



**SILVIA MARIA DE OLIVEIRA**

**RIZOBACTÉRIAS PROMOVEM O  
CRESCIMENTO DE FEIJOEIRO-COMUM E DE  
MILHO POR DIFERENTES PROCESSOS**

**Lavras – MG**

**2011**

**SILVIA MARIA DE OLIVEIRA**

**RIZOBACTÉRIAS PROMOVEM O CRESCIMENTO DE FEIJOEIRO-  
COMUM E DE MILHO POR DIFERENTES PROCESSOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Microbiologia Agrícola, área de concentração em Biotecnologia de micro-organismos aplicada à agropecuária e ao meio ambiente, para a obtenção do título de Doutora.

Orientadora

PhD Fatima Maria de Souza Moreira

**LAVRAS - MG**

**2011**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Oliveira, Silvia Maria de.

Rizobactérias promovem o crescimento de feijoeiro-comum e de milho por diferentes processos / Silvia Maria de Oliveira. – Lavras : UFLA, 2011.

103 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Fatima Maria de Souza Moreira.

Bibliografia.

1. *Burkholderia*. 2. Rizobactérias promotoras de crescimento. 3. *Zea mays*. 4. *Phaseolus vulgaris*. I. Universidade Federal de Lavras.  
II. Título.

CDD – 589.95

**SILVIA MARIA DE OLIVEIRA**

**RIZOBACTÉRIAS PROMOVEM O CRESCIMENTO DE FEIJOEIRO-  
COMUM E DE MILHO POR DIFERENTES PROCESSOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Microbiologia Agrícola, área de concentração em Biotecnologia de micro-organismos aplicada à agropecuária e ao meio ambiente, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 02 de dezembro de 2011.

Dr. Carlos Alberto de Bastos Andrade	UFLA
Dr. Francisco Adriano de Souza	EMBRAPA Milho e Sorgo
Dr <sup>a</sup> Maria Catarina Megumi Kasuya	UFV
Dr. Messias José Bastos de Andrade	UEM

PhD Fatima Maria de Souza Moreira

**LAVRAS – MG  
2011**

***Cada dia, Senhor, Surgem oportunidades para provar que Tu és minha fonte inesgotável, de poder ilimitado, eficaz e acionado pela minha fé.***

*Os sonhos não determinam o lugar onde vocês vão chegar, mas produzem a força necessária para tirá-los do lugar em que vocês estão. Sonhem com as estrelas para que vocês possam pisar pelo menos na Lua. Sonhem com a Lua para que vocês possam pisar pelo menos nos altos montes. Sonhem com os altos montes para que vocês possam ter dignidade quando atravessarem os vales das perdas e das frustrações. Bons alunos aprendem a matemática numérica, alunos fascinantes vão além, aprendem a matemática da emoção, que não tem conta exata e que rompe a regra da lógica. Nessa matemática você só aprende a multiplicar quando aprende a dividir, só consegue ganhar quando aprende a perder, só consegue receber, quando aprende a se doar.*

Augusto Cury

*A Maria Silva Oliveira, minha mãe, pelo vínculo sublime na minha vida. Exemplo de simplicidade, força, perseverança e amor incondicional. Esteve ao meu lado a cada segundo desde o princípio.*

*A Raimundo Nonato de Oliveira, meu pai, exemplo de humildade, simplicidade e caráter.*

**DEDICO**

*A todos os “mestres” e “doutores” desta vida que possuem simplicidade, sinceridade, humildade, respeito e amor ao próximo.*

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ser minha fonte inesgotável;

### BRINDO À CASA

À professora Fátima M. S. Moreira pela orientação, incentivo e, principalmente, pela oportunidade e confiança depositada na realização do trabalho.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, professores, colegas e técnicos.

A CAPES, pelo auxílio financeiro e por proporcionar um ensino de Pós-graduação de qualidade.

Aos professores da banca examinadora, Dr. Carlos Alberto de Bastos Andrade, Dr. Francisco Adriano de Souza, Dr<sup>a</sup> Maria Catarina Kasuya, Dr. Messias José Bastos de Andrade pelas sugestões.

À Marlene e ao Manuel pela amizade, incentivo e apoio sempre prestados.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia do Solo: Amanda, Analuiza, Bruno, Cândido, Cássia, Cleide, Fernanda, Gláucia, Jack, Jerusa, Jessé, Karina, Kize, Krisle, Ligiane, Márcia, Marco, Patrícia Leal, Paula Rose, Plínio, Rogério, Romildo e Teotônio pela convivência e amizade.

Ao Pedro Martins, Leandro Marciano Marra e o Paulo, em especial, que estavam ali presente em pelo menos em uma etapa na realização deste trabalho. Muito obrigada!

Às Pesquisadoras Dr<sup>a</sup> Rosângela Stralio, Dr<sup>a</sup> Liamara Perin e a Rosa Maria Pitard pela iniciação em Microbiologia do Solo.

### BRINDO À VIDA

Aos meus pais, Raimundo Nonato de Oliveira e Maria da Silva Oliveira pelo amor e apoio dado durante toda minha vida, principalmente na vida acadêmica. Sem este apoio, certamente não teria chegado onde estou.

### MEUS AMORES

Ao meu noivo Rogério Francisco Longatti pela paciência, dedicação e apoio dado na concretização deste meu sonho.

## MINHA FAMÍLIA

Aos meus irmãos Eliana Maria, Ângela, Isabel Cristina, Sérgio, Luiz, Zé Raimundo, e em especial a João Ricardo, que se tornou símbolo de incentivo para meus estudos;

A todos os meus sobrinhos que amo tanto e em especial a Sarah Karolina, minha afilhada, à Fernanda e ao Felipe que compartilharam de perto comigo um pouco da minha luta em prol desta conquista.

A todos vocês, obrigada!

## RESUMO

Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs) promovem o crescimento de plantas leguminosas e não leguminosas incrementando a sua nutrição, principalmente de nitrogênio e fósforo. Para isso, essas bactérias utilizam de mecanismos como a solubilização de fosfato inorgânico insolúvel, produção de hormônios de crescimento vegetal e fixação biológica do nitrogênio na rizosfera, além de outros mecanismos. O trabalho teve como objetivo estudar o efeito da coinoculação da CIAT 899<sup>T</sup>, estirpe aprovada pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) como inoculante para a cultura do feijoeiro-comum, com estirpes de *Burkholderia fungorum* (UFLA 04-226, UFLA 04-217, UFLA 04-155, UFLA 04-232) *Burkholderia* sp. (UFLA 04-234) e *Azospirillum brasilense* (BR 11001<sup>T</sup>), selecionadas em “screening” anterior como candidatas potenciais. Também se verificou a capacidade de estirpes com potencial de solubilizar fosfato inorgânico insolúvel *in vitro* em promover o crescimento de feijoeiro-comum e milho em diferentes condições. Em condições axênicas, a coinoculação da estirpe CIAT 899<sup>T</sup> com a estirpe UFLA 04-155 aumentou a matéria seca dos nódulos e da parte aérea, conteúdo de P, Mg, Cu e Fe em relação à planta inoculada somente com CIAT 899<sup>T</sup>. Já no solo, UFLA 04-155 proporcionou aumento significativo dos parâmetros citados acima, e ainda o conteúdo de K, Ca, S e Zn, estimulando a comunidade nativa de rizóbios de forma significativa quando comparado com à planta não inoculada. Pela primeira vez, estes resultados indicam o potencial de *Burkholderia fungorum* para promover o crescimento de feijoeiro-comum coinoculada ou não com a CIAT 899<sup>T</sup>. Em condições axênicas, UFLA 04-155 e UFLA 04-21, aplicadas conjuntamente ao fosfato de cálcio insolúvel (P-Ca) foram capazes de aumentar a matéria seca da parte aérea do feijoeiro-comum em relação à planta que recebeu somente o P-Ca, mas o aumento não foi causado pelo mecanismo de solubilização. Já em solo, essas duas estirpes, mais a UFLA 04-233, promoveram o crescimento do milho pela solubilização do fosfato natural, após 45 dias após emergência. O mecanismo de solubilização de fosfato insolúvel utilizado por estas estirpes provavelmente foi o de liberação de ácido 2-cetoglucônico e também de ácido oxálico. Esses ácidos foram identificados e quantificados entre os ácidos estudados em HPLC. Estes resultados indicam que *Burkholderia* sp. UFLA 04-21 pode ser uma candidata em potencial para o desenvolvimento de biofertilizante aplicável na cultura do milho.

**Palavras-chave:** Rizobactérias Promotoras de Crescimento. *Burkholderia*. *Zea mays*. *Phaseolus vulgaris*.

## ABSTRACT

Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) promote the growth of legumes and non-legume plants enhancing their nutrition, mainly of nitrogen and phosphorus. For this purpose, these bacteria make use of mechanisms such as solubilization of insoluble inorganic phosphate, plant growth hormone production and biological fixation of nitrogen in the rhizosphere, in addition to other mechanisms. The work was intended to investigate the effect of the co-inoculation of CIAT 899<sup>T</sup>, strain approved by MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Ministry of Agriculture and Supply) as an inoculant for the bean plant crop with strains of *Burkholderia fungorum* (UFLA 04-226, UFLA 04-217, UFLA 04-155, UFLA 04-232) *Burkholderia* sp. (UFLA 04-234) and *Azospirillum brasilense* (BR 11001<sup>T</sup>), selected in a previous screening as potential candidates. Also there was the ability of strains with the potential to solubilize insoluble inorganic phosphate *in vitro* to promote the growth of common bean and corn under different conditions. In axenic conditions, the co-inoculation of strain CIAT 899<sup>T</sup> with strain UFLA 04-155 increased the dry matter of the nodules and of the shoot, content of P, Mg, Cu and Fe in relation to the plant inoculated only with CIAT 899<sup>T</sup>. However, in soil, UFLA 04-155 provided significant increase of the above-cited parameters, and further the content of K, Ca, S and Zn, stimulating the native community of rhizobes in a significant way as compared with the non-inoculated plant. These results point out, for the first time, the potential of *Burkholderia fungorum* to promote the growth of common bean plant either co-inoculated or not with CIAT 899<sup>T</sup>. Under axenic conditions, both UFLA 04-155 and UFLA 04-21, applied jointly with insoluble calcium phosphate (P-Ca) were capable of increasing the shoot dry matter of the common bean plant in relation to the plant which was given only P-Ca, but the increase was not caused by the solubilization mechanism. But in soil, those two strains, more UFLA 04-233, promoted the growth of the corn by the solubilization of natural phosphate 45 days after planting. The solubilization mechanism of insoluble phosphate utilized by these strains was probably the one of release of 2-ketogluconic acid and also of oxalic acid. Those acids were identified and quantified among the acids studied in HPLC. These results point out that *Burkholderia* sp. UFLA 04-21 may be a potential candidate for the development of biofertilizer applicable into corn crop.

**Keywords:** Growth-Promoting Rhizobacteria. *Burkholderia*. *Zea mays*. *Phaseolus vulgaris*.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 Introdução geral .....	11
1 INTRODUÇÃO .....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	13
2.1 Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCPs) .....	13
2.2 Produção de substâncias reguladoras do crescimento de plantas (SRCP) ou hormônios de crescimento vegetal.....	15
2.3 Solubilização de fosfato por micro-organismos.....	17
2.4 Bactérias Fixadoras de Nitrogênio Nodulíferas em Leguminosas (BFNNL) & Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCPs).....	20
REFERÊNCIAS.....	24
CAPÍTULO 2 Efeitos da coinoculação de Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs) e CIAT 899 <sup>T</sup> ( <i>Rhizobium tropici</i> ) em feijoeiro-comum.....	33
1 INTRODUÇÃO .....	36
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	38
3 RESULTADOS.....	44
4 DISCUSSÃO .....	56
5 CONCLUSÕES .....	59
REFERÊNCIAS.....	60
CAPÍTULO 3 Promoção de crescimento de feijoeiro-comum ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) e milho ( <i>Zea mays</i> ) por estirpes de <i>Burkholderia</i> solubilizadora de fosfato.....	65
1 INTRODUÇÃO .....	68
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	70
3 RESULTADOS .....	80
4 DISCUSSÃO .....	95

5 CONCLUSÕES .....	97
REFERÊNCIAS.....	98

## CAPÍTULO 1 Introdução geral

### 1 INTRODUÇÃO

Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs), conhecidas como PGPR – “Plant Growth-Promoting Rhizobacteria”, são bactérias que crescem na rizosfera de uma planta hospedeira, estimulando seu desenvolvimento. Essas são encontradas entre as bactérias de vida livre, além de bactérias associativas e endofíticas, que são capazes de colonizar a raiz (KLOEPPER; LIFSHITZ; ZABLOTOWICZ, 1989).

Através de certos mecanismos, as RPCPs interferem diretamente na nutrição das plantas, promovem o controle biológico de fitopatógenos e produzem substâncias promotoras de crescimento vegetal (ASHASD; FRANKENBERGER, 1998), podendo também influenciar na simbiose entre os micro-organismos e as plantas, estimulando o crescimento destas (KLOEPPER; LIFSHITZ; ZABLOTOWICZ, 1989).

Avanços no conhecimento da relação solo-rizóbio-planta para o aumento da fixação simbiótica do  $N_2$  estão ocorrendo constantemente e uma das estratégias adicionais que vem sendo conduzida é a associação de RPCPs com rizóbios em leguminosas de importância agrícola (VESSEY, 2003). É de interesse agrônomo associar bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL) com as rizobactérias, de forma que, associadas, possam contribuir para o crescimento vegetal através de processos importantes realizados na rizosfera.

As RPCPs afetam positivamente o crescimento das plantas por mecanismos diretos ou indiretos. Entre os mecanismos de ação direta, destacam-se: a solubilização de fosfatos inorgânicos, disponibilizando o fósforo para a

planta e para si mesmo (CHABOT et al., 1998); produção de hormônios de crescimento vegetal participantes do metabolismo de diversas espécies de bactérias associadas aos vegetais, os quais podem ser considerados agentes causais da alteração do crescimento e desenvolvimento vegetal (BARSHAN; HOLGUIM, 1997) como auxina, citocinina e etileno. O mecanismo de ação indireta é o antagonismo a fitopatógenos, devido à produção de enzimas, antibióticos, ácido cianídrico, competição por nutrientes e sideróforos (KLOEPPER; LIFSHITZ; ZABLOTOWICZ, 1989).

Uma vez presentes no solo, as rizobactérias promotoras de crescimento vegetal podem contribuir para o incremento no efeito dos inoculantes comerciais, com maiores benefícios para os agricultores, diminuindo a utilização não só de fertilizantes nitrogenados, mas também de fosfatados. Como consequência, a planta se desenvolve de maneira ecológica e mais sustentável. Assim, considerando aspectos econômicos e ambientais, é necessário um esforço por parte da pesquisa para incrementar a contribuição dos processos biológicos nos inoculantes comerciais e de novas alternativas de inoculante visando, por exemplo, à solubilização de fosfatos inorgânicos de baixa solubilidade e sua disponibilização para as plantas.

Considerando a capacidade que os micro-organismos têm para promover o crescimento de plantas através de vários mecanismos, este trabalho teve como objetivo verificar o efeito da inoculação de feijoeiro-comum e milho com estirpes bacterianas selecionadas previamente *in vitro* por apresentar alguns mecanismos que podem promover o crescimento vegetal.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCPs)

Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, conhecidas na literatura como “plant growth-promoting rhizobacteria” (PGPR), são bactérias de vida livre, associativas ou endofíticas, que associadas à rizosfera estão envolvidas no crescimento das plantas de diversas maneiras.

O interesse pelo estudo dos mecanismos que as RPCPs possam vir a realizar na rizosfera vem aumentando consideravelmente nas últimas décadas e, conforme seus efeitos, elas podem ser classificadas como benéficas, neutras ou, até mesmo, deletérias em relação ao crescimento da planta (KLOEPPER; LIFSHITZ; ZABLOTOWICZ, 1989; NEHL; ALLEN; BROWN, 1996). Esses efeitos podem variar de cultura para cultura, sendo que se uma espécie bacteriana não é capaz de ser benéfica para o crescimento de uma cultura não se pode generalizar para outras culturas, até que seja confirmada e testada em outras condições que possam ser propícias para o seu bom funcionamento. As diferenças na exsudação radicular e a diversidade de substratos metabólicos que as RPCPs podem utilizar são fatores que influenciam na colonização das populações microbianas na rizosfera, podendo assim, variar de cultivar para cultivar. Porém, se houver uma alteração no padrão exsudativo da planta, o mesmo isolado e o mesmo genótipo vegetal podem interagir de maneira diferente. Na rizosfera de milho foram encontradas estirpes de *Pseudomonas fluorescens* e *Bulkholderia cepacia* com capacidade para produção de ácido indol 3-acético, ácido salicílico e sideróforos (HERNÁNDEZ et al., 2004). *Pseudomonas* sp. e *Agrobacterium tumefaciens*, diazotróficas, produtoras de AIA e de níveis baixos de etileno e não solubilizadoras de fosfato, induziram a um aumento significativo no comprimento das raízes e da massa seca da parte

aérea quando inoculadas em repolho chinês (*Brassica chinensis* L.) (YIM et al., 2009).

Trabalho realizado por Schlindwein et al. (2008) demonstra nitidamente como as RPCPs podem afetar negativamente o desenvolvimento das plantas, pois plântulas de alface, quando inoculadas com estirpes de *Rhizobium leguminosarum* que produziram altas concentrações de ácido 3-indol acético (AIA) ( $171,17\mu\text{g mL}^{-1}$ ) tiveram prejuízos em seu desenvolvimento. Tais estirpes foram deletérias para a alface. Enquanto, estirpes de *Bradyrhizobium* sp. que produziram níveis baixos de AIA ( $1,2$  a  $3,3\mu\text{g mL}^{-1}$ ) aumentaram o vigor das plântulas em relação ao tratamento sem inoculação.

