elevação de 861m). Em ambos os ensaios, o delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, esquema fatorial 4 x 4 (quatro doses de NPK; quatro tratamentos de inoculação: sem utilização de inoculante e três combinações de inoculante de FSF e de bactéria diazotrófica), com quatro repetições.

Os tratamentos de recomendação de adubação nitrogenada (ureia), fosfatada (superfosfato simples) e potássica (KCl) foram equivalentes a 30% (90 kg ha<sup>-1</sup> de N + 40 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + 40 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O); 60% (180 kg ha<sup>-1</sup> de N + 80 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + 80 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O); 90% (270 kg ha<sup>-1</sup> de N + 120 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + 120 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O) e 120% (360 kg ha<sup>-1</sup> de N + 160 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + 160 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O). Sendo aplicado parceladamente na base e em cobertura.

Quanto aos tratamentos de inoculação, as sementes foram inoculadas (2 mL/kg sementes) com um isolado de FSF (1,35x10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup>), um inoculante comercial (2 mL/kg sementes) formulado com *Azospirillum brasilense* (AbV5 e AbV6 - 2x10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>), e a mistura entre eles (2 mL de cada um/ kg sementes). Também foi utilizado um controle não inoculado. O isolado de FSF (*Penicillium* sp.), foi isolado a partir da rizosfera de milho, cultivado por 45 dias, em vasos contendo Latossolo Vermelho distroférico, coletado na área em que ambos os ensaios foram conduzidos.

Antes da implantação de cada ensaio, foi realizada a análise química e física do solo, para determinação da textura, pH, teores de macro e micronutrientes, assim como a densidade populacional de diazotróficos.

O híbrido de milho utilizado foi o DKB-340, com 90% de germinação. O espaçamento entre linhas adotado foi o de 0,5 m com uma distribuição de 3 sementes por metro linear para o híbrido de milho. O manejo de plantas invasoras foi realizado com capinas manuais e aplicação de herbicida Roundup Transorb<sup>®</sup>, 2 L ha<sup>-1</sup>, em apenas uma aplicação no estágio V4. Já para o manejo de doenças, foram realizadas duas aplicações do fungicida Abacus<sup>®</sup> (Piraclostrobina 260 g L<sup>-1</sup> + Epoxiconazol 160 g L<sup>-1</sup>) a 300 mL ha<sup>-1</sup> cada uma nos estádios V8 e em pleno pendoamento e para o controle de insetos foi aplicado no estágio V6 uma única dose do inseticida Pirate<sup>®</sup> (Clorfenapir 240 g L<sup>-1</sup>) na dose de 600 mL ha<sup>-1</sup>.

As parcelas foram constituídas por áreas de 3,0 x 8,0 m, distanciadas 1,0 m uma da outra. A área total da parcela foi de 24 m<sup>2</sup> e a área útil correspondeu às quatro linhas centrais, desprezando-se 1 m em cada extremidade. A área total das parcelas correspondeu a 1.536 m<sup>2</sup>.

Ambos os ensaios foram conduzidos por 138 dias. Na colheita foi calculada a produtividade de grãos (kg ha<sup>-1</sup>) e realizado demonstrativo de custo dos processos envolvidos na nutrição e rendimento das culturas.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.1 Solubilização do fosfato de Bayóvar *in vitro* por *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.

Para a variável pH do sobrenadante, não houve interação entre os tratamentos e o tempo de incubação. Aos 4 dias após a inoculação, nota-se uma acidificação considerável do meio de cultura principalmente pelos fungos M1 (*Aspergillus* sp.) e M2 (*Penicillium* sp.), que reduziram o pH do meio de 6,0 para 3,6. Porém, com o passar do tempo de incubação, o pH do sobrenadante foi elevado até chegar a 5,0 para os três isolados testados (Tabela 1).

Tabela 1. pH no sobrenadante de meio Dygs, suplementado com fosfato de Bayóvar e inoculado com fungos solubilizadores de fosfato (FSF), em Rio Verde, GO.

Isolado de FSF	pH do sobrenadante			
	4 dias	5 dias	6 dias	7 dias
M1	3,6 a	4,3 a	4,6 a	5,0 a
M2	3,6 a	3,8 a	4,4 a	5,0 a
F1	4,3 b	4,8 b	5,1 b	5,0 a
Controle	5,5 c	5,6 c	5,7 c	5,7 b
CV (%)	7,4			

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%).

A alteração do pH do meio de cultura por FSF deve-se a vários fatores, entre eles a liberação de ácidos orgânicos, agentes quelantes e enzimas fosfatases. Além disso, reações da própria fonte de P utilizada e suas características físico-químicas também podem ser responsáveis por tais alterações (Bashan et al. 2013).

Com relação ao teor de P solúvel no sobrenadante, houve interação entre os tratamentos e o tempo de incubação de modo que a quantidade de P no sobrenadante aumentou com o passar dos dias. A solubilização do fosfato de Bayóvar pelos isolados foi observada a partir do 5º dia para os fungos M1 e M2, e do 6º dia para F1. O fungo M2 (*Penicillium* sp.) se destacou com teores de P solúvel que atingiram 207 mg P L<sup>-1</sup> no 7º dia, valor 1,75 vezes maior que o controle (Tabela 2).

Tabela 2. Teor de P inorgânico no sobrenadante de meio Dygs, suplementado com fosfato de Bayóvar e inoculado com fungos solubilizadores de fosfato (FSF), em Rio Verde, GO.