Os efeitos benéficos que as RPCPs exercem no crescimento das plantas são os de maior interesse agrícola, podendo agir pela ação direta e indireta. Entre os mais variados meios de promover o crescimento das plantas de forma direta, está a fixação do  $\text{N}_2$  atmosférico; síntese de substâncias reguladoras de crescimento vegetal (auxina, giberelina, citocinina, etileno, ácido abscísico) (VESSEY, 2003; XIE; PASTERNAK; GLICK, 1996), síntese de algumas enzimas (como 1 aminocyclopropane-1-carboxylate - ACC desaminase) que modulam o nível de hormônios nas plantas; mineralização de fosfato orgânicos e solubilização de fosfatos inorgânicos (HARA; OLIVEIRA, 2004, 2005; MARRA et al., 2011; NAHAS, 2002; SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982; VESSEY, 2003) que disponibilizam o fósforo para as plantas e para o seu metabolismo (CHABOT et al., 1998).

A promoção indireta do crescimento ocorre pela diminuição ou prevenção de efeitos deletérios de micro-organismos patogênicos, principalmente devido à competição, síntese de antibióticos (NEJAD; JOHNSON, 2000) ou sideróforos (LEONG, 1986) pelas bactérias.

A supressão de micro-organismos deletérios do ambiente endofítico através de processos de competição ou antibiose muitas vezes ocorre porque o

nicho ecológico ocupado por bactérias endofíticas é o mesmo ocupado por espécies fitopatogênicas (NEJAD; JOHNSON, 2000).

Entre outras bactérias, as que pertencem aos gêneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Hydrogenophaga*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* são conhecidas por produzir metabólitos de interesse agrícola e por promover o crescimento vegetal, mesmo sendo consideradas como organismos de vida livre ou de rizosfera (BENIZRI; BAUDOIN; GUCKERT, 2001). A colonização de tecidos por estes organismos está relacionada a diversos fatores, sendo que a interação entre os genótipos do vegetal e do micro-organismo é o principal deles (DONG et al., 1995; MAHAFFEE et al., 1997).

Além do potencial de fixação biológica do nitrogênio (FBN) simbiótica em leguminosas, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* também são indicadas para serem usadas como RPCPs em não leguminosas, pois produzem fitormônios e sideróforos e solubilizam fosfatos (ANTOUN et al., 1998). O efeito da inoculação de rizobactérias nas plantas pode ser de forma isolada: rizobactéria-planta, ou ainda de forma consorciada, quando coinoculada na simbiose rizóbio-leguminosa. Efeitos estimuladores nessa simbiose já foram encontrados por alguns autores (ARAÚJO et al., 2010; PETERSEN et al., 1996; SILVA; SILVA; FIGUEIREDO, 2006a, 2006b).

## **2.2 Produção de substâncias reguladoras do crescimento de plantas (SRCP) ou hormônios de crescimento vegetal**

Substâncias reguladoras do crescimento de planta (SRCP) são reguladores naturais que influenciam os processos fisiológicos em baixas concentrações, controlando o crescimento da planta. Podem ser classificadas

como auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico. Quando produzidas pela própria planta, também são denominadas de fitormônios.

O mecanismo mais freqüentemente citado para explicar os efeitos das bactérias promotoras de crescimento vegetal em plantas é a produção de hormônios de crescimento vegetal, principalmente auxinas (PATTEN; GLICK, 1996). Dentre os hormônios produzidos pelas bactérias, o ácido 3-indol-acético (AIA) é a auxina mais abordada na literatura, o que pode ser devido ao AIA ser a principal auxina de ocorrência natural nas plantas. Existe ampla evidência de micro-organismos do solo que estão ativamente envolvidos na síntese de auxinas em meio de cultura com resultados positivos em plantas no solo (ANTOUN et al., 1998; BISWAS et al., 2000; HAMEED et al., 2004; KHALID; ARSHAD; ZAHIR, 2004; RADWAN et al., 2002; THAKURIA et al., 2004; VEGA-HERNÁNDEZ; LEON-BARRIOS; PÉREZ-GALDONA, 2002) e diferentes vias metabólicas para a biossíntese do AIA bacteriano já foram descritas (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007; THEUNIS et al., 2004). Essa substância afeta a morfologia das raízes aumentando o comprimento e o número de pêlos radiculares, conseqüentemente, aumentando a área de entrada de nutrientes e exsudação radicular. Experimentos com rizobactérias promotoras de crescimento vegetal isoladas da rizosfera de mostarda (*Brassica juncea* L.) e trigo revelaram diversidade de bactérias, com eficiência variável para produção de auxina *in vitro* e que, ao serem inoculadas nessas plantas, promoveram maior crescimento vegetal em relação aos tratamentos controle (ASGHAR et al., 2002; KHALID; VANDERLEYDEN; REMANS, 2004). No entanto, há relatos de que isolados de rizobactérias têm efeito variável (ambos, negativo e positivo) no alongamento e peso das raízes em diferentes cultivares de trigo (KHALID et al., 2004). O cultivo de isolado de rizóbio na presença de triptofano foi deletério às plântulas de alface, provocando perdas no vigor das sementes e formação de plântulas anormais (SCHLINDWEIN et al., 2008).

Em leguminosas, a fixação biológica de nitrogênio nos nódulos é vista como primeira função da simbiose, a segunda seria a produção de AIA, ambas as funções suprem a planta hospedeira na simbiose rizóbio-leguminosas (GHOSH; BASU, 2006). Mudanças no balanço de auxina na planta hospedeira são pré-requisitos para organogênese do nódulo (MATHESIUS et al., 1998) e o seu metabolismo pode ser importante para a persistência de um nódulo funcional na raiz (BADENOCH-JONES; ROLFE; LETHAM, 1983).

### **2.3 Solubilização de fosfato por micro-organismos**

O fósforo (P) é um dos nutrientes mais limitantes ao desenvolvimento vegetal. No solo, seus teores são relativamente elevados, no entanto, a concentração do P solúvel disponível para a assimilação pelas raízes vegetais é muito baixa, atingindo cerca de 0,05% do conteúdo no solo e apenas 0,1% do P total está prontamente disponível para as plantas (ZOU; BINKLEY; DOXTADER, 1992).

Essa baixa disponibilidade do fósforo é devido à alta reatividade do P solúvel com Ca, Fe e Al, formando fosfatos insolúveis, o que implica a necessidade de grandes aplicações de fosfatos solúveis no solo para que as culturas alcancem alta produtividade. Em solos alcalinos, fosfato de cálcio é a forma predominante de P, e nos solos ácidos, como é o caso dos solos brasileiros, a forma insolúvel é predominante em virtude da abundância de oxidróxidos de alumínio e ferro. Estimam que a quantidade de P acumulada nos solos agrícolas seria suficiente para sustentar a produção agrícola mundial por cerca de 100 anos sem a adição do P extra, se o P retido já aplicado pudesse ser aproveitado pelas culturas (GOLDSTEIN; ROGERS; MEAD, 1993).

A maior reserva de P são as rochas e outros depósitos, como as apatitas e outros minerais primários formados durante as eras geológicas (RODRIGUEZ;

FRAGA, 1999). Esse elemento é abundante no solo, de forma inorgânica ou orgânica. Na forma orgânica, o fósforo apresenta como componentes de proteínas e ácido graxos que devem ser mineralizados para serem absorvidos pelas plantas, enquanto o fósforo inorgânico pode ser solubilizado através da atividade das raízes das plantas ou micro-organismos do solo.

Vários grupos importantes da comunidade microbiana edáfica ou da rizosfera possuem a habilidade de solubilizar fosfatos inorgânicos insolúveis, por meio de mecanismos diversos (HARA; OLIVEIRA, 2004, 2005; MARRA et al., 2011; NAHAS; ASSIS, 1992; SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982), tornando a solubilização de diferentes fontes de fósforo inorgânicos insolúveis (hidroxiapatita, fluorapatita, variscita, estrengita, etc) uma das principais alternativas sustentáveis para aumentar a quantidade deste nutriente disponível às plantas (ANTOUN et al., 1998; CHABOT; ANTOUN; CESCAS, 1996; CHABOT et al., 1996, 1998; GYANESHWAR et al., 2002; KIM; JORDAN; MCDONALD, 1998; LAHEURTE; BERTHELIN, 1988; RICHA; KHOSLA; REDDY, 2007; SOUCHIE et al., 2005). Destaca-se os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Penicillium* e *Aspergillus* como os de maiores capacidade solubilizadora de fosfatos inorgânicos de baixa solubilidade (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999).

As bactérias fixadoras de nitrogênio nodulífera em leguminosas (BFNNL) estão entre os micro-organismos com capacidade de solubilizar o fosfato inorgânico de baixa solubilidade, podendo aumentar a disponibilidade de fósforo para o crescimento das plantas leguminosas e não leguminosas (ANTOUN et al., 1998; PEIX et al., 2001a, 2001b; VESSEY, 2003). Plantas de *Phaseolus vulgaris* L. inoculadas com *Rhizobium etli* reduziram sua nodulação em mais de 50 % quando submetida à baixa condição de fósforo (REMANS et al., 2007), confirmando assim, a interferência da disponibilidade de fósforo na associação Rizóbio-leguminosa. Estirpes de *Rhizobium* têm sido relatadas

solubilizando diferentes quantidades de fosfato em meio de cultura líquido e *R. leguminosarum* promovendo o crescimento do milho (CHABOT et al., 1998). Essas bactérias, quando envolvidas na solubilização do fósforo, podem aumentar o crescimento vegetal pelo aumento da eficiência da fixação biológica do nitrogênio em leguminosas. A inoculação de bactérias nodulíferas em leguminosas (BNL) eficientes na fixação do nitrogênio atmosférico e solubilização de fosfato no solo podem ser utilizadas como forma de substituir ou diminuir não só os fertilizantes nitrogenados, mas também os fertilizantes fosfatados solúveis, aproveitando, assim, os fosfatos naturais existentes ou as formas insolúveis.

A solubilização de fosfato inorgânico está relacionada a fatores ambientais, como níveis nutricionais e interação com outros micro-organismos do ambiente (VESSEY, 2003). O principal mecanismo de ação na solubilização de fosfato inorgânico é a produção de ácidos orgânicos sintetizados por diversos micro-organismos do solo, incluindo bactérias e fungos (SILVA FILHO; VIDOR, 2000), que promovem acidificação do ambiente ao seu redor. O ácido mais frequentemente observado entre os solubilizadores de fosfato é o ácido glucônico, mas outros ácidos também estão envolvidos na solubilização de fosfato, como os ácidos 2-cetoglucônico, láctico, isovalérico, isobutírico, acético glicólico, malônico e succínico, em diferentes espécies de bactérias (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999). Assim, micro-organismos com capacidade de solubilizar diferentes formas de fosfatos têm potencial para o aproveitamento do P presente na fase sólida do solo, constituindo-se em alternativa viável para inoculação de plantas.

A capacidade dos micro-organismos de solubilizar fosfatos pouco solúveis pode ser visualizada e estimada quantitativamente através do uso de métodos em placa de Petri com meio de cultura para solubilizadores contendo fosfato insolúvel como única fonte de fósforo, onde se forma uma zona (halo)

translúcida ao redor da colônia (PEIX et al., 2001a, 2001b; HARA; OLIVEIRA, 2004; MARRA et al., 2011; SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982) e alguns resultados indicam que a mobilização do fósforo para as plantas está diretamente relacionada com a capacidade de solubilização em meio de cultura sólido (PEIX et al., 2001a, 2001b; RIVAS et al., 2006).

#### **2.4 Bactérias Fixadoras de Nitrogênio Nodulíferas em Leguminosas (BFNNL) & Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCPs)**

A contribuição de bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas (BFNNL) para a nutrição de plantas já é bastante conhecida. Nesta simbiose, a BFNNL coloniza tecidos vegetais internos como as raízes, causando o desenvolvimento de estruturas altamente especializadas, denominadas nódulos. Uma vez que ocorre a formação de nódulos funcionais, elas fixam o nitrogênio atmosférico, que é transferido para a planta hospedeira em troca de fotoassimilados (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma dessas leguminosas privilegiadas com os benefícios das BFNNL. É utilizada como alimento básico pela população brasileira, constituindo sua principal fonte de proteína vegetal. Graças à sua ampla adaptação edafoclimática, fazem parte da maioria dos sistemas de produção dos pequenos e médios produtores rurais, os quais utilizam a produção para consumo familiar e geração de renda. O feijoeiro-comum também é comumente cultivado em pequenas propriedades rurais na África e outros países da América Latina, usando geralmente solos marginais com baixa fertilidade em nitrogênio (N<sub>2</sub>) e fósforo (P) (GRAHAM, 1981).

A inoculação de sementes destas culturas com BFNNL é uma tecnologia capaz de substituir totalmente, ou parcialmente, a adubação nitrogenada, resultando em diminuição nos custos de produção, beneficiando assim, a maioria

dos agricultores, que geralmente são de baixo poder aquisitivo. Também é alternativa para economizar combustíveis fósseis utilizados na fabricação de fertilizantes nitrogenados.

Efeitos benéficos de rizóbios em feijoeiro-comum têm sido descritos em diversos estudos, em diferentes condições climáticas e solos (PEIX et al., 2001b; REMANS et al., 2007). No Sul de Minas Gerais, experimentos implantados também indicam que é possível a cultura se beneficie, em condições de campo, do processo de FBN, podendo alcançar níveis de produtividade semelhantes à adubação nitrogenada (SOARES et al., 2006).

O efeito positivo na simbiose rizóbio-leguminosa pelas RPCPs já foram observado em alguns trabalhos. Nessa simbiose, a contribuição no crescimento da planta, nodulação e fixação do N<sub>2</sub>, já foi demonstrada na cultura de feijoeiro-comum quando coinoculadas com algumas rizobactérias. *Rhizobium* e *Azospirillum brasilense* aumentaram o número total de nódulos e os nódulos superiores no feijoeiro, além da matéria seca da parte aérea (BURDMAN et al., 1996; BURDMAN; KIGEL; OKON, 1997). A coinoculação também promoveu a formação de pêlos radiculares e *A. brasilense* aumentou a secreção de flavonóides indutores dos genes nod (BURDMAN et al., 1996). *Rhizobium etli* quando coinoculada com *A. brasilense* ou com *Bacillus subtilis* aumentou significativamente o número e o peso seco dos nódulos e a matéria seca da parte aérea e da raiz (REMANS et al., 2007). *Rhizobium tropici* CIAT899<sup>T</sup> e *Bacillus* sp. aumentou o número e a matéria seca dos nódulos, bem como na matéria seca da raiz e na parte aérea das plantas de feijoeiro; entretanto, a mesma estirpe de *Bacillus* sp. afetou negativamente a simbiose *Bradyrhizobium-soja* (CAMACHO et al., 2001). *Bacillus cereus* (UW85) não teve nenhum efeito positivo quando inoculado ou co-inoculado em plantas de feijoeiro-comum em condições de campo (BULLIED; BUSS; VESSEY, 2002). Já a estirpe CIAT899<sup>T</sup> de *R. tropici* e *P. polymyxa* estimularam a nodulação, bem como fixação de nitrogênio,

formando associação de grande eficiência simbiótica em feijão (FIGUEIREDO et al., 2008). *P. fluorescens* (P-39) teve melhor efeito promotor nos componentes de produção do feijoeiro-comum, quando inoculados com *Rhizobium* (133) do que o *Azospirillum lipoferum* (S-21) e os autores atribuíram a diferença à produção de sideróforos, à alta habilidade para a produção de auxina e a atividade solubilizadora de fósforo (P) de *P. fluorescens* (YADEGARI et al., 2008). Remans et al. (2007) ainda mostraram que o efeito das rizobactérias na planta de feijoeiro é dependente da nutrição de fósforo (P). Petersen et al. (1996), estudando *Rhizobium etli* e *P. polymyxa* co-residentes na rizosfera de feijoeiro-comum nos primeiros onze dias de desenvolvimento após germinação, observaram aumento na densidade dos rizóbios na superfície da raiz, no número de nódulos e na formação de raízes laterais.

Na simbiose *Bradyrhizobium* e feijão caupi, a relação N<sub>2</sub> acumulado/matéria seca da raiz, foi significativamente maior quando as plantas foram coinoculadas com *P. polymyxa* e nas comparações das médias, as plantas coinoculadas apresentaram rendimento médio superior de matéria seca da parte aérea (12x), de matéria seca da parte aérea/ matéria seca da raiz (16x), de N<sub>2</sub> acumulado (52x) e de N acumulado/matéria seca da raiz (63x) em comparação com o grupo inoculado somente com a RPCPs (SILVA et al., 2007).

Os resultados desses trabalhos indicam que, dependendo da estirpe de RPCPs, existem limitações para a fixação do N<sub>2</sub> e para o crescimento das plantas. No entanto, é necessário um esforço da pesquisa em selecionar estirpes de RPCPs favoráveis para essa associação simbiótica, uma vez que a produção de metabólitos pelas bactérias pode oferecer aumentos nas concentrações de N, P, Fe, Ca e Cu, na parte aérea do hospedeiro. A coinoculação de *Bradyrhizobium* sp. e *P. polymyxa* introduzidas no solo, por exemplo, proporcionou aumentos nas concentrações de cálcio, ferro e fósforo nas plantas de feijão caupi (SILVA; SILVA; FIGUEIREDO, 2006b).

Em alfafa, a inoculação com *Sinorhizobium meliloti* mais *Bacillus* spp. solubilizadora de fosfato, aumentou a massa seca da raiz e o seu comprimento, a massa seca da parte aérea e o teor de N (GUIÑAZÚ et al., 2010). Outros autores demonstraram que algumas bactérias do gênero *Pseudomonas* estimularam a nodulação de leguminosas por *Rhizobium* spp. e *Bradyrhizobium* spp. (GRIMES; MOUNT, 1987; POLONENKO et al., 1987).