Isolado de FSF	Teor de P inorgânico no sobrenadante			
	4 dias	5 dias	6 dias	7 dias
	-----mg P L <sup>-1</sup> -----			
M1	31,0 Ac	58,1 Ab	140,4 Ba	146,6 Aa
M2	35,7 Ad	64,8 Ac	171,7 Ab	207,0 Ba
F1	30,5 Ab	46,0 Bb	146,2 Ba	144,9 Ba
Controle	28,5 Aa	34,2 Ba	97,9 Cb	118,2 Cb
CV (%)	14,6			

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%).

Analisando-se a solubilização de cada isolado em função do tempo, verifica-se que M1 e F1 tiveram valores de P detectado no sobrenadante no 7º dia iguais aos do 6º dia (Tabela 2). O decréscimo nos teores de P disponível no sobrenadante ao longo do tempo, é explicado pelo aumento da biomassa do fungo que diante de maior necessidade do nutriente, passa a imobilizá-lo e utilizá-lo em seu metabolismo (Barroso & Nahas 2008).

#### 4.2 Eficiência agrônômica da inoculação de bactérias diazotróficas e FSF em milho cultivado em Rio Verde, GO

No solo da área dos ensaios, foi detectada a população de diazotróficos equivalente a 2,15x10<sup>2</sup> UFC g<sup>-1</sup> solo, em 2014 e 4,52x10<sup>3</sup> UFC g<sup>-1</sup> solo, em 2015. Os resultados das características químicas e de textura do solo utilizado para implantação dos ensaios, em 2014 e 2015, estão descritos nas Tabelas 3 e 4.



Tabela 3. Características químicas e granulométricas do solo da Área Experimental do IF Goiano – Campus Rio Verde, GO (janeiro de 2014).

pH (água)	P	K	Fe	Mn	Zn	Cu	Ca	Mg	Al	Mat. Org.	Sat. Bases	Areia	Silte	Argila
	-----mg dm <sup>-3</sup> -----					-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----				g dm <sup>-3</sup>	-----%-----			
6,1	15,2	158	6,0	33,2	4,1	0,9	4,4	1,2	0,01	31,5	61,2	37	18	45

Extratores: Mehlich 1 (P, K, Cu, Fe, Zn e Mn); KCl 1 N (Ca, Mg e Al)

Tabela 4. Características químicas e granulométricas do solo da Área Experimental do IF Goiano – Campus Rio Verde, GO (janeiro de 2015).

pH (água)	P	K	Fe	Mn	Zn	Cu	Ca	Mg	Al	Mat. Org.	Sat. Bases	Areia	Silte	Argila
	-----mg dm <sup>-3</sup> -----					-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----				g dm <sup>-3</sup>	-----%-----			
5,9	14,6	243	8,0	52,2	5,0	1,1	4,1	1,2	0,02	31,6	54,5	36,2	17,4	46,4

Extratores: Mehlich 1 (P, K, Cu, Fe, Zn e Mn); KCl 1 N (Ca, Mg e Al)

No ensaio conduzido em 2014, avaliando-se os tratamentos de recomendação de NPK dentro de cada tratamento de inoculação, foi observado que a inoculação única de *Azospirillum brasilense* ou da co-inoculação de *A. brasilense* e *Penicillium* sp. possibilitou as maiores médias de produtividades de grãos de milho, sendo estatisticamente similares, nas doses de 90 e 120% da recomendação de NPK (Tabela 5). Para os tratamentos controle não inoculado e com *Penicillium* sp. as médias de produtividade de grãos foram incrementadas à medida que as recomendações de NPK também aumentaram (Tabela 5).

Comparando-se os tratamentos de inoculação dentro das recomendações de 60 e 90% de NPK, foi verificada que a co-inoculação de *A. brasilense* e *Penicillium* sp. proporcionou maiores médias de produtividade de grãos, comparada aos demais tratamentos de inoculação (Tabela 5). Tal inoculação, por exemplo, comparada ao controle não inoculado, incrementou a produtividade de grãos em 2.500 kg (42 sacas ha<sup>-1</sup>) e 3.054 kg ha<sup>-1</sup> (51 sacas ha<sup>-1</sup>), nas recomendações de 60 e 90% de NPK, respectivamente (Tabela 5). Na recomendação de 30% de NPK, não foi constatada diferença entre a inoculação única de *Penicillium* sp. e a co-inoculação de *A. brasilense*

e *Penicillium* sp. Na recomendação de 120% de NPK, ao contrário, não foi observada diferença entre os tratamentos de inoculação e o controle não inoculado (Tabela 5).

Tabela 5. Produtividade de grãos de milho, cultivado sob doses crescentes da recomendação de NPK e inoculado com micro-organismos promotores do crescimento vegetal, na área experimental do IF Goiano – Campus Rio Verde, GO (fevereiro a junho de 2014).

Recomendação de NPK (%)	Tratamentos de inoculação			
	Controle não inoculado	<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Azospirillum brasilense</i> + <i>Penicillium</i> sp.
	-----kg ha <sup>-1</sup> -----			
30	2.709,0 Db	3.416,0 Cb	4.401,5 Da	5.207,7 Ca
60	4.413,0 Cc	5.158,8 Bbc	5.490,2 Cb	6.913,0 Ba
90	6.150,3 Bc	8.616,0 Aab	8.297,2 Bb	9.204,7 Aa
120	9.197,3 Aa	9.411,5 Aa	9.329,5 Aa	8.984,0 Aa
CV (%)	7,1			

Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si, pelo teste Tukey (5%). *Azospirillum brasilense* AbV5 e AbV6 ( $2 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>): inoculação de 2 mL kg semente<sup>-1</sup> tanto isoladamente como em co-inoculação; *Penicillium* sp. ( $1,35 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>): inoculação de 2 mL kg semente<sup>-1</sup> tanto isoladamente como em co-inoculação.

No ensaio conduzido em 2015, comparando-se os tratamentos de recomendação de NPK dentro de cada tratamento de inoculação, as médias de produtividade de grãos foram incrementadas em todos os tratamentos de inoculação, à medida que as recomendações de NPK também aumentaram (Tabela 6). Especial destaque para as médias de produtividade atingidas pelas plantas co-inoculadas com *A. brasilense* e *Penicillium* sp. e fertilizadas com 90% da recomendação de NPK (10.648,5 kg ha<sup>-1</sup>), que foram similares (10.380,7 kg ha<sup>-1</sup>) às atingidas com o tratamento controle não inoculado e 120% da recomendação de NPK (Tabela 6). A co-inoculação de *A. brasilense* e *Penicillium* sp., portanto, resultou em economia de fertilizantes e incrementou a produtividade de grãos de milho, especificamente, nos tratamentos de 60, 90 e 120% da recomendação de NPK (Tabela 6).

Comparando-se os tratamentos de inoculação dentro das recomendações de 60, 90 e 120% de NPK, foi observado que a co-inoculação de *A. brasilense* e *Penicillium*

sp. proporcionou maiores médias de produtividade de grãos, comparada aos demais tratamentos de inoculação (Tabela 6). Similarmente ao ensaio conduzido em 2014, tal inoculação, comparada ao controle não inoculado, incrementou a produtividade de grãos em 2.449,5 kg (41 sacas ha<sup>-1</sup>), 3.367,7 kg ha<sup>-1</sup> (56,1 sacas ha<sup>-1</sup>) e 2.201,6 kg ha<sup>-1</sup> (36,7 sacas ha<sup>-1</sup>), nas recomendações de 60, 90 e 120% de NPK, respectivamente (Tabela 6). Na recomendação de 30% de NPK, não foi constatada diferença entre a inoculação única de *A. brasilense* ou *Penicillium* sp. e a co-inoculação de *A. brasilense* e *Penicillium* sp. (Tabela 6).

Tabela 6. Produtividade de grãos de milho, cultivado sob doses crescentes da recomendação de NPK e inoculado com micro-organismos promotores do crescimento vegetal, na área experimental do IF Goiano – Campus Rio Verde, GO (fevereiro a junho de 2015).

Recomendação de NPK (%)	Tratamentos de inoculação			
	Controle não inoculado	<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Azospirillum brasilense</i> + <i>Penicillium</i> sp.
	-----kg ha <sup>-1</sup> -----			
30	3.188,0 Db	4.206,8 Da	4.357,0 Da	5.032,7 Da
60	5.226,0 Cc	6.147,8 Cb	6.031,7 Cbc	7.675,5 Ca
90	7.280,3 Bc	9.200,0 Bb	9.361,2 Bb	10.648,5 Ba
120	10.380,7 Ac	11.346,2 Ab	11.721,0 Ab	12.582,3 Aa
CV (%)	5,8			

Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si, pelo teste Tukey (5%). *Azospirillum brasilense* AbV5 e AbV6 (2x10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>): inoculação de 2 mL kg semente<sup>-1</sup> tanto isoladamente como em co-inoculação; *Penicillium* sp. (1,35x10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup>): inoculação de 2 mL kg semente<sup>-1</sup> tanto isoladamente como em co-inoculação.

Segundo Rodrigues et al. (2012), as bactérias do gênero *Azospirillum* merecem atenção pois, além da FBN, podem produzir fitormônios ou estimular a produção endógena desses compostos, nas plantas. De acordo com Ikeda (2010), a inoculação a campo com *Azospirillum* spp., além da FBN, incrementa a produtividade e a superfície da absorção das raízes da planta, decorrente das modificações morfológicas do sistema radicular, além de alterar o número de radículas e o diâmetro médio das raízes laterais.

Moraes (2016) avaliaram a co-inoculação de *A. brasilense* e um isolado bacteriano solubilizador de fosfato em milho, em campo e observaram que a co-

inoculação foi efetiva apenas para a massa seca de raiz, quando aplicada na ausência de adubação nitrogenada. Também, essa co-inoculação, na presença de adubação fosfatada e nitrogenada em cobertura, proporcionou o maior valor de N total no solo.

Sousa et al. (2015) sugerem que para atingir benefícios máximos do uso de fertilizantes e melhor desenvolvimento vegetal, a tecnologia de inoculação de promotores do crescimento vegetal deve ser utilizada combinada aos níveis apropriados de fertilização.

Avaliando-se o demonstrativo de custo com fertilizantes na cultura do milho (Tabela 7), nota-se que o custo por hectare desta cultura torna-se oneroso considerando o nível de fertilização com NPK a ser adotado.

Especialmente numa agricultura empresarial, com avançadas tecnologias e um mercado promissor é viável investir, no máximo, em 90% da recomendação de NPK e compensar o restante da demanda com a co-inoculação de *A. brasilense* e *Penicillium* sp. Por outro lado, no caso de agricultura familiar e de subsistência, pode-se recomendar uma diminuição mais acentuada da recomendação de NPK e compensar até 50% dessa demanda com a co-inoculação de *A. brasilense* e *Penicillium* sp. Desta forma, a co-inoculação dos inoculantes supracitados é aplicável a ambos os níveis tecnológicos, utilizados nesta cultura.

Tabela 7. Demonstrativo de custo com fertilizantes na cultura do milho.