Além do potencial da fixação biológica do nitrogênio, algumas bactérias nodulíferas comportam-se como rizobactérias. Resultados na literatura indicam estirpes simbióticas de leguminosas como de *Rhizobium* e de *Bradyrhizobium* com excelente potencial para serem utilizadas como rizobactérias promotoras de crescimento em não leguminosas, envolvendo os mesmos mecanismos de ação já conhecidos para outras rizobactérias, como produção de hormônios (AIA), solubilização de fosfatos inorgânicos e produção de sideróforos (ANTOUN et al., 1998; BOIERO et al., 2007). Entretanto, Oliveira (2009) estudando BNL com alta eficiência simbiótica em feijoeiro-comum e caupi, constatou que as mais eficientes na FBN nessas leguminosas, não são aquelas mais eficientes para a solubilização de fosfato e produção de hormônios (AIA).

## REFERÊNCIAS

ANTOUN, H. et al. Potencial of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 204, n. 1, p. 57-67, Jan. 1998.

ARAÚJO, A. S. F. et al. Co-inoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: efeito sobre nodulação, fixação de N<sub>2</sub> e crescimento das plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 1, p. 182-185, jan. 2010.

ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W. T. Plant growth- regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 62, n. 1, p. 45-151, Jan. 1998.

ASGHAR, H. N. et al. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 35, n. 2, p. 231-237, Feb. 2002.

BADENOCH-JONES, J.; ROLFE, B. G.; LETHAM, D. S. Phytohormones, *Rhizobium* mutants, and nodulation in legumes. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 73, n. 2, p. 347-352, 1983.

BARSHAN, Y.; HOLGUIM, G. Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances: 1999-1996. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 1, p. 103-121, Jan. 1997.

BENIZRI, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 11, n. 5, p. 557-574, Oct. 2001.

BISWAS, J. C. et al. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v. 92, n. 5, p. 880-886, Sept. 2000.

BOIEIRO, L. et al. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 74, n. 4, p. 874-880, Mar. 2007.

BULLIED, W. J.; BUSS, T. J.; VESSEY, J. K. *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes: field studies. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 82, n. 2, p. 291-298, Feb. 2002.

BURDMAN, S. et al. Promotion of nod gene inducers and nodulation in common bean (*Phaseolus vulgaris*) root inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 8, p. 3030-3033, Aug. 1996.

BURDMAN, S.; KIGEL, J.; OKON, Y. Effect of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 29, n. 5/6, p. 923-929, Dec. 1997.

CAMACHO, M. et al. Co-inoculation with *Bacillus* sp. CECT 450 improves nodulation in *Phaseolus vulgaris*. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 47, n. 11, p. 1058-1062, Nov. 2001.

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M. P. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 184, n. 2, p. 311-321, 1996.

CHABOT, R. et al. Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphatesolubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Soil Biology and Biochemistry**, Washington, v. 30, n. 12, p. 1615-1618, Dec. 1998.

\_\_\_\_\_. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 62, n. 8, p. 2767-2772, Aug. 1996.

DONG, Z. et al. Further evidence that the N<sub>2</sub>-fixing endophytic bacterium from the intercellular spaces of sugarcane stems is *Acetobacter diazotrophicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 5, p. 1843-1846, May 1995.

FIGUEIREDO, M. V. B. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 7, p. 1187-1193, July 2008.

GHOSH, S.; BASU, P. S. Production and metabolism of indole acetic acid in roots and root nodules of *Phaseolus mungo*. **Microbiological Research**, Jena, v. 161, n. 4, p. 362-366, Nov. 2006.

GOLDSTEIN, A. H.; ROGERS, R. D.; MEAD, G. Mining by microbe. **Nature Biotechnology**, London, v. 11, n. 11, p. 1250-1254, Nov. 1993.

GRAHAM, P. H. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: a review. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 4, n. 1, p. 93-112, 1981.

GRIMES, H. D.; MOUNT, M. S. Influence of *Pseudomonas putida* on nodulation of *Phaseolus vulgaris*. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 6, n. 1, p. 27-30, Jan. 1987.

GUIÑAZÚ, L. B. et al. Response of alfalfa (*Medicago sativa* L.) to single and mixed inoculation with phosphate-solubilizing bacteria and *Sinorhizobium meliloti*. **Biology and Fertility Soils**, Berlin, v. 46, n. 2, p. 185-190, Feb. 2010.

GYANESHWAR, P. et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 245, n. 1, p. 83-93, Jan. 2002.

HAMEED, S. et al. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strain isolated from cultivated legumes. **Biology and Fertility Soils**, Berlin, v. 39, n. 2, p. 179-185, Apr. 2004.

HARA, F. A. dos S.; OLIVEIRA, L. A. de. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizobio de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 7, p. 667-672, jul. 2005.

\_\_\_\_\_. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 34, n. 2, p. 343-357, set. 2004.

HERNÁNDEZ, A. et al. Characterization of rhizobacteria associated to maize crop in IAA, siderophores and salicylic acid metabolite production. **Revista Colombiana de Biotecnología**, Bogotá, v. 6, n. 1, p. 6-13, 2004.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 3, p. 473-480, Mar. 2004.

KIM, K. Y.; JORDAN, D.; MCDONALD, G. A. Effect of phosphate: solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. **Biology and Fertility Soil**, Berlin, v. 26, n. 1, p. 79-87, Feb. 1998.

KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 39-44, Feb. 1989.

LAHEURTE, F.; BERTHELIN, J. Effect of a phosphate solubilizing bacteria on maize growth and root exudation over four levels of labile phosphorus. **Plant and Soil**, The Hague, v. 105, n. 1, p. 11-17, 1988.

LEONG, J. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 187-208, 1986.

MAHAFFEE, W. F. et al. Comparative analysis of antibiotic resistance, immunofluorescent colony staining and a transgenic marker (bioluminescence) for monitoring the environmental fate of a rhizobacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 4, p. 1617-1622, Apr. 1997.

MARRA, L. M. et al. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 5, p. 603-609, Sept./Oct. 2011.

MATHESIUS, U. et al. Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. **The Plant Journal**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 23-34, Jan. 1998.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

NAHAS, E. Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. **Bragantia**, Campinas, v. 61, n. 3, p. 267-275, 2002.

NAHAS, E.; ASSIS, L. C. de. Solubilização de fosfatos de rochas por *Aspergillus Níger* em diferentes tipos de vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 325-331, fev. 1992.

NEHL, D. B.; ALLEN, S. J.; BROWN, J. F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 1-20, 1996.

NEJAD, P.; JOHNSON, P. A. Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. **Biological Control**, San Diego, v. 18, n. 3, p. 208-215, July 2000.

OLIVEIRA, S. M. de. **Processos promotores de crescimento vegetal por bactérias diazotróficas de vida livre ou simbióticas de feijão comum, caupi e siratro**. 2009. 66 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, n. 3, p. 207-220, Mar. 1996.

PEIX, A. et al. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 103-110, Jan. 2001a.

\_\_\_\_\_. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 33, n. 14, p. 1927-1935, Nov. 2001b.

PETERSEN, D. J. et al. *Bacillus polymyxa* stimulates increased *Rhizobium etli* populations and nodulation when co resident in the rhizosphere of *Phaseolus vulgaris*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 142, n. 2/3, p. 271-276, Sept. 1996.

POLONENKO, D. R. et al. Effects of root colonization bacteria on nodulation of soybean roots by *Bradyrhizobium japonicum*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 33, n. 6, p. 498-503, June 1987.

RADWAN, T. et al. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 32, n. 1, p. 39-54, 2002.

REMANS, R. et al. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on nodulation of *Phaseolus vulgaris* L. are dependent on plant P nutrition. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 119, n. 3, p. 341-351, Nov. 2007.

RICHA, G.; KHOSLA, B.; REDDY, M. S. Improvement of maize plant growth by phosphate solubilizing fungi in rock phosphate amended soils. **World Journal of Agricultural Sciences**, Oxford, v. 3, n. 4, p. 481-484, 2007.

RIVAS, R. et al. Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different Spanish soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 287, n. 1, p. 23-33, 2006.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 17, n. 4/5, p. 319-339, Oct. 1999.

SCHLINDWEIN, G. et al. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 658-664, maio/jun. 2008.

SILVA, V. N. et al. Estirpes de *Paenibacillus* promotora de nodulação específica na simbiose *Bradyrhizobium-caupi*. **Acta Scientia Agronomy**, Maringá, v. 29, n. 3, p. 331-338, 2007.

SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. Atuação de rizóbios com rizobactéria promotora de crescimento em plantas na cultura do caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). **Acta Scientia Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 3, p. 407-412, July/Sept. 2006a.

\_\_\_\_\_. Co-inoculação de sementes de caupi com *Bradyrhizobium* e *Paenibacillus* e sua eficiência na absorção de cálcio, ferro e fósforo pela planta. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 2, p. 95-99, 2006b.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 24, n. 2, p. 311-329, mar./abr. 2000.

SOARES, A. L. L. et al. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativa nodulífera em Perdões, MG: II., feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 30, n. 5, p. 803-811, set./out. 2006.

SOUCHIE, E. L. et al. Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. **Floresta**, Curitiba, v. 35, p. 329-334, maio/ago. 2005.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Review**, Haren, v. 31, n. 4, p. 425-448, July 2007.

SYLVESTER-BRADLEY, R. et al. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 12, n. 1, p. 15-22, 1982.

THAKURIA, D. et al. Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. **Current Science**, Columbus, v. 86, n. 7, p. 978-985, July 2004.

THEUNIS, M. et al. Flavonoids, NodD1, NodD2, and nod-box NB15 modulate expression of the *y4wEFG* locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, p. 1153-1161, Oct. 2004.

VEGA-HERNÁNDEZ, M. C.; LEON-BARRIOS, M.; PÉREZ-GALDONA, R. Indole-3-acetic acid production from indole-3-acetonitrile in *Bradyrhizobium*. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 34, n. 5, p. 665-668, May 2002.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, The Hague, v. 255, n. 2, p. 571-586, Aug. 2003.

XIE, H.; PASTERNAK, J. J.; GLICK, B. R. Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizo-bacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indoleacetic acid. **Current Microbiology**, New York, v. 32, n. 1, p. 67-71, 1996.

YADEGARI, M. et al. Evaluation of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds inoculation with *Rhizobium phaseoli* and plant growth promoting rhizobacteria on yield and yield components. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Lahore, v. 11, n. 15, p. 1939-1939, 2008.

YIM, J. W. et al. Characterization of plant-growth promoting diazotrophic bacteria isolated from field grown chinese cabbage under different fertilization conditions. **The Journal of Microbiology**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 147-155, Apr. 2009.

ZOU, X.; BINKLEY, D.; DOXTADER, K. G. A new method for estimating gross phosphorus mineralization and immobilization rates in soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 147, n. 2, p. 243-250, Dec. 1992.

**CAPÍTULO 2 Efeitos da coinoculação de Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs) e CIAT 899<sup>T</sup> (*Rhizobium tropici*) em feijoeiro-comum**

## RESUMO

O feijoeiro-comum *Phaseolus vulgaris* L. é a leguminosa alimentar mais importante para o consumo humano do mundo, por estar entre as principais fontes de proteína vegetal. Em contraste com outras leguminosas, a simbiose *Rhizobium*-feijoeiro-comum é considerada de baixa eficiência em fixar o nitrogênio atmosférico. No entanto, rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) tem sido estudada, de forma a maximizar a fixação biológica de N<sub>2</sub> (FBN), disponibilizar e aumentar a eficiência na absorção de nutrientes como P ou substâncias reguladoras de crescimento e inibir doenças. Portanto, o objetivo do trabalho foi estudar o comportamento das plantas de feijoeiro-comum quando coinoculadas ou não com BPCPs em duas condições experimentais diferentes e assim avaliar a sinergia entre as bactérias como alternativa para otimizar a FBN, além de promover o crescimento vegetal por outros processos. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação em condições axênicas e no solo, utilizando o feijoeiro-comum cv. BRS-MG Talismã. As BPCPs utilizadas foram: *Burkholderia fungorum* - UFLA 04-226, UFLA 04-217, UFLA 04-155 e UFLA 04-232, *Burkholderia* sp. – UFLA04-234 e *Azospirillum brasilense* – BR 11001<sup>T</sup> e a estirpe recomendada como inoculante comercial para o feijoeiro-comum *Rhizobium tropici* – CIAT 899<sup>T</sup>. Em condições axênicas, a coinoculação da estirpe CIAT 899<sup>T</sup> com a estirpe UFLA 04-155 aumentou a matéria seca dos nódulos e da parte aérea, conteúdo de P, Mg, Cu e Fe em relação a planta inoculada somente com a CIAT 899<sup>T</sup>. Já no solo, UFLA 04-155 proporcionou aumento significativo dos parâmetros citados acima, mais o do conteúdo de K, Ca, S e Zn estimulando a comunidade nativa de rizóbios de forma significativa quando comparado com a não inoculada. O mecanismo de promoção de crescimento da UFLA 04-226 foi estimulado pela adubação nitrogenada. As leituras do SPAD correlacionaram-se, positivamente, com os teores foliares de N e negativamente com os de S. Estes resultados indicam, pela primeira vez, o potencial de *Burkholderia fungorum* em promover o crescimento de feijoeiro-comum coinoculada ou não com a CIAT899<sup>T</sup>.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas. *Rhizobium tropici*.

## ABSTRACT

The common-bean plant *Phaseolus vulgaris* L. is the world's food legume most important to human consumption for being among the main sources of plant protein. In contrast with other legumes, the symbiosis *Rhizobium*-common-bean plant is regarded as of low efficiency in fixing atmospheric nitrogen. Nevertheless, plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) have been studied so as to maximize the biological fixation of N<sub>2</sub> (BFN), increase and make the efficiency in absorbing nutrients such as P or plant hormones and inhibit diseases. Therefore, the objective of the work was investigating the behavior of common-bean plants when co-inoculated or not with PGPRs under two different experimental conditions and also to evaluate the synergies among the bacteria as an alternative to optimize FBN, besides promoting the plant growth by other processes. The experiments were conducted in greenhouse under axenic conditions and in soil, utilizing the common-bean plant cv. BRS-MG Talismã. The PGPRs utilized were: *Burkholderia fungorum* - UFLA 04-226, UFLA 04-217, UFLA 04-155 and UFLA 04-232, *Burkholderia* sp. - UFLA04-234 and *Azospirillum brasilense* - BR 11001<sup>T</sup> and the strain recommended as a commercial inoculant for the common-bean plant *Rhizobium tropici* - CIAT 899<sup>T</sup>. Under axenic conditions, the co-inoculation of strain CIAT 899<sup>T</sup> with strain UFLA 04-155 increased the dry matter of the nodules and of the shoot, content of P, Mg, Cu and Fe in relation to the plant inoculated only with CIAT 899<sup>T</sup>. But in soil, UFLA 04-155 provided a significant increase of the above-cited parameters plus the one of the content of K, Ca, S and Zn by stimulating the native community of rhizobia in a significant way as compared with the non-inoculated one. The growth-promoting mechanism of UFLA 04-226 was stimulated by nitrogen fertilization. The SPAD readings correlated positively with the leaf contents of N and negatively with those of S. These results point out, for the first time, the potential of *Burkholderia fungorum* to promote the growth of common-bean plant co-inoculate or not with CIAT899<sup>T</sup>.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. Plant Growth-Promoting Bacteria. *Rhizobium tropici*.

## 1 INTRODUÇÃO

A simbiose rizóbio-leguminosa é conhecida por ser o mais eficiente sistema de fixação biológica do nitrogênio (FBN), sendo importante no fornecimento de proteínas para o consumo humano. Dentre as leguminosas formadoras dessa simbiose, o feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a cultura que é considerada com a mais baixa eficiência da fixação do nitrogênio. Isso se deve a diversos fatores genéticos, tanto da planta como da bactéria, assim como a interação desses fatores com ambiente. Diante desse problema, uma estratégia adicional vem sendo conduzida com as Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs) associadas à *Rhizobium tropici* (CIAT 899<sup>T</sup>) (aprovada para o inoculante comercial), na tentativa de melhorar a nodulação, FBN e crescimento da cultura (CAMACHO et al., 2001; FIGUEIREDO et al., 2008; LEE et al., 2005; OLIVERA et al., 2011).

As rizobactérias são componentes da comunidade da rizosfera que são capazes de colonizar as raízes (KLOEPPER; LIFSHITZ; ZABLOTOWICZ, 1989), exercendo efeitos benéficos ao crescimento das plantas por meio de diversos mecanismos de ação direta ou indireta. Entre os mecanismos de ação direta destacam-se a solubilização de fosfatos inorgânicos insolúvel, disponibilizando o fósforo para a planta e para o seu metabolismo (CHABOT et al., 1998); a produção de hormônios de crescimento vegetal participantes do metabolismo de diversas espécies de bactérias associadas aos vegetais e que podem ser considerados agentes causais da alteração do crescimento e desenvolvimento vegetal (BARSHAN; HOLGUIM, 1997), como auxina, citocinina e etileno. E como mecanismo de ação indireta o antagonismo a fitopatógenos, devido à produção de enzimas, antibióticos, ácido cianídrico; sideróforos e competição por nutrientes (KLOEPPER; LIFSHITZ; ZABLOTOWICZ, 1989).

Além do solo, a interação rizóbio–RPCP –leguminosa, pode ter efeitos positivos na simbiose rizóbio-leguminosa. Esses efeitos positivos foram relatados pela coinoculação de *Rhizobium* com *Bacillus* ou *Paenibacillus* na nodulação e crescimento das plantas de feijoeiro-comum (CAMACHO et al., 2001; FIGUEIREDO et al., 2008; SRINIVASAN; PETERSEN; HOLL, 1997). O crescimento e a FBN nas plantas podem ser melhorados devido as RPCPs induzirem os rizóbios introduzidos a ocupar os nódulos de leguminosas (THILAK; RANGANAYAKI; MANOHARACHARI, 2006).

O estabelecimento efetivo de uma coinoculação envolve fatores que muitas vezes podem ser mais complexos do que a própria inoculação. Bullied, Buss e Vessey (2002), estudando a coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* com *Bacillus*, verificaram que *Bradyrhizobium* estimulou nodulação, crescimento e acúmulo de N em plantas de soja em um, dos dois locais estudados, sendo que o mesmo não ocorreu quando *Rhizobium* foi coinoculada com essa mesma estirpe nas plantas de feijoeiro-comum em qualquer dos locais testados. Efeitos sinérgicos ou antagônicos também aparece como respostas nessa interação, o que ocorreu com a CIAT 899<sup>T</sup> coinoculada com *Azospirillum brasilense* (BURDMAN; KIGEL; OKON, 1997).