% de recomendação de NPK / há	Produtividade (sacas / ha)	Custo da inoculação / ha (R\$)	Custo da fertilização com NPK / ha (R\$)	Rendimento Bruto / ha (R\$)	Rendimento Líquido / ha (R\$)
30	53,13	0	280	1965,81	1685,81
60	87,10	0	560	3222,70	2662,00
90	121,33	0	840	4489,21	3649,21
120	173,01	0	1120	6401,37	5281,37
30	83,87	30,00	280	3103,19	2793,19
60	127,92	30,00	560	4733,04	4143,04
90	177,47	30,00	840	6566,39	5696,39
120	209,70	30,00	1120	7758,90	6638,90

## 5. CONCLUSÕES

- Os isolados fúngicos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. testados neste trabalho são capazes de solubilizar o fosfato natural de Bayóvar, sob condições *in vitro*, sendo que *Penicillium* sp. se destaca nesta habilidade.

- A co-inoculação de *A. brasilense* e *Penicillium* sp. possibilita incremento da produtividade de grãos de milho e permite redução da demanda por NPK de origem industrial.

- O custo com fertilizante pode ser reduzido com a co-inoculação de *A. brasilense* e *Penicillium* sp. sem que haja efeitos negativos na produtividade do milho.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDOTTO, L. E. B.; SILVA, L. G. Jr. dos S.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; BALDOTTO, M. A. Initial growth of maize in response to application of rock phosphate, vermicompost and endophytic bacteria. *Revista Ceres*, v. 59, p. 262-270, 2012.

BRAGA, J. M.; DE FELLIPO, B. V. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solos e planta. *Revista Ceres*, v. 21, p. 73-85, 1974.

BASHAN, Y.; KAMNEV, A.A.; DE-BASHAN, L.E. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biology and Fertility of Soil*, v. 49, p. 465-479, 2013.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, p. 529-535, 2008.

CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología, Argentina, 2008. 276 p.

COUTINHO, F. P.; FELIX, W. P.; YANO-MELO, A. M. Solubilization of phosphates *in vitro* by *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. *Ecological Engineering*, v. 42, p. 85-89, 2012.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

GOMES, E. A.; SILVA, U. C.; LANA, U. G. P.; MARRIEL, I. E. Avaliação do potencial de solubilização de fosfato de ferro in vitro por bactérias e fungos do solo. XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2010, Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo. *Resumos...* CD-Room.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Tecnologia de co-inoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*: incrementos no rendimento com sustentabilidade e baixo custo. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 33. Londrina. *Resumos...* Londrina: Embrapa, p. 151-153, 2013.

IKEDA, A. C. *Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias endofíticas isoladas de raízes de diferentes genótipos de milho (Zea mays L.)*. 2010. 77f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

MORAES, C. *Azospirillum brasilense e um isolado solubilizador de fósforo em milho*. 2012. 61f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita”, Jaboticabal, 2016.

OWEN, D.; WILLIAMS, A. P.; GRIFFITH, G. W.; WITHERS, P. J. A. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. *Applied Soil Ecology*, v. 86, p. 41-54, 2015.

RODRIGUES, A. C.; ANTUNES, J. E. L.; MEDEIROS, V. V.; BARROS, B. G. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. Resposta da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium* sp. em caupi. *Bioscience Journal*, v. 28, p. 196-202, 2012.

SOUSA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, v. 38, p. 401-419, 2015.

## CAPÍTULO II

### FEIJÃO CULTIVADO EM CAMPO E INOCULADO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E FUNGO SOLUBILIZADOR DE FOSFATO

(Normas de acordo com a revista Pesquisa Agropecuária Tropical)

RESUMO: O feijoeiro é uma das culturas mais difundidas no mundo e representa metade dos grãos de leguminosas consumidos. Entretanto, seu custo de produção é alto devido à baixa eficiência da adubação, principalmente a nitrogenada e fosfatada. Com este trabalho, objetivou-se avaliar a eficiência agrônômica da inoculação de bactérias diazotróficas e fungo solubilizador de fosfato, no feijoeiro, cultivado em solo de Cerrado. Um ensaio de campo foi conduzido, em 2015, em delineamento experimental de blocos ao acaso, esquema fatorial 4 x 4 (quatro doses adubação: 30, 60, 90 e 120% da recomendação de NPK; quatro tratamentos de inoculação: controle não inoculado; um isolado de FSF, um inoculante comercial formulado com *Azospirillum brasilense* (AbV5 e AbV6), e a mistura entre eles), com quatro repetições. Na colheita, 120 dias após a emergência, foi calculada a produtividade de grãos. Maiores médias de produtividade de feijão foram atingidas com a co-inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Penicillium* sp., nas quatro recomendações de NPK testadas. A co-inoculação de

*Azospirillum brasilense* e *Penicillium* sp. demonstrou ser mais efetiva que a inoculação exclusiva de *Azospirillum brasilense* ou *Penicillium* sp., o que indica sinergismo entre essas espécies microbianas. A co-inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Penicillium* sp. permite reduzir a demanda de NPK sem reduzir o patamar de produtividade de grãos.

Palavras-chave: sinergismo, inoculante microbiano, produtividade de grãos, *Phaseolus vulgaris* L.