Diante do exposto, nosso objetivo foi verificar os efeitos de promoção de crescimento por estirpes de *Burkholderia* e *Azospirillum* separadamente ou coinoculadas com a CIAT 899<sup>T</sup> (*Rhizobium tropici*) em feijoeiro-comum sob condições axênicas e em solo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Estirpes

Foram estudadas sete estirpes de bactérias (Tabela 1), sendo cinco estirpes de *Burkholderia*, pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal de Lavras (UFLA) mais a BR 11001<sup>T</sup> de *Azospirillum brasilense* (TARRAND; KRIEG; DÖBEREINER, 1978), e a CIAT 899<sup>T</sup> de *Rhizobium tropici* aprovada pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) como inoculante para a cultura do feijoeiro-comum (Tabela 1). Elas foram isoladas de nódulos de siratro, inoculadas com suspensão de amostra de solo sob diferentes sistemas de uso da terra (SUTs) na Amazônia Ocidental (LIMA, 2007).

Os critérios de seleção das cinco primeiras estirpes para este trabalho foram: (1) potencial para promover o crescimento vegetal *in vitro* principalmente pela produção da auxina (AIA), selecionando estirpes com baixa, média e alta produção do hormônio de acordo com os resultados encontrados por Oliveira (2009). (2) Não apresentar potencial nodulífero em feijoeiro-comum, o que pode ser comprovado pelos testes de eficiência simbiótica conduzido por Ferreira et al. (2012).

**Tabela 1** Origem e características promotoras de crescimento vegetal das estirpes bacterianas isoladas dos solos da Amazônia (AM) sob diferentes sistemas de uso da terra (SUT\*) e a CIAT 899<sup>T</sup> aprovada pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para a cultura do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e da estirpe de *Azospirillum brasilense* BR 11001<sup>T</sup>

Estirpes	Local de coleta/ SUT*	Espécie <sup>(1)</sup>	N° de acesso no GenBank (NCBI)	Características Promotoras de Crescimento <sup>(2)</sup>				
				Solubilização		Auxina - AIA** (µg ml <sup>-1</sup> )		Atividade da nitrogenase em vida livre
				Fosfato de Ca	Fosfato de Al	Triptofano		
-	+	-	+					
UFLA 04-226	AM/AF	<i>Burkholderia fungorum</i>	JF412050	+	+	0,00	2,2	+
UFLA 04-217	AM/FA	<i>Burkholderia fungorum</i>	-	+	+	0,00	28,74	+
UFLA 04-155	AM/FI	<i>Burkholderia fungorum</i>	GU144382	+	+	4,5	6,73	+
UFLA 04-232	AM/P	<i>Burkholderia fungorum</i>	JF412055	+	-	4,84	7,6	+
UFLA 04-234	AM/AG	<i>Burkholderia</i> sp.	JF412057	+	-	0,00	25,43	+
BR 11001 <sup>T</sup>	-	<i>Azospirillum brasilense</i>	-	NA	NA	12,35	37,79	+
CIAT 899 <sup>T</sup>	Colômbia	<i>Rhizobium tropici</i>	-	+	-	7,73	10,16	+

\*FA: Floresta secundária em estágio avançado de regeneração, AG: Agricultura, P: Pastagem, AF: Agrofloresta, FI: Floresta secundária em estágio inicial de regeneração. \*\* Produção do AIA na ausência (-) e presença (+) do triptofano. NA: Não avaliada

[Dados obtidos de <sup>(1)</sup>Ferreira et al. (2012) e <sup>(2)</sup>Oliveira (2009)]

## 2.2 Experimentos em casa de vegetação

### 2.2.1 Experimento em vasos Leonard

O primeiro experimento foi conduzido durante o período de junho a julho de 2010 em casa de vegetação do Laboratório de Microbiologia do Solo do departamento de Ciência do Solo (DCS) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG. Neste primeiro experimento, as plantas foram crescidas em vasos Leonard, com a parte superior do vaso contendo uma mistura 1:2 de areia (150 cm<sup>3</sup>) e vermiculita (300 cm<sup>3</sup>), e a inferior com solução nutritiva (HOAGLAND; ARNON, 1950) com baixa adição de nitrogênio (21,00 mg L<sup>-1</sup>), sendo esta diluída quatro vezes. Após o preparo dos vasos e da solução nutritiva, estes foram autoclavados por uma hora, a 121 °C.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 7, sendo o primeiro fator a inoculação com a CIAT 899<sup>T</sup> e sem a inoculação da CIAT 899<sup>T</sup> e o segundo fator a inoculação com as estirpes selecionadas como promotoras de crescimento (RPCP) UFLA 04-226, UFLA 04-217, UFLA 04-155, UFLA 04-232, UFLA 04-234 e BR11001<sup>T</sup>, com 3 repetições.

As estirpes bacterianas foram cultivadas em meio de cultura líquido 79 (FRED; WAKSMAN, 1928), pH 6,8, sob agitação de 150 rpm, sendo inoculados 10<sup>8</sup> UFC por semente. As sementes foram desinfestadas superficialmente com etanol 96% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 1% por 3 minutos, e em seguida lavadas seis vezes com água destilada esterilizada. Foi pré-geminada sobre algodão e papel de filtro umedecido com H<sub>2</sub>O destilada esterilizada, em placas de Petri, incubadas em estufa a 28 °C até a emissão da radícula.

Cada vaso recebeu 4 sementes de feijoeiro comum (BRS-MG Talismã) pré-geminadas e cada semente foi inoculada e/ou coinoculada, sendo que o

tratamento CIAT 899<sup>T</sup> sem a RPCP e os tratamentos sem a CIAT 899<sup>T</sup> e com as RPCP receberam também 1 ml de meio de cultura pura e os tratamentos sem a CIAT 899<sup>T</sup> e sem RPCP receberam 2 ml. Após a inoculação os vasos foram recobertos com uma fina camada de areia parafinada (10 kg de areia, 1 L de clorofórmio e 10 g de parafina) para evitar contaminação. O desbaste foi realizado ao sétimo dia após a emergência (DAE) das plantas, permanecendo duas plantas por vaso. A colheita foi realizada com 45 DAE.

## **2.2.2 Experimento em vasos com solo**

### **2.2.2.1 Determinação do número mais provável de rizóbios nativos, utilizando feijoeiro-comum**

Para estimar o número mais provável (NMP) de rizóbios no solo, utilizou-se tubetes de 375 ml contendo uma mistura de vermiculita e areia na proporção de 2:1. Sete diluições decimais seriadas em solução salina (8,5 g L<sup>-1</sup> de NaCl) de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup> e controles não inoculado. Os tratamentos inoculados receberam 1 mL da suspensão de solo das diluições seriadas obtidas. Solução nutritiva (HOAGLAND; ARNON, 1950) sem adição de N autoclavada foi aplicada periodicamente. Após 30 dias da inoculação, as plantas noduladas em cada diluição tiveram seus nódulos contados e o NMP foi calculado usando o programa “Most Propable Number Estimate” (MPNES) (WOOMER; BENNET; YOST, 1990).

### **2.2.2.2 Condução experimental**

O segundo experimento foi conduzido de Fevereiro a Abril de 2011, utilizando vasos plásticos com capacidade de 2 dm<sup>3</sup> de um Latossolo Vermelho

distróficos (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 1997), coletado no campus da UFLA. O solo foi coletado na camada arável (0 a 20 cm), seco ao ar, destorroado, homogeneizado e passado na peneira de 4 mm de abertura, apresentando as seguintes características químicas (Tabela 2).

**Tabela 2 Características químicas do solo coletado no campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA –Lavras-MG), para o crescimento do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.)**

pH <sub>H2O</sub>	P <sup>(1)</sup>	K	Ca	Mg	Al	H + Al	SB <sup>(2)</sup>	(t) <sup>(3)</sup>	T <sup>(4)</sup>
5,1	mg dm <sup>-3</sup>		cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>						
	1,0	14,0	0,2	0,0	0,9	7,0	0,24	1,14	7,24
V <sup>(5)</sup>	M <sup>(6)</sup>	MO <sup>(7)</sup>	P-rem <sup>(8)</sup>	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S
%		dag kg <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg dm <sup>-3</sup>					
3,32	12,4	3,1	5,95	1,5	95,4	31,0	1,2	0,3	15,4

<sup>(1)</sup>Método Mehlich-1. <sup>(2)</sup>Soma de bases trocáveis. <sup>(3)</sup>CTC efetiva. <sup>(4)</sup>CTC a pH 7,0. <sup>(5)</sup>Índice de saturação de bases. <sup>(6)</sup>Índice de saturação de alumínio. <sup>(7)</sup>Matéria Orgânica. <sup>(8)</sup>Fósforo remanescente

Para correção deste solo, foi realizada a calagem segundo o método de saturação por bases, de modo a elevar a saturação para 60%. Em todas as parcelas foi efetuada uma adubação básica com solução nutritiva contendo, 300, 300; 100; 40; 0,8; 1,5; 3,6; 5,0 e 0,15 mg dm<sup>-3</sup> de N, K, P, S, B, Cu, Mn, Zn e Mo respectivamente, sendo a adubação nitrogenada e potássica parcelada em três vezes. A adubação nitrogenada foi realizada somente para os tratamentos que receberam o fertilizante nitrogenado.

O preparo do inóculo e das sementes foram realizados seguindo as mesmas metodologias conforme citado no ensaio anterior (item 2.2.1). O delineamento estatístico aplicado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 3 envolvendo 3 fontes de N (CIAT 899<sup>T</sup>, Controle com N-mineral, e um Controle sem CIAT 899<sup>T</sup> e sem N-mineral) e 3 estirpes de RPCP (UFLA 04-

155, UFLA 04-226 e BR 11001<sup>T</sup>) selecionadas do primeiro experimento (vaso Leonard), com 3 repetições. O desbaste foi realizado ao sétimo dia após a emergência (DAE) das plantas, permanecendo duas por vaso.

Durante o florescimento das plantas (45 DAE) foram realizadas as leituras do SPAD (*Soil Plant Analysis Development*) - clorofilômetro Minolta SPAD-502 (MINOLTA, 1989) em cinco folhas entre o terço médio e superior das plantas. Essas folhas foram imediatamente coletadas, lavadas, secadas em estufa a 70 °C até massa constante, moídas e tiveram seus teores de N e S determinados, conforme método descrito em Malavolta, Vitti e Oliveira (1997).

### **2.2.3 Parâmetros analisados**

Os parâmetros analisados para ambos os experimentos foram: número de nódulos (NN), matéria seca dos nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA) e raízes (MSR), conteúdo de Nitrogênio (N), Fósforo (P), Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg), Enxofre (S), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Manganês (Mn) e Zinco (Zn), na parte aérea das plantas de feijoeiro-comum (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

### **2.2.4 Análise estatística**

Todos os dados foram submetidos à análise de variância, empregando-se o sistema de análise estatística SISVAR, versão 5.3 (FERREIRA, 2008). As médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Os valores das variáveis números de nódulos e matéria seca de nódulos foram previamente transformados pela fórmula  $(X+0,5)^{0,5}$ .

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Efeito da coinoculação da CIAT 899<sup>T</sup> com as potenciais estirpes para promoção do crescimento do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L) em vasos Leonard

Em condições axênicas a coinoculação da CIAT 899<sup>T</sup> (*Rhizobium tropici*) com as estirpes UFLA 04-217, UFLA 04-155 e UFLA 04-232 (*Burkholderia fungorum*) e a BR 11001<sup>T</sup> (*Azospirillum brasilense*) não altera o número de nódulos, em relação a planta inoculada somente com a CIAT 899<sup>T</sup> (Figura 1). No entanto, quando coinoculada com as estirpes UFLA 04-226 (*Burkholderia fungorum*) e UFLA 04-234 (*Burkholderia* sp.), apresentaram efeitos deletérios na nodulação das plantas (Figura 1).

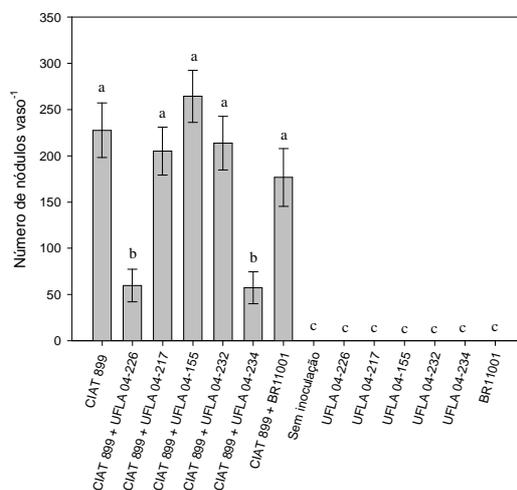


Figura 1 Efeito da coinoculação com *Rhizobium tropici* CIAT899<sup>T</sup> e diferentes Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs), bem como, inoculação com a CIAT899<sup>T</sup> e RPCPs separadamente, no número de nódulos em duas plantas do feijoeiro-comum no florescimento em vasos Leonard. Barras de erro:  $\pm$  Erro padrão da média

A coinoculação da CIAT 899<sup>T</sup> com a UFLA 04-155 (*B. fungorum*) e BR 11001<sup>T</sup> (*A. brasilense*) aumentaram a matéria seca dos nódulos em relação a planta inoculada somente com CIAT 899<sup>T</sup> (Figura 2), enquanto que, com a UFLA 04-217 teve matéria seca dos nódulos semelhante à CIAT 899<sup>T</sup>, e as estirpes UFLA 04-226, UFLA 04-232 e UFLA 04-234 foram deletérias para a matéria seca dos nódulos (Figura 2).

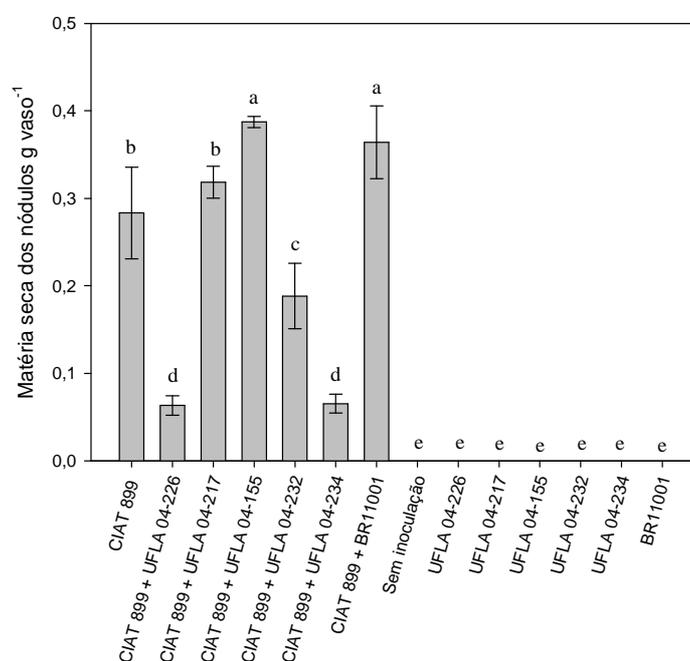


Figura 2 Efeito da coinoculação com *Rhizobium tropici* CIAT899<sup>T</sup> e diferentes Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs), bem como, inoculação com a CIAT899<sup>T</sup> e RPCPs separadamente, na matéria seca dos nódulos de duas plantas de feijoeiro-comum no florescimento em vasos Leonard. Barras de erro:  $\pm$  Erro padrão da média

A matéria seca da parte aérea da planta do feijoeiro-comum aumentou com a coinoculação da CIAT 899<sup>T</sup> e UFLA 04-155 (Figura 3). Entretanto, a coinoculação da CIAT 899<sup>T</sup> com a BR 11001<sup>T</sup> manteve a matéria seca da parte

aérea semelhante a planta inoculada somente com CIAT899<sup>T</sup>, sendo a coinoculação com as demais estirpes deletérias a matéria seca da parte aérea (Figura 3).

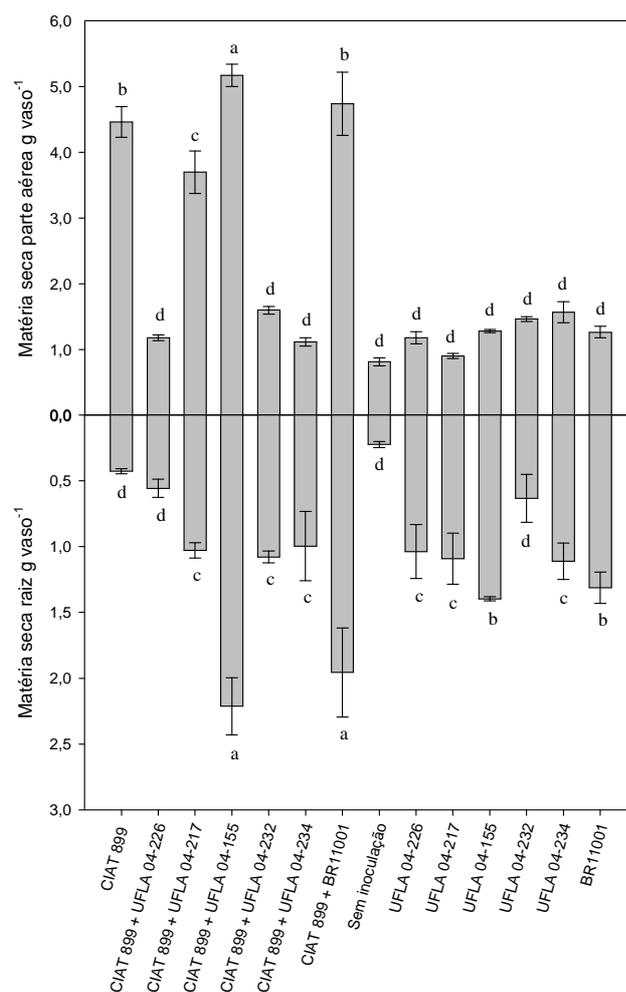


Figura 3 Efeito da coinoculação com *Rhizobium tropici* CIAT899<sup>T</sup> e RPCPs, bem como, inoculação com a CIAT899<sup>T</sup> e RPCPs separadamente, na matéria seca da parte aérea e raiz de duas plantas de feijoeiro-comum no florescimento em vasos Leonard. Barras de erro:  $\pm$  Erro padrão da média

Todas as estirpes quando coinoculadas ou não, com a CIAT 899<sup>T</sup> promoveram aumento significativo na matéria seca das raízes em relação a planta inoculada somente com a CIAT 899<sup>T</sup>, exceto a coinoculação da CIAT 899<sup>T</sup> com a UFLA 04-226 e UFLA 04-232 isoladamente (Figura 3). Destacando a coinoculação da CIAT 899<sup>T</sup> com UFLA 04-155 e BR 11001<sup>T</sup> (Figura 3).