#### COMMON BEAN GROWN IN THE FIELD AND INOCULATED WITH DIAZOTROPHIC BACTERIA AND P-SOLUBILIZING FUNGI

**ABSTRACT:** Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is one of the most widespread crops in the world and represents half of the legume grains consumed. However, its cost of production is high due to the low efficiency of the nitrogen/phosphate fertilization. This work aimed to evaluate the agronomic efficiency of the inoculation of diazotrophic bacteria and a P-solubilizing fungus (PSF) in common bean cultivated in Cerrado soil. A field trial was carried out in 2015 in a randomized complete block design, 4 x 4 factorial scheme (four fertilization doses: 30, 60, 90 and 120% of the NPK recommendation; four inoculation treatments: uninoculated control; a PSF isolate, a commercial inoculant formulated with *Azospirillum brasilense* - AbV5 and AbV6, and the mixture between them), with four replicates. At harvest, 120 days after emergence, grain yield was calculated. Higher bean yield were reached with the co-inoculation of *A. brasilense* and *Penicillium* sp. in the four NPK recommendations evaluated. Co-inoculation of *A. brasilense* and *Penicillium* sp. in bean was more effective than the exclusive inoculation of *A. brasilense* or *Penicillium* sp., indicating synergism among these microbial species. Co-inoculation of *A. brasilense* and *Penicillium* sp. reduces NPK demand without reducing grain yield.

Keywords: synergism, microbial inoculant, grain yield, *Phaseolus vulgaris* L.



## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil, em 2014, foi o terceiro maior produtor de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) no mundo, superado apenas pela Índia e Mianmar (FAO 2014). O feijoeiro é uma das culturas mais difundidas no mundo e representa metade dos grãos de leguminosas consumidos (Broughton et al. 2003). O grão de feijão é rico em fibras e carboidratos, além de ser uma importante fonte de vitaminas hidrossolúveis, como a tiamina, a riboflavina, a niacina e a folacina (Costa et al. 2000).

Na safra 2015/2016, a área plantada com a cultura do feijoeiro no Brasil foi de mais de 3 milhões de hectares, considerando três safras, ou épocas de colheita sendo que, para o estado de Goiás, a estimativa foi de 110 mil ha, com uma produtividade média de 1.500 kg ha<sup>-1</sup> (Conab 2016).

Um dos principais problemas na condução de culturas anuais, em campo, é a ineficiência dos fertilizantes nitrogenados. Neste sentido, a associação simbiótica leguminosa-rizóbio é conhecida por ser o sistema mais eficiente para FBN, e há experiências em que a co-inoculação com outras bactérias, também promotoras do crescimento vegetal, podem aumentar o número de nódulos e a massa seca de raízes, folhas e brotos. Por exemplo, Tajini et al. (2011) relatam que *Pseudomonas* ou *Azospirillum* podem incrementar a nodulação e a fixação de N na cultura do feijoeiro, quando em simbiose com rizóbio.

Bactérias do gênero *Bacillus* ou *Pseudomonas*, também podem desempenhar importante papel no controle biológico de doenças de feijão, tais como murcha bacteriana causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, ou podridão da raiz, causada por *Rhizoctonia solani* (Neal 2012).

Segundo Thomas et al. (2001), alguns micro-organismos, em interação com as plantas, podem beneficiá-las simultaneamente com mais de um traço funcional, tais como o biocontrole e a biofertilização. Por exemplo, a inoculação com *B. cepacia* SAOCV2 promoveu o crescimento do feijoeiro pela mobilização de P, aumentando em 44% o teor deste elemento e também atuou como antagonista a *Fusarium*. Além disso, incrementou o número de nódulos radiculares.

A inoculação conjunta (co-inoculação) de grupos microbianos pode ser mais estratégica que a inoculação isolada de estirpes individuais. Hungria et al. (2013), em ensaios de campo, observaram que a co-inoculação da soja com *B. japonicum* e *A. brasilense* resultou em aumentos notáveis no rendimento de grãos do feijoeiro e melhor

nodulação, comparado ao controle não inoculado. Especificamente, a co-inoculação com *R. tropici* e *A. brasilense* incrementou a produção de grãos, variando de 8,3% quando *R.tropici* foi inoculado sozinho a 19,6% quando foram usadas as duas espécies bacterianas. Similarmente, Domenech et al. (2006) evidenciaram que a co-inoculação de tomate e pimenta com *Bacillus subtilis* GB03 (promotora do crescimento), *B. amyloliquefaciens* IN937a (endofítica e indutora de resistência sistêmica) e quitosano, combinada com *P. fluorescens*, proporcionaram maior biocontrole de murcha causada por *Fusarium* e *damping-off* (*Rhizoctonia*).

Peres et al. (2016), também relatam que a co-inoculação de *R. tropici* e *A. brasilense* incrementou a nodulação do feijoeiro, no segundo ano de cultivo, sob duas lâminas de irrigação em Selvíria, MS. Por outro lado, nenhum dos tratamentos de inoculação avaliados (testemunha sem inoculação com 40 kg ha<sup>-1</sup> de N em cobertura, 80 kg ha<sup>-1</sup> de N em cobertura sem inoculação, inoculação de *A. brasilense* com 40 kg ha<sup>-1</sup> de N em cobertura, inoculação de *R. tropici* com 40 kg ha<sup>-1</sup> de N em cobertura, e co-inoculação de *A. brasilense* e *R. tropici* com 40 kg ha<sup>-1</sup> de N em cobertura) incrementou a produtividade de grãos, comparado ao controle não inoculado com 40 kg ha<sup>-1</sup> de N em cobertura.

No presente, escassos são os trabalhos que avaliam a co-inoculação de FSF e diazotróficas associativas. Kumar et al. (2014) sugerem que muitas vezes o desempenho de solubilizadores de fosfatos, sob condições *in situ* não é confiável e que, portanto, precisa ser melhorado usando técnicas de co-inoculação.