A coinoculação da CIAT 899<sup>T</sup> com a UFLA 04-155 proporcionou aumento no conteúdo de fósforo (P), Magnésio (Mg), Cobre (Cu) e Ferro (Fe) (Tabela 3). O conteúdo de potássio (K), cálcio (Ca), enxofre (S) e zinco (Zn), permaneceram semelhante à planta inoculada somente com a CIAT 899<sup>T</sup>, e o conteúdo de nitrogênio (N) e o Manganês (Mn) inferiores (Tabela 3). Já com a BR 11001<sup>T</sup>, aumento significativo no conteúdo de P e Fe, em relação a planta inoculada somente com a CIAT 899<sup>T</sup> foi observado. O conteúdo de N, Ca, Mg, S, Cu, e Zn foram semelhante a planta inoculada com a CIAT 899<sup>T</sup>, e o K e Mn inferiores.

Entretanto, a coinoculação da CIAT 899<sup>T</sup> com a UFLA 04-217 aumentou o conteúdo de Fe em relação a planta inoculada somente com CIAT 899<sup>T</sup>, sendo os outros conteúdos inferiores.

O conteúdo de nutriente da coinoculação da CIAT 899<sup>T</sup> com as estirpes UFLA 04-226, UFLA 04-232 e UFLA 04-234 foram bem inferiores ao conteúdo de nutriente da planta inoculada somente com a CIAT 899<sup>T</sup> (Tabela 3). Essas três estirpes, coinoculada com CIAT 899<sup>T</sup>, tiveram o conteúdo de nutrientes semelhante as plantas que receberam a inoculação das estirpes de rizobactérias isoladamente e também com a planta que não recebeu nenhum tipo de inoculação (Sem CIAT 899<sup>T</sup> e Sem RPCPs), exceto UFLA 04-232 para o S (Tabela 3).

Tabela 3 Efeito da coinoculação com *Rhizobium tropici* CIAT 899<sup>T</sup> e diferentes Rizobactérias Promotoras de Crescimento de plantas (RPCPs) bem como a inoculação com a CIAT 899<sup>T</sup> e RPCPs separadamente no conteúdo de nutrientes da parte aérea de feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em vaso Leonard

Tratamentos	N <sub>(cont.)</sub>	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn	Zn
	(mg vaso <sup>-1</sup> )						(µg vaso <sup>-1</sup> )			
CIAT 899	117,6 a	10,6 c	83,2 a	60,5 a	24,4 b	33,5 a	38,7 b	518,8 b	520,2 a	85,8 a
CIAT 899 + UFLA 04-226	21,8 c	3,4 d	18,0 d	14,6 c	5,6 d	7,9 d	8,9 d	216,7 c	114,1 d	16,4 c
CIAT 899 + UFLA 04-217	63,6 b	9,3 c	60,1 c	44,7 b	14,9 c	19,2 b	23,47 c	891,7 a	357,6 b	55,17 b
CIAT 899 + UFLA 04-155	71,7 b	19,7 a	90,9 a	61,8 a	27,9 a	32,3 a	47,23 a	838,5 a	383,4 b	93,0 a
CIAT 899 + UFLA 04-232	30,3 c	3,7 d	18,6 d	20,6 c	6,8 d	10,2 c	11,3 d	159,9 c	177,2 c	23,1 c
CIAT 899 + UFLA 04-234	17,7 c	3,2 d	14,5 d	13,1 c	5,3 d	6,7 d	7,0 d	126,4 c	126,0 d	19,1 c
CIAT 899 + BR 11001	118,0 a	12,7 b	75,1 b	60,5 a	20,9 b	28,2 a	34,8 b	795,8 a	356,4 b	84,7 a
Sem inoculação	9,4 c	2,9 d	11,8 d	12,3 c	5,8 d	6,3 d	6,7 d	138,0 c	60,5	20,8 c
UFLA 04-226	14,5 c	4,4 d	18,3 d	19,1 c	7,3 d	8,0 d	10,2 d	160,0 c	126,6 d	23,0 c
UFLA 04-217	11,5 c	3,5 d	12,0 d	12,0c	4,6 d	5,5 d	6,9 d	140,5 c	99,3 d	17,2 c
UFLA 04-155	16,3 c	3,86 d	15,63 d	13,5 c	5,9 d	6,1 d	10,6 d	153,9 c	65,6 d	22,0 c
UFLA 04-232	22,64 c	5,59 d	22,93 d	20,82 c	6,7 d	8,8 d	11,6 d	190,9 c	201,1 d	30,8 c
UFLA 04-234	16,12 c	5,20 d	24,29 d	20,84 c	6,7 d	9,4 d	14,1 d	207,3 c	87,9 d	28,4 c
BR11001	13,45 c	4,67 d	18,95 d	16,71 c	6,9 d	9,2 d	18,8 c	179,9 c	82,9 d	25,7 c
% CV	18,1	19,1	17,1	17,4	18,4	20,1	14,6	22,1	18,9	15,9

Em cada coluna, valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott-Knott com 5% de probabilidade

De acordo com esses resultados as estirpes UFLA 04-155 e UFLA 04-226 de *Burkholderia fungorum* foram selecionadas para o experimento em vaso com solo, a primeira pelo seu potencial de promover o crescimento em feijoeiro-comum em condições axênicas, e a segunda por apresentar efeitos deletérios em todos os parâmetros analisados quando coinoculada com a CIAT 899<sup>T</sup>. E a BR 11001<sup>T</sup> de *Azospirillum brasilense* que geralmente é utilizado como um modelo padrão de rizobactéria.

### **3.2 Efeito da coinoculação da CIAT 899<sup>T</sup> com as potenciais estirpes para promoção do crescimento do feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L) em vasos com solo**

Neste segundo experimento a população nativa de rizóbios no solo encontra-se em torno de  $2 \times 10^3$  a  $4,3 \times 10^4$  g<sup>-1</sup> de solo.

A coinoculação da CIAT 899<sup>T</sup> (*Rhizobium tropici*) com as três estirpes UFLA 04- 155, UFLA 04-226 e BR 11001<sup>T</sup> não tiveram efeito no número de nódulos, em relação a planta que foi inoculada somente com a CIAT 899<sup>T</sup> (Figura 4). No entanto, quando inoculadas separadamente, as estirpes UFLA 04-155 e BR 11001<sup>T</sup> aumentaram o número de nódulos das plantas no solo, e a UFLA 04-226 permaneceu com o número de nódulos semelhante à planta que não recebeu nenhuma forma de nitrogênio (S/N) (Figura 4).

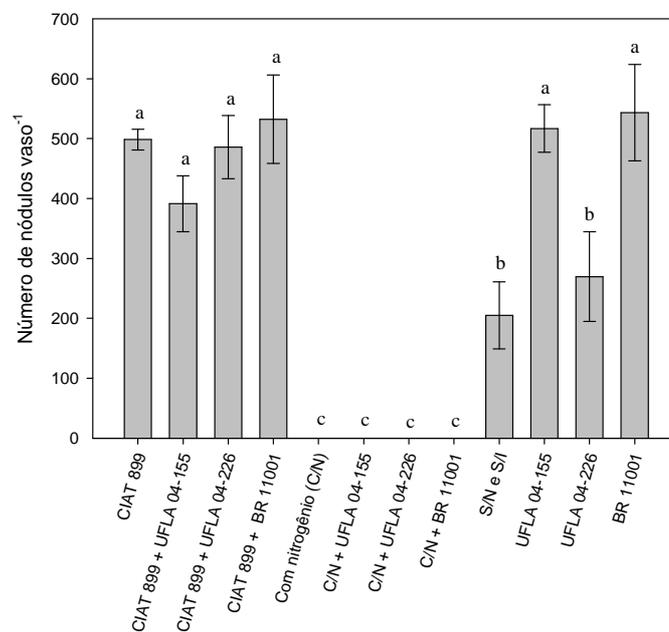


Figura 4 Efeito da coinoculação com *Rhizobium tropici* CIAT899<sup>T</sup> e diferentes rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs), bem como, inoculação com a CIAT899<sup>T</sup> e RPCPs separadamente no número de nódulos em duas plantas do feijoeiro-comum no florescimento em vasos com solo. Barras de erro:  $\pm$  Erro padrão da média. S/N e S/I: sem nitrogênio e sem inoculação

Não se verificou qualquer efeito em relação à matéria seca dos nódulos das plantas coinoculadas com as três estirpes, tampouco em relação à planta inoculada somente com CIAT 899<sup>T</sup> (Figura 5). Já as plantas inoculadas separadamente, com as estirpes UFLA 04-155 e BR 11001<sup>T</sup> tiveram um aumento de matéria seca dos nódulos em relação à planta que não recebeu nenhuma forma de nitrogênio (S/N e S/I) (Figura 5).

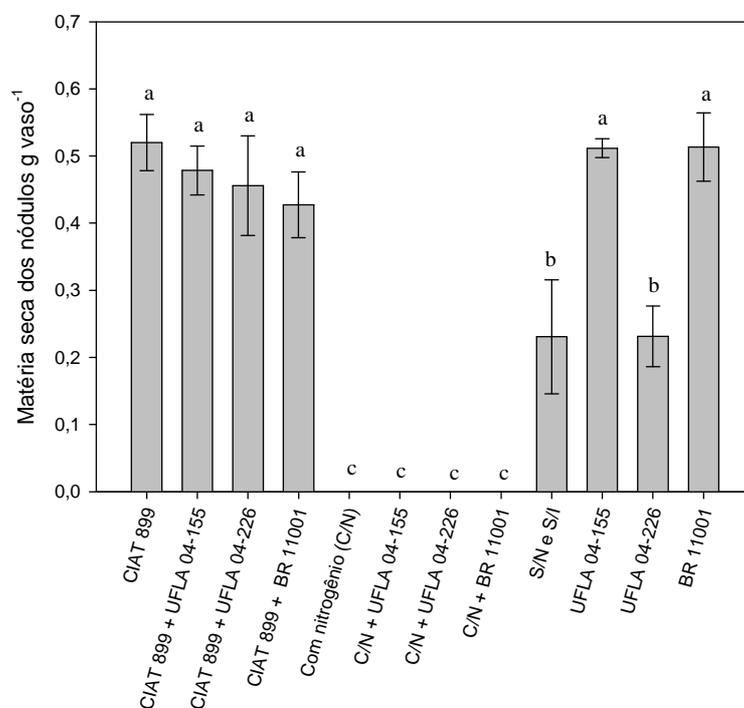


Figura 5 Efeito da coinoculação com *Rhizobium tropici* CIAT899<sup>T</sup> e diferentes rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs), bem como, inoculação com a CIAT899<sup>T</sup> e RPCPs separadamente na matéria seca dos nódulos em duas plantas de feijoeiro-comum no florescimento em vasos com solo. Barras de erro: ± Erro padrão da média. S/N e S/I: sem nitrogênio e sem inoculação

A inoculação da UFLA 04-226 no solo adubado com o nitrogênio mineral (C/N + UFLA 04-226) proporcionou aumento na produção de matéria seca da parte aérea, em relação à planta que recebeu somente o nitrogênio mineral (C/N) (Figura 6). Enquanto, UFLA 04-155 (C/N + UFLA 04-155) manteve a matéria seca da parte aérea do feijoeiro-comum igual ao do solo que recebeu somente o nitrogênio mineral (C/N), a BR 11001<sup>T</sup> (C/N + BR 11001<sup>T</sup>) apresentou efeitos deletérios com a presença do nitrogênio mineral (Figura 6).

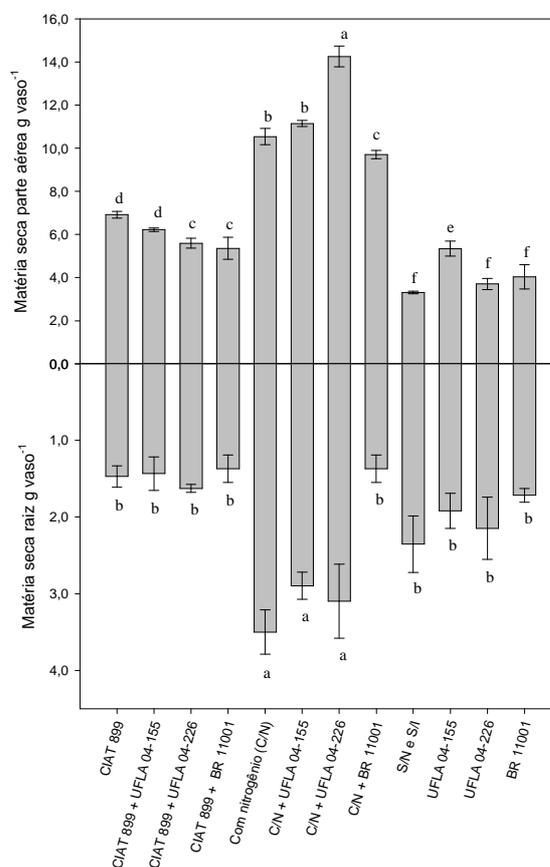


Figura 6 Efeito da coinoculação com *Rhizobium tropici* CIAT899<sup>T</sup> e RPCPs, bem como, inoculação com a CIAT899<sup>T</sup> e RPCPs separadamente na matéria seca da parte aérea e raiz em duas plantas de feijoeiro-comum no florescimento em vasos com solo. Barras de erro:  $\pm$  Erro padrão da média. S/N e S/I: sem nitrogênio e sem inoculação

A coinoculação da CIAT 899<sup>T</sup> com a UFLA 04-155 no solo, não teve efeito sobre a produção de matéria seca da parte aérea do feijoeiro-comum em relação a planta que recebeu somente a CIAT 899<sup>T</sup> (Figura 6). Enquanto a coinoculação com a UFLA 04-226 e BR 11001<sup>T</sup> efeitos deletérios foram apresentados (Figura 6). A matéria seca da parte aérea da UFLA 04-155 inoculada separadamente permaneceu igual à coinoculação das duas estirpes

(CIAT 899<sup>T</sup> + UFLA 04-226) e (CIAT 899<sup>T</sup> + BR 11001<sup>T</sup>) que foram deletérias em relação a planta inoculada somente com a CIAT 899<sup>T</sup> e foi maior do que essas duas, quando inoculadas separadamente e também da planta que não recebeu o nitrogênio mineral e nem inoculação (S/N e S/I) (Figura 6).

A coinoculação da CIAT 899<sup>T</sup> com as RPCPs e as RPCPs inoculadas separadamente, não interferiram na produção de matéria seca das raízes em relação a planta inoculada somente com a CIAT 899<sup>T</sup> e ao controle que não recebeu nenhuma forma de N (S/N e S/I) (Figura 6). E quando inoculadas com o nitrogênio mineral, não se verificou qualquer efeito sobre a matéria seca da raiz em relação à raiz da planta que recebeu somente o nitrogênio mineral, exceto quando inoculada com a BR 11001 que efeito deletério foi observado (Figura 6).

A inoculação da UFLA 04-155 no solo adubado com o nitrogênio mineral (C/N + UFLA 04-155) apresentou aumento do conteúdo de N, K e S (Tabela 4). Enquanto que a inoculação da UFLA 04-226 (C/N + UFLA 04-226) proporcionou aumento significativo no conteúdo de todos os nutrientes (Tabela 4). Já a BR 11001<sup>T</sup> (C/N + BR 11001<sup>T</sup>) aumentou o conteúdo de K, S e Mn nas plantas de feijão, em relação à do solo que recebeu somente o nitrogênio mineral (Tabela 4).

A coinoculação da CIAT 899<sup>T</sup> com as estirpes tiveram efeitos deletérios ao conteúdo de N e Fe, em relação a planta inoculada somente com a CIAT 899<sup>T</sup> (Tabela 4). No entanto, permaneceram semelhantes para todos os outros nutrientes, exceto quando coinoculada com a UFLA 04-155 que teve aumento no conteúdo de S (Tabela 4).