## 2. OBJETIVO

Avaliar a eficiência agrônômica da inoculação de bactérias diazotróficas e fungo solubilizador de fosfato, no feijoeiro, cultivado em solo de Cerrado.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

Um ensaio com a cultura do feijoeiro foi conduzido em campo, no período de março a junho de 2015. Especificamente, o ensaio foi implantado na área experimental do IF Goiano – Campus Rio Verde (latitude 17° 32' 35" S e longitude 51° 02' 42" O, com elevação de 861 m). O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, esquema fatorial 4 x 4 (quatro doses de NPK; quatro tratamentos de

inoculação: sem utilização de inoculante e três combinações de inoculante de FSF e de bactéria diazotrófica), com quatro repetições.

Os tratamentos de recomendação de adubação nitrogenada (ureia), fosfatada (superfosfato simples) e potássica (KCl) foram equivalentes a 30% (60 kg ha<sup>-1</sup> de N + 30 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + 30 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O), 60% (120 kg ha<sup>-1</sup> de N + 60 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + 60 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O); 90% (180 kg ha<sup>-1</sup> de N + 90 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + 90 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O) e 120% (240 kg ha<sup>-1</sup> de N + 120 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + 120 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O).

Quanto aos tratamentos de inoculação, as sementes foram inoculadas (2 mL/kg sementes) com um isolado de FSF (1,35x10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup>), um inoculante comercial (2 mL/kg sementes) formulado com *Azospirillum brasilense* (AbV5 e AbV6 - 2x10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>), e a mistura entre eles (2 mL de cada um/ kg sementes). Também foi utilizado um controle não inoculado. O isolado de FSF (*Penicillium* sp.), foi isolado a partir da rizosfera de feijão, cultivado por 45 dias, em vasos contendo Latossolo Vermelho distroférico, coletado na área em que o ensaio foi conduzido.

Antes da implantação de cada ensaio, foi realizada a análise química e física do solo, para determinação da textura, pH, teores de macro e micronutrientes, assim como a densidade populacional de diazotróficos.

O espaçamento entre linhas adotado foi o de 0,5 m com uma distribuição de 10 sementes por metro linear e a cultivar do feijão foi a BRS Estilo do grupo comercial Carioca, com germinação acima de 80%.

O manejo de plantas invasoras foi realizado com capinas manuais e aplicação de herbicida Amplo<sup>®</sup> (Bentazona 600 g L<sup>-1</sup> + Imaxamoxi 28 g L<sup>-1</sup>) na dose de 1000 mL ha<sup>-1</sup> em estádio V4. Já o manejo de doenças, foi feito com quatro aplicações do fungicida Abacus<sup>®</sup> (Piraclostrobina 260 g L<sup>-1</sup> + Epoxiconazol 160 g L<sup>-1</sup>) a 500 mL ha<sup>-1</sup> cada uma nos estádios V4, V8, R2 e R5 e para o controle de insetos foram aplicadas cinco doses do inseticida Pirate<sup>®</sup> (Clorfenapir 240 g L<sup>-1</sup>) na dose de 600 mL ha<sup>-1</sup>, 800 mL ha<sup>-1</sup>, 800 mL ha<sup>-1</sup>, 1000 mL ha<sup>-1</sup>, 1000 mL ha<sup>-1</sup>, nos estádios V4, V8, R1, R3 e R5 respectivamente.

As parcelas foram constituídas por áreas de 3,0 x 8,0 m, distanciadas 1,0 m uma da outra. A área total da parcela foi de 24 m<sup>2</sup> e a área útil correspondeu às quatro linhas centrais, desprezando-se 1m em cada extremidade. A área total das parcelas correspondeu a 1.536 m<sup>2</sup>.

O ensaio foi conduzido por 120 dias. Na colheita foi calculada a produtividade de grãos (kg ha<sup>-1</sup>) e realizada demonstrativo de custo dos processos envolvidos na

nutrição e rendimento das culturas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey (5%), utilizando o software Sisvar (Ferreira, 2011).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No solo da área do ensaio, foi detectada a população de diazotróficos equivalente a  $4,52 \times 10^3$  UFC  $g^{-1}$  solo. Os resultados das características químicas e de textura do solo utilizado para implantação do ensaio, estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Características químicas e granulométricas do solo da Área Experimental do IF Goiano – Campus Rio Verde, GO (janeiro, 2015).

pH (água)	P	K	Fe	Mn	Zn	Cu	Ca	Mg	Al	Mat. Org.	Sat. Bases	Areia	Silte	Argila
	-----mg $dm^{-3}$ -----					----cmol <sub>c</sub> $dm^{-3}$ ----				g $dm^{-3}$	-----%-----			
5,9	14,6	243	8,0	52,2	5,0	1,1	4,1	1,2	0,02	31,6	54,5	36,2	17,4	46,4

Extratores: Mehlich 1 (P, K, Cu, Fe, Zn e Mn); KCl 1 N (Ca, Mg e Al)

Avaliando-se a recomendação de NPK dentro de cada tratamento de inoculação, não foi verificada diferença entre as doses de 90 e 120% da recomendação de NPK, nas plantas co-inoculadas com *Azospirillum brasilense* e *Penicillium* sp. (Tabela 2). Nas plantas inoculadas somente com *Azospirillum brasilense*, *Penicillium* sp. ou as não inoculadas (controle), foi detectada maior média de produtividade utilizando 120% da recomendação de NPK. De modo geral, médias decrescentes de produtividade foram atingidas à medida que as recomendações de NPK decresceram (Tabela 2).

Comparando-se os tratamentos de inoculação, dentro de cada nível de recomendação de NPK, foram observadas maiores médias de produtividade com a co-inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Penicillium* sp., nas quatro recomendações de NPK testadas (Tabela 2).

De acordo com a CONAB (2015), a média de produtividade de feijão, em Goiás (segunda safra), foi de  $2.013 \text{ kg ha}^{-1}$ . No presente trabalho, todas as doses de NPK aliadas à co-inoculação de *A. brasilense* e *Penicillium* sp. proporcionaram maiores médias de produtividade de grãos que a estadual (Tabela 2). Por exemplo,  $2.814$  e  $3.302 \text{ kg ha}^{-1}$  foram as médias atingidas com 60 e 90% da recomendação de

NPK, o que equivale, respectivamente, a 802 kg ha<sup>-1</sup> (13,4 sacas ha<sup>-1</sup>) e 1.289 kg ha<sup>-1</sup> (21,5 sacas ha<sup>-1</sup>) a mais que a média de Goiás.

Tabela 2. Produtividade de grãos de feijoeiro, cultivado sob doses crescentes da recomendação de NPK e inoculado com micro-organismos promotores do crescimento vegetal, na área experimental do IF Goiano – Campus Rio Verde, GO (março a junho de 2015).

Recomendação de NPK (%)	Tratamentos de inoculação			
	Controle não inoculado	<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Azospirillum brasilense</i> + <i>Penicillium</i> sp.
	-----kg ha <sup>-1</sup> -----			
30	1.418,5 Dc	1.888,0 Db	1.935,7 Db	2.241,2 Ca
60	1.896,5 Cc	2.233,5 Cb	2.254,5 Cb	2.814,7 Ba
90	2.240,8 Bc	2.833,0 Bb	2.880,7 Bb	3.302,0 Aa
120	2.770,8 Ac	3.083,2 Ab	3.127,0 Ab	3.356,2 Aa
CV (%)	3,6			

Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si, pelo teste Tukey (5%). *A. brasilense* AbV5 e AbV6 ( $2 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) 2 mL kg semente<sup>-1</sup> isolado e 2 mL kg semente<sup>-1</sup> em mistura; *Penicillium* sp. ( $1,35 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>) inoculação de 2 mL kg semente<sup>-1</sup> tanto isoladamente como em co-inoculação.

Neste trabalho, a co-inoculação mostrou-se mais efetiva que a inoculação única de *Azospirillum brasilense* ou *Penicillium* sp. Possivelmente, isto foi devido ao sinergismo entre as espécies microbianas supracitadas. Especificamente, *A. brasilense* pode ter, pela produção de fitormônios, estimulado a formação de pelos radiculares e, ou incrementado o volume radicular. Consequentemente, ocorreu maior absorção de água e nutrientes, o que favoreceu a nutrição, o crescimento e a produtividade de grãos.

Para Grant et al. (2001), o fornecimento adequado de P se destaca em relação aos demais nutrientes, pois é essencial desde os estádios iniciais de desenvolvimento da cultura. Novakowski et al. (2011) estudando os efeitos da inoculação de *A. brasilense* sobre a produtividade do feijoeiro observaram ajuste linear positivo ao incremento de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> residual do solo, sendo que a produtividade de grãos respondeu à aplicação de doses crescentes, com valor superior a 240 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Benvindo (2012), avaliando o efeito da aplicação de seis doses de P na semeadura do feijão (0, 50, 100, 150, 200 e 300 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), na forma de superfosfato triplo no

município de Bom Jesus, PI, verificaram que as doses elevaram os teores do nutriente no solo e como nas folhas e sementes. Especificamente, a aplicação de P aumentou a produtividade de grãos, atingindo  $1.319 \text{ kg ha}^{-1}$ , na dose de  $168 \text{ kg ha}^{-1}$  de  $\text{P}_2\text{O}_5$ .

Valderrama et al. (2009), após testarem quatro doses de N, com dose máxima de  $120 \text{ kg ha}^{-1}$  em cobertura, no feijoeiro cv. Pérola, foi observada resposta linear destas, avaliando-se a produtividade.

Hungria et al. (2013), ao conduzir cinco experimentos com feijoeiro em Londrina e Ponta Grossa, nos anos de 2009, 2010 e 2010/11, obtiveram maior produtividade com a co-inoculação de *Rhizobium* e *Azospirillum* no sulco de plantio. De acordo com Stocco et al. (2008), fatores ambientais afetam a diversidade e eficiência de micro-organismos capazes de formar simbiose com o feijoeiro: a acidez do solo, temperatura e déficit hídrico, assim como o manejo do solo.

Avaliando-se o demonstrativo de custo com fertilizantes na cultura do feijoeiro (Tabela 3), nota-se que o custo por hectare desta cultura é onerado à medida que a recomendação dos níveis de fertilização com NPK aumentam.

Se considerada a média de produtividade de grãos, em Goiás, e o custo da adubação das lavouras de feijão (Tabela 3), é possível indicar 60% da recomendação de NPK, aliada à co-inoculação de *A. brasilense* e *Penicillium* sp. Tal estratégia resultará em produtividade de grãos superior à estadual e com um custo inferior. Os inoculantes supracitados, portanto, têm potencial para reduzir a demanda de fertilizantes sem reduzir o patamar de produtividade de grãos.

Tabela 3. Demonstrativo de custo com fertilizantes na cultura do feijão.