Tabela 4 Efeito da coinoculação com *Rhizobium tropici* CIAT 899<sup>T</sup> e diferentes Rizobactérias Promotoras de Crescimento de plantas (RPCPs) bem como a inoculação com a CIAT 899<sup>T</sup> e RPCPs separadamente no conteúdo de nutrientes da parte aérea das plantas de feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em vaso com solo

Tratamentos	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn	Zn
	(mg vaso <sup>-1</sup> )						(µg vaso <sup>-1</sup> )			
Com nitrogênio (C/N)	248,7 b	23,6 b	98,9 c	180,4 b	35,3 b	91,5 b	51,4 b	779 b	318,3 c	226,5 b
C/N + UFLA 04-155	350,1 a	23,0 b	126,2 b	197,2 b	35,8 b	114,9 a	60,5 b	662,6 c	357,7 c	251,3 b
C/N + UFLA 04-226	349,4 a	53,3 a	174,3 a	231,6 a	44,9 a	119,0 a	72,7 a	1058 a	535,8 a	299,3 a
C/N + BR 11001	207,9 c	27,3 b	116,7 b	200,4 b	37,5 b	113,2 a	54,6 b	651,9 c	411,4 b	235,5 b
CIAT 899 <sup>T</sup>	161,1 d	12,9 c	67,7 d	90,6 c	18,2 c	77,7 b	30,7 c	555,8 c	174,5 d	108,8 c
CIAT 899 <sup>T</sup> + UFLA 04-155	121,7 e	14,7 c	57,7 d	95,9 c	18,9 c	114,9 a	31,8 c	451,6 d	171,5 d	100,7 c
CIAT 899 <sup>T</sup> + UFLA 04-226	133,4 e	13,3 c	57,6 d	92,9 c	16,5 c	85,6 b	28,5 c	366,7 d	161,7 d	108,4 c
CIAT 899 <sup>T</sup> + BR 11001	98,9 e	15,1 c	52,1 d	90,2 c	16,9 c	73,8 b	27,7 c	381,5 d	162,2 d	97,2 c
S/N e S/I	12,0 f	6,5 d	30,2 e	36,6 d	7,2 d	87,8 b	13,1 d	101,5 f	81,9 d	52,6 d
UFLA 04-155	34,5 f	15,7 c	60,9 d	87,7 c	16,4 c	124,8 a	33,6 c	378,4 d	163,3 d	106,6 c
UFLA 04-226	28,8 f	13,0 c	41,3 e	71,9 c	13,5 c	117,1 a	26,1 c	230,2 e	149,9 d	101,8 c
BR11001	19,3 f	13,2 c	44,2 e	73,0 c	13,8 c	86,3 b	31,8 c	395,9 d	167,7 d	92,7 c
% CV	12,5	14,8	10,0	12,5	12,2	13,4	13,3	13,4	16,6	12,1

Em cada coluna, valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott-Knott com 5% de probabilidade. S/N e S/I: sem nitrogênio e sem inoculação

As leituras do SPAD apresentaram uma correlação significativa para os teores de N e S obtido das folhas do feijoeiro-comum pela análise química. Essa correlação foi positiva para o teor de N e negativa para o S (Figura 7).

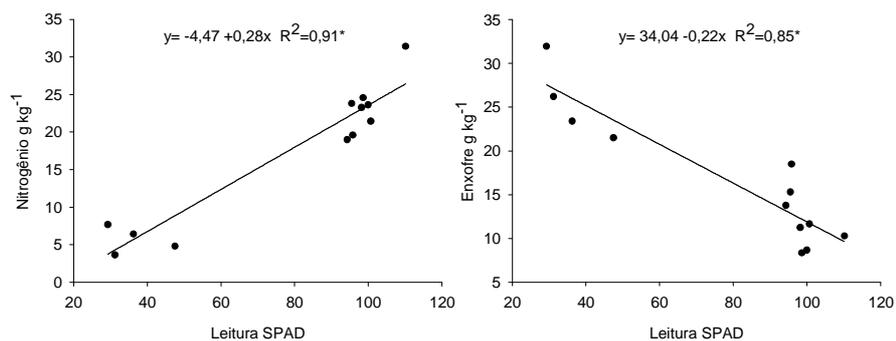


Figura 7 Correlação de Pearson entre as leituras SPAD e os teores de nitrogênio e enxofre nas folhas do feijoeiro. \*Significativo com 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t (n=12)

#### 4 DISCUSSÃO

Neste estudo, usamos a BR 11001<sup>T</sup> de *A. brasilense* como estirpe referência para a promoção de crescimento, pois trata-se de uma bactéria capaz de aumentar a produção de várias culturas importante, cultivadas em vários tipos de solos e condições climáticas, segundo a avaliação de dados mundiais acumulados nos últimos 20 anos de experimentos de campo (OKON; LABANDERA-GONZALES, 1994) os quais se mantiveram até os anos atuais. Entretanto, a redução na produção da matéria seca da parte aérea do feijoeiro-comum com a coinoculação da CIAT 899<sup>T</sup> com *A. brasilense* também foi observada pela estirpe Cd (ATCC29729), quando coinoculada 10<sup>8</sup> UFC, corroborando com os nossos resultados, já quando a coinoculação foi de 5x10<sup>6</sup> UFC a matéria seca da parte aérea do feijoeiro-comum foi maior que a CIAT 899<sup>T</sup> separadamente (BURDMAN; KIGEL; OKON, 1997). A partir de nossos resultados foi possível observar que a coinoculação da CIAT 899<sup>T</sup> com *A. brasilense* (BR 11001<sup>T</sup>) promoveu aumentos na matéria seca de nódulos e raiz, além de conteúdo de P e Fe em condições axênicas. Já no solo em vasos, não se verificou qualquer benéfico dessa coinoculação em relação à planta inoculada somente com a CIAT 899<sup>T</sup>.

Esse é o primeiro relato da coinoculação de *R. tropici* (CIAT 899<sup>T</sup>) com estirpes de *B. fungorum*. Relatos da coinoculação da CIAT 899<sup>T</sup> com outras RPCPs em feijoeiro-comum, destacam efeitos positivos para a coinoculação com *Paenibacillus polymyxa* (estirpe Loutit) sobre a nodulação específica e conteúdo de nitrogênio em vasos com solo autoclavado, ainda que o último não diferiu da inoculação somente com a CIAT 899<sup>T</sup> (FIGUEIREDO et al., 2008) e com *Bacillus* sp. (CECT 450) em número e matéria seca de nódulos em condições axênicas e no campo (CAMACHO et al., 2001). Sendo que em ambos os trabalhos a matéria seca da parte aérea para essas coinoculações não diferiram

daquelas inoculadas com a CIAT 899<sup>T</sup> separadamente. Em condições axênicas a coinoculação da CIAT 899<sup>T</sup> com *B. fungorum* (UFLA 04-155) aumentou a matéria seca dos nódulos da parte aérea e raiz, além do conteúdo de P, Mg, Cu, e Fe das plantas de feijoeiro-comum em relação a CIAT 899<sup>T</sup> separadamente, quando co-inoculado no solo efeitos benéficos não foram observados.

Os resultados indicam que a nodulação do feijoeiro-comum pela população nativa de rizóbios ( $2 \times 10^3$  até  $4,3 \times 10^4$ ) foi estimulada de forma significativa por *B. fungorum* e *A. brasilense*, estirpes UFLA 04-155 e BR 11001, respectivamente.

O aumento da matéria seca da parte aérea proporcionado pela UFLA 04-155 em feijoeiro-comum, também foi observado por Ferreira et al. (2012) quando comparada com a matéria seca da parte aérea da planta que recebeu nitrogênio mineral, corroborando assim com os nossos resultados. O processo de promoção de crescimento já descrito para esta estirpe é a produção de ácido indolacético (AIA) que varia em torno de 4,5 a 6,73  $\mu\text{g ml}^{-1}$  em meio de cultura sem a adição do triptofano e com adição do aminoácido, respectivamente, e o alto potencial para a solubilização de fosfato de cálcio (OLIVEIRA, 2009). No presente trabalho, também verificamos que essa estirpe melhora a absorção dos nutrientes pelas plantas.

Dentre os gêneros *Burkholderia*, até o momento, a mais conhecida como promotora de crescimento é a *B. cepacia*. A Estirpe SAOCV2 dessa espécie, quando inoculada em plantas de feijoeiro-comum proporcionou aumentos significativos na matéria seca da parte aérea e conteúdos de P, N, K, Ca e Mg quando comparada à planta não inoculada (PEIX et al., 2001). No entanto, essa espécie é patogênica, sem nenhuma perspectiva para uso na agricultura. Outras estirpes de *B. cepacia* (LIN et al., 2006; SONG et al., 2008) e também estirpe de *B. vietnamiensis* (PARK et al., 2010) são relatadas com potencial para uso RPCP. Portanto, nossos resultados mostram o potencial de *B. fungorum* para a

coinoculação com a CIAT 899<sup>T</sup>, precisando assim, de mais estudos com diversidade de solos para verificar o mais adequado que contribui nessa interação para estimular as atividades promotoras da estirpe.

Para algumas culturas, a concentração de clorofila (a cor verde das folhas) correlaciona-se positivamente com a concentração foliar de N, pelo fato de que 70% do N contido nas folhas serem encontrados nos cloroplastos, participando da síntese e da estrutura das moléculas de clorofila (MARENCO; LOPES, 2005). Para a cultura do feijoeiro-comum essa correlação também foi observada com a produtividade (BARBOSA FILHO et al., 2008; BISCARO et al., 2009; CARVALHO et al., 2003; SILVEIRA; BRAZ; DIDONET, 2000).

Além do N, outros elementos como o S, Fe e Mn provocam clorose nas folhas, em caso de deficiência, o que evidencia sua importância na síntese da clorofila (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997). O comportamento da correlação negativa para o S em nosso trabalho mostra que em concentrações maiores de S nas folhas, as concentrações de N apresentam tendências a serem reduzido, o que, provavelmente, decorre da competição entre os dois elementos, durante a absorção ou translocação. O que também já foi evidenciado para plantas de algodão (NEVES et al., 2005).

As condições experimentais (limitação de N, ausência da interação com outros micro-organismos e de substâncias estimuladoras) do primeiro experimento não contribuíram para a manifestação de nenhum efeito benéfico das RPCPs sobre a matéria seca da parte aérea e conteúdo de nutrientes nas plantas quando inoculadas separadamente. Isso provavelmente ocorreu porque essa condição experimental (condições axênicas) não foi adequada para a expressão de genes essenciais que poderia melhorar o desenvolvimento da cultura, (como por exemplo, o da fixação biológica do nitrogênio, da produção de substâncias reguladoras de crescimento) comprometendo assim, a entrada dos nutrientes para a planta. Isto é bem evidenciado, uma vez que no solo, além de

obtermos respostas significativas da matéria seca da parte aérea e conteúdo de nutrientes em relação ao solo sem inoculação e sem o fertilizante nitrogenado, também observamos, mesmo que sem diferença estatística, aumento de quase três vezes no conteúdo de N nas plantas. A magnitude da FBN pela RPCPs na rizosfera pode ser considerada irrelevante em termos agrícola, mas em condições naturais esses valores se tornam relevante (VESSEY, 2003).

Assim, pode-se sugerir que em trabalho futuro outros testes, como produção de quitinase, citocininas, giberelina, entre outros metabólicos, podem ser realizados com essa estirpe a fim de encontrar outras características promotoras nessa bactéria, bem como testar a UFLA 04-155 em outras culturas coinoculadas ou não, uma vez que ela apresentou potencial para o crescimento no feijoeiro-comum.

## 5 CONCLUSÕES

As estirpes de *Burkholderia fungorum* são influenciadas diretamente pelas duas condições experimentais, axênicas e solo.

UFLA 04-155 apresenta potencial para o crescimento do feijoeiro-comum quando coinoculada com a CIAT 899<sup>T</sup> em condições axênicas ou quando inoculada separadamente no solo.

UFLA 04-226 apresenta potencial para o crescimento do feijoeiro-comum quando associado à adubação nitrogenada.

A população nativa de rizóbios é estimulada por *B. fungorum* UFLA 04-155 e *A. brasilense* BR 11001<sup>T</sup>.

## REFERÊNCIAS

- BARBOSA FILHO, M. P. et al. Determinação da necessidade de adubação nitrogenada de cobertura no feijoeiro irrigado com auxílio do clorofilômetro portátil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 1843-1848, out. 2008.
- BARSHAN, Y.; HOLGUIM, G. Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances: 1999-1996. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 1, p. 103-121, Jan. 1997.
- BISCARO, G. A. et al. Molibdênio via semente e nitrogênio em cobertura no feijoeiro irrigado em solo de cerrado. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 5, p. 1280-1287, set./out. 2009.
- BULLIED, W. J.; BUSS, T. J.; VESSEY, J. K. *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, nodulation, and N accumulation in grain legumes: field studies. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 82, n. 2, p. 291-298, Apr. 2002.
- BURDMAN, S.; KIGEL, J.; OKON, Y. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 29, n. 5/6, p. 923-929, Dec. 1997.
- CAMACHO, M. et al. Co-inoculation with *Bacillus* sp. CECT 450 improves nodulation in *Phaseolus vulgaris* L. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, n. 11, p. 1058-1061, Nov. 2001.
- CARVALHO, M. A. C. et al. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio e teores foliares deste nutriente e de clorofila em feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 27, n. 3, p. 445-450, maio/jun. 2003.
- CHABOT, R. et al. Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphatesolubilizing

*Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Soil Biology and Biochemistry**, Washington, v. 30, n. 12, p. 1615-1618, Dec. 1998.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro, 1997. 212 p.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 36-41, 2008.

FERREIRA, P. A. A. et al. Efficient nitrogen-fixing *Rhizobium* strains isolated from amazonian soils are highly tolerant to acidity and aluminium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, 2012. In press.

FIGUEIREDO, M. V. B. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 7, p. 1187-1193, July 2008.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology**. New York: McGraw-Hill, 1928. 143 p.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: University of California, 1950. 39 p.

KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 39-44, 1989.

LEE, K. D. et al. Isolation of plant-growth-promoting endophytic bacteria from bean nodules. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, Jordan, v. 1, n. 3, p. 232-236, 2005.

LIMA, A. S. **Diversidade e eficiência de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> que nodulam siratro de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia ocidental**. 2007. 167 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

LIN, T. F. et al. The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 7, p. 957-960, May 2006.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319 p.

MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2005. 439 p.

MINOLTA, C. **Manual for chlorophyll meter SPAD-502**. Osaka: Minolta Radiometric Instruments Divisions, 1989. 22 p.

NEVES, O. et al. Uso do SPAD-502 na avaliação dos teores foliares de clorofila, nitrogênio, enxofre, ferro e manganês do algodoeiro herbáceo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 5, p. 517-521, maio 2005.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALES, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation association. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 26, n. 12, p. 1591-1601, Dec. 1994.

OLIVERA, S. et al. Improvement of common bean growth by co-inoculation with Rhizobium and plant growth-promoting bacteria. **Romanian Biotechnological Letters**, Bucharest, v. 16, n. 1, p. 5919-5926, Jan./Feb. 2011.

OLIVEIRA, S. M. de. **Processos promotores de crescimento vegetal por bactérias diazotróficas de vida livre ou simbióticas de feijão comum, caupi e siratro**. 2009. 66 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

PARK, K. H. et al. Rapid solubilization of insoluble phosphate by a novel environmental stress-tolerant *Burkholderia vietnamiensis* M6 isolated from ginseng rhizospheric soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 86, n. 4, p. 947-955, Oct. 2010.

PEIX, A. et al. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 33, n. 14, p. 1927-1935, Nov. 2001.

SILVEIRA, P. M.; BRAZ, A. J. B. P.; DIDONET, A. D. Uso do clorofilômetro como indicador da necessidade de adubação nitrogenada em cobertura no feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1083-1087, set. 2003.

SONG, O. R. et al. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 151-156, Feb. 2008.

SRINIVASAN, M.; PETERSEN, D. J.; HOLL, F. B. Influence of indoleacetic-acid-producing *Bacillus* isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* under gnotobiotic conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, p. 1006-1014, 1997.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 24, p. 967-980, 1978.

THILAK, K. V. B. R.; RANGANAYAKI, N.; MANOHARACHARI, C. Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*). **European Journal of Soil Science**, v. 57, n. 1, p. 67-71, Jan. 2006.

VESSEY, K. J. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, The Hague, v. 255, n. 2, p. 571-586, Aug. 2003.

WOOMER, P.; BENNET, J.; YOST, R. Overcoming the inflexibility of most-probable-number procedures. **Agronomy Journal**, Madison, v. 82, n. 2, p. 349-353, July 1990.

**CAPÍTULO 3 Promoção de crescimento de feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e milho (*Zea mays*) por estirpes de *Burkholderia* solubilizadora de fosfato**

## RESUMO

A eficiência de estirpes selecionadas de *Burkholderia* spp. para aumentar o crescimento e o conteúdo de fósforo (P) nas plantas de feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e de milho (*Zea mays*) foi avaliadas quanto à capacidade de solubilização de fosfato inorgânico insolúveis em casa de vegetação, em condições axênicas e no solo. Os resultados obtidos demonstraram que as estirpes UFLA 04-155 e UFLA 04-21 inoculadas com fosfato de cálcio insolúvel (P-Ca) foram capazes de aumentar o conteúdo da matéria seca da parte aérea do feijoeiro-comum em relação à planta que recebeu somente o P-Ca, em condições axênicas. Porém, o aumento não foi identificado pelo mecanismo de solubilização e pode ter ocorrido por meio de outros mecanismos. No entanto, as estirpes testadas aumentaram a matéria seca da parte aérea e o conteúdo de P, além de outros macros e micronutrientes no milho, quando cultivado em solo com fosfato natural de Araxá após 45 dias emergência. A estirpe UFLA 04-21 aumentou 109% da matéria seca da parte aérea e 124,24% do conteúdo de P na parte aérea do milho. O mecanismo de solubilização de fosfato utilizado por estas estirpes foi provavelmente o ácido 2-cetoglucônico identificado nas concentrações de 103,19 - 81,16 e 84,88 mmol L<sup>-1</sup> para UFLA 04-155, UFLA 04-21 e UFLA 04-233 respectivamente. Esta última produziu ainda 0,155 mmol L<sup>-1</sup> de ácido oxálico. Estes resultados indicam que *Burkholderia* sp. UFLA 04-21 pode ser uma candidata em potencial para o desenvolvimento de biofertilizante aplicável à cultura do milho.

Palavras-chave: Solubilização de Fosfato Insolúvel. Feijoeiro-comum. Milho. *Burkholderia fungorum*. *Burkholderia* sp.

## ABSTRACT

The efficiency of selected strains of *Burkholderia* spp. to increase the growth and phosphorus (P) content in the bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn plants (*Zea mays*) was evaluated as to the capacity of solubilizing insoluble inorganic phosphate in greenhouse both under axenic conditions and in soil. The results obtained demonstrated that strains UFLA 04-155 and UFLA 04-21 inoculated with insoluble calcium phosphate (P-Ca) were capable of increasing the dry matter content of the shoot of the common bean plant which was given only P-Ca, under axenic conditions. But, the increase was not identified by the solubilization mechanism and may have occurred by means of other mechanisms. Nevertheless, the strains tested increased the shoot dry matter and the P content, besides other micro and macronutrients of corn, when cultivated in soil with natural phosphate (natural-P) after 45 days of planting. Strain UFLA 04-21 increased 100% of the shoot dry matter and 124.24% of the P content in the corn shoot. The phosphate-solubilizing mechanism utilized by these strains was likely 2-ketogluconic acid identified at the concentrations of 103.19 – 81.16 and 84.88 mmol L<sup>-1</sup> for UFLA 04-155, UFLA 04-21 and UFLA 04-233 respectively. That latter one produced further 0.155 mmol L<sup>-1</sup> of oxalic acid. These results point out that *Burkholderia* sp. UFLA 04-21 can be a potential candidate to the development of biofertilizer applicable to corn crop.

Keywords: Insoluble Phosphate Solubilization. Common bean plant. Corn. *Burkholderia fungorum*. *Burkholderia* sp.

## 1 INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é um nutriente que desempenha importantes funções metabólicas nas plantas, sendo essencial para seu desenvolvimento. Em decorrência da baixa concentração de P disponível no solo, tornando-o um fator limitante para o crescimento vegetal, este nutriente deve ser adicionado ao solo em formas de fosfatos inorgânicos. A maior parte destes fosfatos utilizados como fertilizantes são imobilizados após sua aplicação, indisponibilizando-os para as plantas, requerendo, assim, a aplicação de quantidades crescentes de fertilizantes fosfatados.

A imobilização do P adicionado ao solo ocorre tanto pela precipitação do P em solução com formas iônicas de Fe, Al e Ca, como principalmente, pela sua adsorção pelos óxidos, hidróxidos e oxi-hidróxidos de Fe e Al, presentes em maiores quantidades em solos mais intemperizados (NOVAIS; SMITH, 1999), dando origem aos fosfatos inorgânicos insolúveis. Assim, os solos são grandes reservatórios de fosfato insolúveis que podem ser utilizados pelos microorganismos, disponibilizando elementos essenciais para aumentar a produção agrícola. Estratégias vêm sendo conduzidas de forma a investigar bactérias e fungos solubilizadoras desses fosfatos inorgânicos insolúveis a fim de disponibilizar o fósforo (P) indisponível do solo para plantas como: milho (CHABOT et al., 1996, 1998; LAHEURTE; BERTHELIN, 1988; RICHA; KHOSLA; REDDY, 2007), tomate (HARIPRASAD et al., 2009), soja (FERNÁNDEZ et al., 2007), canola (FREITAS; BANERJEE; GERMIDA, 1997), trigo (BABANA; ANTOUN, 2006); grão de bico e cevada (PEIX et al., 2001a; RIVAS et al., 2006). A solubilização de fosfato é um fenômeno complexo que depende de fatores nutricional, fisiológico e condições de crescimento da cultura (REYES et al., 1999).

Na solubilização dos fosfatos inorgânicos insolúveis, os micro-organismos utilizam mecanismos como a produção e liberação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular (HWANGBO et al., 2003; KPOMBLEKOU; TABATABAI, 1994, 2003; RODRÍGUEZ et al., 2004), que solubilizam formas precipitadas de P, como os fosfatos de Fe e Al nos solos ácidos e os fosfatos de Ca em solos alcalinos (TAN, 1993), atuando como fontes de prótons ou na quelatação do elemento acompanhante do íon fosfato (KPOMBLEKOU; TABATABAI, 1994; LIM et al., 2006). São reportados vários tipos de ácidos orgânicos produzidos pelos micro-organismos envolvidos na solubilização, como glucônico, 2- cetoglucônico, oxálico, cítrico, propiônico, láctico, succínico, butírico, fumárico e ácido acético (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999). Entretanto, outros mecanismos como a extrusão de prótons via respiração celular e absorção de  $\text{NH}_4^+$  como fonte de nitrogênio (ILLMER; SCHINNER, 1992), além da produção de exopolissacarídeos (YI; HUANG; GE, 2008) também são relatados.

Uma vez presentes no solo, ou até mesmo introduzidos, esses micro-organismos, têm o potencial de diminuir o uso de fertilizantes fosfatados por favorecer a disponibilização e por reduzirem a fixação na matriz do solo dos constituintes dos fertilizantes presentes no solo, reduzindo custos e melhorando o rendimento das culturas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a solubilização de fosfato inorgânico insolúvel e a produção de ácidos orgânicos envolvidos na solubilização de fosfatos por estirpes bacterianas e sua contribuição no crescimento de feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e milho (*Zea mays* L.).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Estirpes estudadas

Foram estudadas seis estirpes (Tabela 1) pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As estirpes foram isoladas de amostras de solos sob diferentes usos na Amazônia Ocidental (LIMA et al., 2009) e não formam simbiose com feijoeiro-comum, exceto UFLA 04-195 (FERREIRA et al., 2012). Estas estirpes foram previamente selecionadas pelo alto índice de solubilização de fosfato de cálcio em meio sólido (GES) e a UFLA 04-195 foi selecionada como controle negativo para a solubilização de fosfato de cálcio (OLIVEIRA, 2009). Também foi estudada a estirpe LMG 1222<sup>T</sup> de *Burkholderia cepacia* como controle positivo para a solubilização de fosfato de cálcio in vitro (PEIX et al., 2001b).

Tabela 1 Origem e característica promotora de crescimento vegetal das estirpes isoladas dos solos da Amazônia, sob diferentes sistemas de uso da terra (SUT<sup>1</sup>) e a LMG 1222<sup>T</sup>

Estirpes	Localização/ SUT <sup>1</sup>	Espécie <sup>(1)</sup>	Nº de acesso no GenBank (NCBI)	Características Promotoras de Crescimento (OLIVEIRA, 2009)				
				Índice de Solubilização (I.S.)		Auxina – AIA** (µg ml <sup>-1</sup> )		Atividade da nitrogena- se em vida livre
				Fosfato de Ca	Fosfato de Al	-	+	
				Tryptofano				
UFLA 04-195	Amazonas/FA	<i>Rhizobium</i> sp.	JF412048	NS	Baixa	0,44	7,73	+
UFLA 04-217	Amazonas/FA	<i>Burkholderia fungorum</i>	-	Médio	Baixa	0	28,74	+
UFLA 04-155	Amazonas/FI	<i>Burkholderia fungorum</i>	GU144382	Alto	Baixa	6,29	4,53	+
UFLA 04-232	Amazonas/P	<i>Burkholderia fungorum</i>	JF412055	Alto	NS	4,84	7,6	+
UFLA 04-233	Amazonas/AG	<i>Burkholderia fungorum</i>	JF412056	Alto	NS	2,53	2,14	+
UFLA 04-21	Amazonas/AG	<i>Burkholderia</i> sp.	JF534643	Médio	Baixa	2,35	6,51	+
LMG 1222 <sup>T</sup>	Estados Unidos	<i>Burkholderia cepacia</i>	-	-	-	-	-	-

FA: Floresta secundária em estágio avançado de regeneração, AG: Agricultura, P: pastagem, FI: Floresta secundária em estágio inicial de regeneração. I.S = diâmetro do halo (mm) / diâmetro da colônia (mm); Baixo: I.S < 2, Médio: 2,00 ≤ S.I < 4,00, Alto: S.I ≥ 4,00. NS: Não solubilizadora. \*\*Produção do AIA na ausência (-) e presença (+) do triptofano

(<sup>1</sup>)FERREIRA et al., 2012; (<sup>1</sup>)LIMA et al., 2009)

## **2.2 Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio inorgânico insolúvel em meio líquido.**

A capacidade solubilizadora de fosfato das estirpes foi avaliada em meio NBRIP contendo ( $\text{g L}^{-1}$ ): glicose (10);  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (5);  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (5);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,25); KCl (0,2) e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,1) (NAUTIYAL, 1999). Nesta condição, a concentração de P precipitado é de aproximadamente  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ . O pH do meio foi ajustado em 6,8.

Para obtenção dos inóculos, as estirpes foram cultivadas em meio 79 (FRED; WAKSMAN, 1928) ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,1);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,4);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2); NaCl (0,1); manitol (10) e extrato de levedura (0,4) com pH 6,8. Quando necessária solução salina (0,85%) foi adicionada ao meio 79 para ajustar a concentração das células à densidade ótica (DO) de 0,5 (560nm), equivalente a  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Um mL desse inóculo foi adicionado em Erlenmeyer (250 mL) com 50 mL do meio (NBRIP) suplementados com a fonte de fosfato de cálcio.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com 11 tratamentos (BR3267<sup>T</sup>, UFLA03-84<sup>T</sup>, CIAT899<sup>T</sup>, UFLA04-232, UFLA04-155, INPA03-11B, UFLA04-233, UFLA04-21, UFLA04-217 e a LMG 1222) mais o controle (meio de cultura com a fonte de fosfato na ausência das estirpes), com três repetições. Os frascos foram incubados a 28 °C a 150 rpm por sete dias. Após este período, as amostras foram centrifugadas (17.792 g por 10 min.) e uma alíquota foi retirada para a identificação e quantificação dos ácidos orgânicos, a outra parte do sobrenadante foi determinado o pH e quantificados os teores de P-solúvel no sobrenadante usando o método fosfomolibdato (MURPHY; RILEY, 1962). A capacidade solubilizadora foi determinada pela diferença entre a quantidade de P-solúvel no meio inoculado e o teor do elemento no respectivo tratamento controle.

### **2.3 Identificação e quantificação dos ácidos orgânicos**

Uma alíquota de 100 µL do meio de cultura preparado como descrito no item 2.2, obtida através da centrifugação das amostras foi retirada para identificação e quantificação de ácidos orgânicos. As análises foram realizadas utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Agilent HP Série 1100).

As amostras foram filtradas em membrana celulósica com 0,45 µm de diâmetro do poro para injeção em coluna cromatográfica modelo Supelcogel C-610H 9µm, 30 cm x 7,8 mm. Como padrões analíticos foram utilizados ácidos orgânicos pró-análise Merck®. A fase móvel utilizada foi H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 0,1% (pH 1,81) com fluxo de 0,5 mL min<sup>-1</sup> e injeção de 100 µL por amostra. O tempo de aquisição do cromatograma foi estimado em 30 min., com intervalo de 30 minutos entre as corridas. A detecção foi por UV a 210 nm, utilizando-se um detector de arranjo de diodos (DAD). Os ácidos orgânicos avaliados foram: ácido cítrico, ácido 2-cetoglucônico, ácido glucônico, ácido láctico, ácido oxálico, ácido propiônico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido málico, ácido maléico e ácido malônico. A quantificação dos ácidos presentes nas amostras foi realizada através de curvas de calibração construídas com os padrões analíticos.

### **2.4 Experimento em casa de vegetação**

#### **2.4.1 Experimento em vasos Leonard (VINCENT, 1970)**

O primeiro experimento foi conduzido durante o período de Março a Abril de 2011 em casa de vegetação do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Neste primeiro experimento, as plantas foram crescidas em vasos Leonard, com a parte superior do vaso contendo uma

mistura 1:2 de areia ( $150 \text{ cm}^3$ ) e vermiculita ( $300 \text{ cm}^3$ ), a inferior, com solução nutritiva (HOAGLAND; ARNON, 1950) com composição por litro de solução de acordo com os tratamentos: com P-solúvel ( $31 \text{ mg L}^{-1}$ )  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  114,0 mg;  $\text{KNO}_3$  606,7 mg;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  944,6 mg;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  493,8 mg;  $\text{H}_2\text{BO}_3$  2,86 mg;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1,81;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,22 mg;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,08 mg;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,023 mg e Fe-EDTA 1 mL. Para o P-solúvel ( $62 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi adicionado o reagente  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  em dobro, sendo que os demais seguiu a mesma concentração. Enquanto, para os tratamentos com P-insolúvel ( $0,25 \text{ g}$  de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) e com baixa concentração de P ( $3,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) a composição foi  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  11,5 mg;  $\text{KNO}_3$  606,7 mg;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  944,6 mg;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  493,8 mg;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  80,0 mg;  $\text{H}_2\text{BO}_3$  2,86 mg;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1,81 mg;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,22 mg;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,08 mg;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,023 mg; Fe-EDTA 1 mL por L solução<sup>-1</sup>. Sendo estas soluções diluídas quatro vezes apresentando pH entre 6,5 e 6,7. Após o preparo dos vasos e das soluções nutritiva, estes foram autoclavados por uma hora, à pressão de  $1,5 \text{ kg cm}^{-2}$  a  $127^\circ \text{ C}$ .

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constando da inoculação das estirpes UFLA 04-155, UFLA 04-233, UFLA 04-21, UFLA 04-217 (solubilizadoras de fosfato de cálcio) e UFLA 04-195 (controle negativo para a solubilização de fosfato de cálcio) (Tabela 1) em vasos contendo  $0,25 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (SIGMA) equivalente a  $50 \text{ mg}$  de P vaso<sup>-1</sup>, vasos contendo somente  $0,25 \text{ g}$  de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  sem a inoculação e dois controles positivos contendo 31 e  $62 \text{ mg L}^{-1}$  de P-solúvel na forma de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , e um controle negativo com baixa adição de P-solúvel e sem o P-insolúvel ( $\text{Ca}_3\text{PO}_4$ )<sub>2</sub> (apresentando  $3,1 \text{ mg L}^{-1}$  de P-solúvel na forma de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ), com 3 repetições.

As culturas estudadas foram feijoeiro-comum cultivar BRS-MG Talismã, tipo de grão carioca, lançada em 2002, resistente ao vírus do mosaico

comum e antracnose e moderadamente resistente à mancha-angular (RAMALHO et al., 2002) e o milho cultivar BR 206 híbrido duplo precoce, sendo que cada espécie vegetal constituiu um experimento.

As estirpes bacterianas foram cultivadas em meio de cultura líquido 79 (FRED; WAKSMAN, 1928), pH 6,8, sob agitação de 150 rpm e inoculadas  $10^8$  UFC por semente. As sementes foram desinfestadas superficialmente com etanol 96% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 1%, por 3 minutos e, em seguida, lavadas seis vezes com água destilada esterilizada. Foram pré-germinadas sobre algodão e papel de filtro umedecido com H<sub>2</sub>O destilada esterilizada, em placas de Petri, incubadas em câmara de crescimento a 28 °C até a emissão da radícula.

Cada vaso recebeu 4 sementes pré-germinadas. Antes da semeadura, os vasos receberam 5 mL de água destilada esterilizada para aumentar a umidade do substrato. Também foi adicionado, após a semeadura, sobre a superfície do vaso, uma fina camada da mistura esterilizada de areia (10 kg), clorofórmio (1 L) e parafina (0,03 kg) para evitar contaminações. O desbaste foi realizado no sétimo dia após a emergência (DAE), permanecendo 2 plantas por vaso.

A solução nos vasos foi substituída semanalmente por solução nutritiva estéril até o final do experimento. A temperatura média da casa de vegetação foi avaliada semanalmente, identificando-se a média das mínimas de 15 °C e a média das máximas de 36 °C. A máxima obtida foi 42 °C e a mínima 13 °C.

## **2.4.2 Experimento em vaso com solo**

### **2.4.2.1 Contagem de micro-organismos solubilizadores de fosfato no solo**

Para estimar o número de micro-organismos solubilizadores no solo, foram utilizadas placas de Petri com meio de cultura NBRIP, dez diluições decimais seriadas em solução salina (8,5 g L<sup>-1</sup> de NaCl) de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-10</sup> e controle

não inoculado. O espalhamento foi realizado com 100 µL da suspensão de solo das diluições seriadas obtidas, nas placas. A contagem foi realizada periodicamente até o oitavo dia após inoculação.

#### **2.4.2.2 Condução do experimento**

O segundo experimento foi conduzido entre os meses de Maio a Junho de 2011, utilizando vasos plásticos com capacidade de 2 dm<sup>3</sup> com solo arenoso, Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico textura média (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2006), coletado na região de Itumirim, MG-Brasil de uma área com plantio de braquiária. O solo foi coletado na camada arável (0 a 20 cm), seco ao ar, destorroado, homogeneizado e passado na peneira de 4 mm de abertura, apresentando as características químicas antes da correção na Tabela 2. Para a correção deste solo, foi realizada a calagem segundo o método de saturação por bases, de modo a elevar a saturação para 60%. Em todas as parcelas, foi efetuada uma adubação básica (mg dm<sup>-3</sup>): 300 de N, 300 de K; 40 de S, 1,5 de Cu; 3,6 de Mn; 5,0 de Zn; 0,8 de B; 0,15 de Mo, sendo a adubação nitrogenada e potássica parcelada em três vezes, a primeira 12 dias após a emergência (DAE) e as demais com 24 e 40 DAE.

O delineamento experimental foi o mesmo para o primeiro experimento, constando da inoculação das cinco estirpes em vasos com solo contendo 6,0 g de fosfato natural de Araxá (Apatita – 23% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) equivalente a 600 mg de P vaso<sup>-1</sup>, um controle somente com o fosfato natural de Araxá (6,0 g vaso<sup>-1</sup>) e dois controles positivos contendo 300 e 600 mg vaso<sup>-1</sup> de P-solúvel aplicado na forma do adubo super triplo, e um controle negativo sem a adição de P-solúvel e sem adição de fosfato natural de Araxá e sem inoculação, com 3 repetições . O

fosfato natural de Araxá e o adubo super simples foram aplicados 2 dias antes do plantio.

O preparo do inóculo e a desinfestação das sementes foram realizados seguindo as mesmas metodologias conforme descritas no ensaio anterior (item 2.4.1). Cada vaso recebeu 4 sementes pré-germinadas, sendo que os tratamentos inoculados receberam  $10^8$  UFC por semente. Após a semeadura, os vasos foram irrigados com água destilada. O desbaste foi realizado no sexto dia após a emergência (DAE), permanecendo 2 plantas vaso<sup>-1</sup>.