% de recomendação de NPK / ha	Produtividade (sacas / ha)	Custo da inoculação / ha (R\$)	Custo da fertilização com NPK / ha (R\$)	Rendimento Bruto / ha (R\$)	Rendimento Líquido / ha (R\$)
30	23,64	0	250	7092,00	6.842,00
60	31,60	0	500	9480,00	8.980,00
90	37,34	0	750	11202,00	10.452,00
120	46,22	0	1000	13866,00	12.866,00
30	37,35	30,00	250	11205,00	10.925,00
60	46,91	30,00	500	14073,00	13.543,00
90	55,03	30,00	750	16509,00	15.729,00
120	55,93	30,00	1000	16779,00	15.749,00

## 5. CONCLUSÕES

- Maiores médias de produtividade de feijão foram atingidas com a co-inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Penicillium* sp., nas quatro recomendações de NPK testadas.
- A co-inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Penicillium* sp. demonstrou ser mais efetiva que a inoculação exclusiva de *Azospirillum brasilense* ou *Penicillium* sp., o que indica sinergismo entre essas espécies microbianas.
- A co-inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Penicillium* sp. permite reduzir a demanda de NPK sem reduzir o patamar de produtividade de grãos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENVINDO, R. N. *Adubação fosfatada e potássica na nutrição e na produtividade de feijão-caupi, cultivado no município de Bom Jesus-PI*. 2012. 61f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita”, Jaboticabal, 2012.

BROUGHTON, W. G.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. *Plant and Soil*, v. 252, p. 55-128, 2003.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. *Acompanhamento da safra brasileira de grãos*. v. 2. Safra 2014/15 - N. 9, 9º Levantamento. Junho, 2015.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. *Acompanhamento da safra brasileira de grãos*. v. 3. Safra 2015/16 - N. 9, 9º Levantamento, Junho, 2016.

COSTA, H. S.; RIOS-RUIZ, W. F.; LAMBAIS, M. R. Salicylic acid inhibits arbuscular mycorrhizae formation and changes chitinase and b-1,3-glucanase expression in bean roots. *Scientia Agricola*, v. 57, p. 19-25, 2000.

DOMENECH, J.; REDDY, M. S.; KLOEPPER, J. W.; RAMOS, B.; GUTIÉRREZ-MAÑERO, J. Combined application of the biological product Is213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil-borne diseases in pepper and tomato. *BioControl*, v. 51, p. 245-258, 2006.

FAO - Food And Agriculture Organization (2014) *Faostat 2014*. Disponível em <http://faostat3.fao.org/home/E>. Acessado em: 31 de outubro de 2016.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

GRANT, C. A.; PLATEND, D. N.; TOMAZIEWICZ, D. J. SHEPPARD, S. C. A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. *Informações Agronômicas*, Potafós, n. 95, p. 1-5, 2001.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. *Biology and Fertility of Soils*, v. 49, p. 791-801, 2013.

KUMAR, A.; CHOUDHARY, C. S.; PASWAN, D.; KUMAR, B.; ARUN, A. Sustainable way for enhancing phosphorus efficiency in agricultural soils through phosphate solubilizing microbes. *Asian Journal of Soil Science*, v. 9, p. 300-310, 2014.



NEAL, A. L.; AHMAD, S.; GORDON-WEEKS, R.; TON, J. Benzoxazinoids in root exudates of maize attract *Pseudomonas putida* to the rhizosphere. *PLoS One*, v. 7, e35498, 2012.

NOVAKOWISKI, J. H.; SANDINI, I. E.; FALBO, M. K.; MORAES, A. CHENG, N. C. Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. *Semina - Ciências Agrárias*, v. 32, p. 1687-1698, 2011.

PERES, A. R.; RODRIGUES, R. A. F.; ARF, O.; PORTUGAL, J. R.; CORSINI, D. C. D. C. Co-inoculation of *Rhizobium tropici* and *Azospirillum brasilense* in common beans grown under two irrigation depths. *Revista Ceres*, v. 63, p. 198-207, 2016.

STOCCO, P.; SANTOS, J. C. P.; VARGAS, V. P.; HUNGRIA, M. Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbiotes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Santa Catarina. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 32, p.1107-1120, 2008.

TAJINI, F.; DREVON J. J. Co-inoculação com *Glomus intraradices* e *Rhizobium tropici* CIAT899 aumenta a eficiência do uso P para fixação de N<sub>2</sub> do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) sob deficiência de P em cultura hydroaeroponic. *Symbiosis*, v. 53, p. 123-129, 2011.

THOMAS, A. L.; COSTA, J. A. Desenvolvimento da planta de soja e o potencial de rendimento de grãos. In: THOMAS, A. L.; COSTA, J. A. (Ed.). *Soja: manejo para alta produtividade de grãos*. Porto Alegre: Evangraf, 2010. p. 13-33.

VALDERRAMA, M.; BUZETTI, S.; BENETT, C. G. S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M. Fontes e doses de NPK em milho irrigado sob plantio direto. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 41, p. 254-263, 2011.

## CONCLUSÃO GERAL

- Os isolados fúngicos *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. testados neste trabalho são capazes de solubilizar o fosfato natural de Bayóvar, sob condições *in vitro*, sendo que *Penicillium* sp. se destaca nesta habilidade.

- A co-inoculação de *A. brasilense* e *Penicillium* sp. possibilita incremento da produtividade de grãos de milho e permite redução da demanda por NPK de origem industrial.

- O custo de produção pode ser reduzido com a co-inoculação de *A. brasilense* e *Penicillium* sp. sem que haja efeitos negativos na produtividade do milho.

- Maiores médias de produtividade de feijão foram atingidas com a co-inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Penicillium* sp., nas quatro recomendações de NPK testadas.

- Para o feijoeiro, a co-inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Penicillium* sp. demonstrou ser mais efetiva que a inoculação exclusiva de *Azospirillum brasilense* ou *Penicillium* sp., o que indica sinergismo entre essas espécies microbianas.

- Para o feijoeiro, a co-inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Penicillium* sp. permite reduzir a demanda de NPK sem reduzir o patamar de produtividade de grãos.