Tabela 2 Características químicas e físicas do solo coletado na região de Itumirim, MG - Brasil para o crescimento de feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e de milho (*Zea mays*)

<b>pH<sub>H2O</sub></b>	<b>P<sup>(1)</sup></b>	<b>K<sup>(1)</sup></b>	<b>Ca<sup>(2)</sup></b>	<b>Mg<sup>(2)</sup></b>	<b>Al<sup>(3)</sup></b>	<b>H + Al<sup>(3)</sup></b>	<b>SB</b>	<b>(t)</b>	<b>T</b>		
	mg dm <sup>-3</sup>		cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>								
4,6	1,2	19,0	0,1	0,1	0,3	2,3	0,2	0,5	2,6		
Baixo	Muito baixo	Baixo	Muito baixo	Muito baixo	Baixo	Baixo	Muito baixo	Muito baixo	Baixo		
<b>V</b>	<b>M</b>	<b>Silte</b>	<b>Argila</b>	<b>MO</b>	<b>P-rem</b>	<b>Zn</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>Cu</b>	<b>B</b>	<b>S</b>
	%			g kg <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	mg dm <sup>-3</sup>					
9,7	54,7	4	27	60,0	39,8	1,6	17,0	0,4	0,5	0,1	20,8
Muito baixo	Alta	-	-	Muito baixo	-	Bom	Baixo	Muito baixo	Baixo	Muito baixo	Muito bom

Classe de interpretação: Ribeiro, Guimarães e Alvarez (1999). <sup>(1)</sup> Extrator Mehlich-1 (MEHLICH, 1978, 1984). <sup>(2)</sup> Extrator KCl 1 mol L<sup>-1</sup>. <sup>(3)</sup> Acidez potencial em pH 7,0 extraída com acetato de cálcio 1 mol L<sup>-1</sup>. SB: soma de bases trocáveis; t: CTC efetiva; T: CTC a pH 7,00; V: saturação por bases; M: Índice de saturação de alumínio. <sup>(4)</sup> Matéria orgânica –oxidação: Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 4N + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10N. P-rem: Fósforo remanescente

### **2.4.3 Coleta e parâmetros analisados**

O feijoeiro-comum foi colhido no início do florescimento, 40 dias após emergência (DAE) para o experimento em vasos Leonard e com 50 DAE para o experimento em vasos com solo, enquanto o milho cultivado em vaso Leonard foi colhido aos 40 DAE (2 plantas vaso<sup>-1</sup>) e, em cultivo no solo, foram realizadas duas coletas, uma com 30 DAE e outra com 45 DAE (resultados para uma planta vaso<sup>-1</sup>).

Os parâmetros analisados foram: matéria seca da parte aérea (MSPA) e raízes (MSR), conteúdo de Fósforo (P), Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg), Enxofre (S), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Manganês (Mn) e Zinco (Zn), na parte aérea das plantas de feijoeiro-comum e milho (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

### **2.2.4 Análise estatística**

Todos os dados foram submetidos à análise de variância, empregando-se o sistema de análise estatística SISVAR, versão 5.3 (FERREIRA, 2008). As médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott, com 5% de probabilidade.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Solubilização de fosfato de cálcio, identificação e quantificação dos ácidos orgânicos pelas estirpes em meio líquido NBRIP

Todas as estirpes foram capazes de solubilizar o fosfato inorgânico insolúvel em meio líquido NBRIP (Figura 1). A maior solubilização ocorreu com a estirpe LM 1222<sup>T</sup> (*Burkholderia cepacia*) com 27,71 mg L<sup>-1</sup> de fósforo solúvel (P-solúvel) (Figura 1). As outras cinco estirpes (UFLA 04-232, UFLA 04-155, UFLA 04-233, UFLA 04-21 e UFLA 04-217) apresentaram entre 22,70 a 25,12 mg L<sup>-1</sup> de P-solúvel. O decréscimo do pH do meio de cultura foi observado nas seis estirpes, que mostraram capacidade de solubilização de fosfato de cálcio (Figura 1).

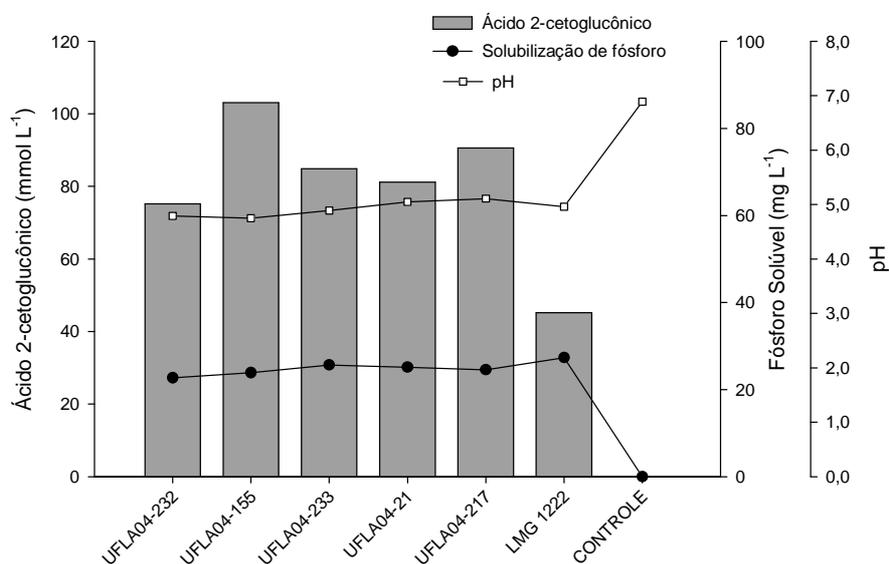


Figura 1 Solubilização, pH e produção de ácido 2-cetoglucônico, após incubação das estirpes em meio líquido NBRIP na presença de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

Entre os onze ácidos estudados, somente o ácido 2-cetoglucônico e oxálico foram produzidos pelas estirpes (Figura 1 e 2). Sendo que o ácido 2-cetoglucônico foi produzido por todas as estirpes (Figura 1). UFLA 04-155 (*Burkholderia fungorum*) apresentou maior produção do ácido 2-cetoglucônico com  $103,12 \text{ mmol L}^{-1}$ , enquanto LMG 1222<sup>T</sup> apresentou menor produção  $45,17 \text{ mmol L}^{-1}$  (Figura 1). O ácido oxálico foi produzido pelas estirpes UFLA04-232 e UFLA 04-233, ambas *B. fungorum*, nas concentrações de  $0,063$  e  $0,115 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectivamente (Figura 2).

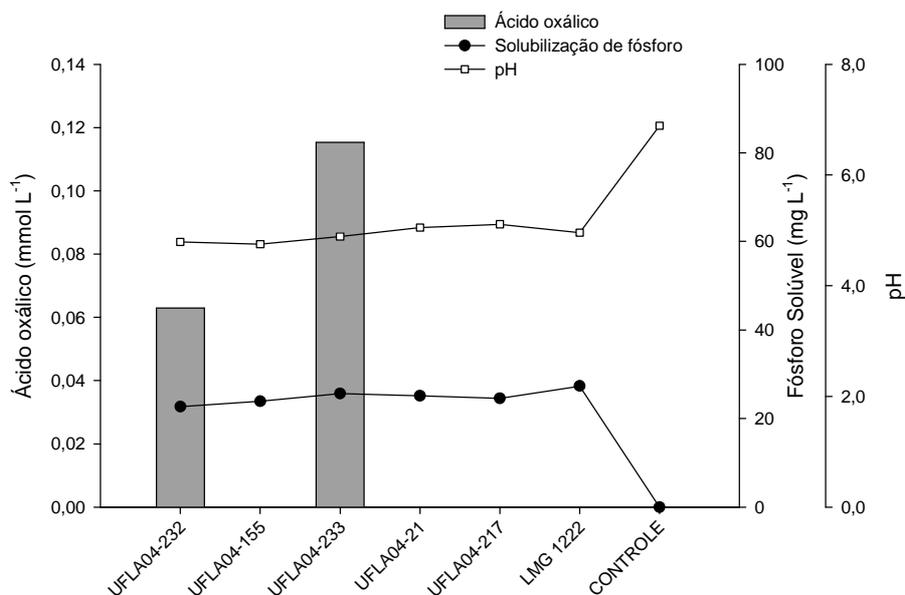


Figura 2 Solubilização, pH e produção de ácido oxálico, após incubação das estirpes em meio líquido NBRIP na presença de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

### 3.2 Efeito das bactérias solubilizadoras de fosfato em feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e milho (*Zea mays*) em vasos Leornad.

No primeiro experimento em casa de vegetação, as estirpes UFLA 04-155 e UFLA 04-21 (*Burkholderia fungorum* e *Burkholderia* sp.) promoveram aumento da matéria seca da parte aérea da planta de feijoeiro-comum, em relação ao controle que recebeu somente o fosfato insolúvel (P-Ca) (Figura 3), sendo que a UFLA 04-21 apresentou matéria seca da parte aérea semelhante à planta que recebeu 31 mg L<sup>-1</sup> de fósforo solúvel (Figura 3).

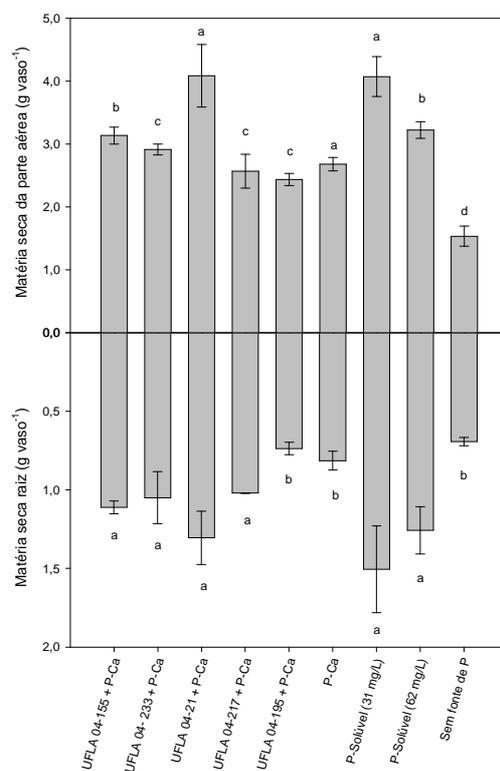


Figura 3 Efeito da inoculação das estirpes solubilizadoras de fosfato de cálcio *Burkholderia fungorum* e *Burkholderia* sp. e o controle não solubilizador UFLA 04-195 (*Rhizobium* sp.) na matéria seca da parte aérea e raiz do feijoeiro-comum em vasos Leonard. Barras de erro:  $\pm$  Erro padrão da média. P-Ca: Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>

Todas as estirpes contribuíram significativamente para o aumento da matéria seca da raiz, exceto o controle não solubilizador, UFLA 04-195 (*Rhizobium* sp) que permaneceu igual à planta que recebeu somente o P-Ca e a que não recebeu nenhuma fonte de fósforo (Sem fonte de P) (Figura 3).

Apesar de não terem ocorrido diferenças significativas no conteúdo de P das plantas inoculadas com as estirpes em relação ao controle que recebeu somente o P-Ca, o conteúdo de K, Mg, Cu e Zn nas plantas inoculadas com UFLA 04-155 e UFLA 04-21 foi maior, sendo que as plantas inoculadas com UFLA 04-155 apresentaram, também, maior conteúdo de S e Zn e a UFLA 04-21 de Mn e Fe (Tabela 3).

As estirpes UFLA 04-233 e UFLA 04-195 proporcionaram aumento no conteúdo de Mg, sendo que a primeira ainda aumentou o Cu, Mn e Zn em relação a planta que recebeu somente o P-Ca. Enquanto, UFLA 04-217 não apresentou aumento no conteúdo de nenhum dos nutrientes (Tabela 3).

Tabela 3 Efeito da inoculação das estirpes solubilizadoras de fosfato de cálcio *Burkholderia fungorum* e *Burkholderia* sp. e o controle não solubilizador UFLA 04-195 (*Rhizobium* sp.) no conteúdo de nutrientes da parte aérea de feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em vaso Leonard

Tratamentos	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn	Zn
	(mg vaso <sup>-1</sup> )					(µg vaso <sup>-1</sup> )			
UFLA 04-155+ P-Ca	5,58 c	39,9 a	26,51 a	25,37 a	30,40 b	21,93 a	229,08 b	116,54 b	76,64 a
UFLA 04-233 + P-Ca	4,10 c	29,30 b	27,22 a	24,01 a	22,55 c	16,20 a	208,78 b	144,44 a	65,61 a
UFLA 04-21 + P-Ca	4,87 c	40,46 a	31,60 a	22,69 a	20,30 c	16,70 a	300,43 a	148,94 a	76,88 a
UFLA 04-217 + P-Ca	4,25 c	27,99 b	20,94 b	16,9 b	16,02 c	11,95 b	191,91 b	96,71 b	46,42 b
UFLA 04-195 + P-Ca	3,41 c	28,06 b	23,21 b	23,23 a	17,97 c	13,80 b	225,11 b	104,58 b	50,70 b
P-Ca	3,28 c	30,08 b	27,50 a	17,69 b	17,77 c	11,50 b	171,64 b	105,93 b	67,20 b
Sem fonte de P	1,65 e	26,65 b	14,50 b	12,73 b	16,60 c	10,88 b	147,91 b	96,72 b	44,07 b
P-Solúvel (31 mg L <sup>-1</sup> )	9,19 b	43,35 a	35,60 a	31,77 a	41,62 a	18,90 a	337,60 a	112,05 b	44,07 b
P-Solúvel (62 mg L <sup>-1</sup> )	12,78 a	15,98 c	25,74 a	25,52 a	36,29 a	21,12 a	230,50 b	107,46 b	90,49 a
% CV	12,82	19,32	17,37	17,65	18,04	16,83	17,33	19,81	19,85

Em cada coluna, valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott-Knott com 5% de probabilidade. P-Ca: Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>

Já nas plantas de milho, nenhuma das estirpes estudadas proporcionou aumento na matéria seca tanto da parte aérea, como da raiz em relação à planta que recebeu somente o P-Ca (Figura 4). No entanto, a cultura aumentou a matéria seca tanto da parte aérea, como da raiz quando cultivada com o dobro da dosagem de P-solúvel ( $62 \text{ mg L}^{-1}$ ) na forma de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  em solução nutritiva, em relação a dose normal da solução de  $31 \text{ mg L}^{-1}$  (Figura 4).

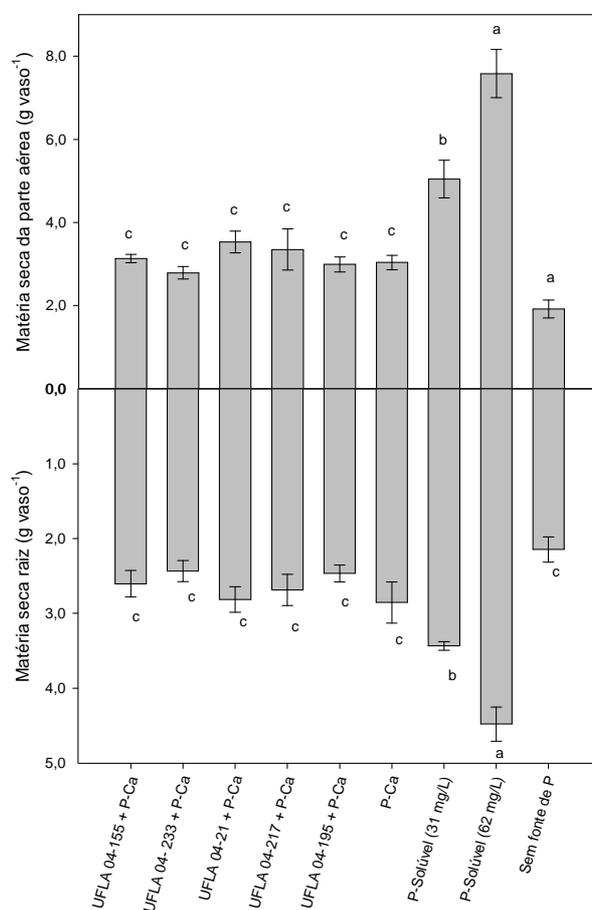


Figura 4 Efeito da inoculação das estirpes solubilizadoras de fosfato de cálcio *Burkholderia fungorum* e *Burkholderia* sp. e o controle não solubilizador UFLA 04-195 (*Rhizobium* sp.) na matéria seca da parte aérea e raiz do milho em vasos Leonard. Barras de erro:  $\pm$  Erro padrão da média. P-Ca:  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

Todas as estirpes proporcionaram aumento significativo no conteúdo de Zn, sendo que UFLA 04-155 e UFLA 04-233 também proporcionaram aumento no conteúdo de K e UFLA 04-21 além do K, o S (Tabela 4).

Tabela 4 Efeito da inoculação das estirpes solubilizadoras de fosfato de cálcio *Burkholderia fungorum* e *Burkholderia* sp. e o controle não solubilizador UFLA 04-195 (*Rhizobium* sp.) no conteúdo de nutrientes da parte aérea do milho (*Zea mays* L.) em vaso Leonard

Tratamentos	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Zn
	(mg vaso <sup>-1</sup> )				(µg vaso <sup>-1</sup> )		
UFLA 04-155 + P-Ca	2,33 c	30,66 a	21,28 a	18,67 a	18,54 b	238,66 a	88,49 a
UFLA 04-233 + P-Ca	1,97 c	30,83 a	18,40 a	18,37 a	20,86 b	196,52 a	85,93 a
UFLA 04-21 + P-Ca	2,40 c	38,26 a	23,81 a	22,20 a	32,13 a	219,73 a	113,89 a
UFLA 04-217 + P-Ca	2,13 c	24,62 b	17,04 a	16,21 a	15,65 b	225,43 a	77,65 a
UFLA 04-195 + P-Ca	2,26 c	21,42 b	17,77 a	15,50 a	15,14 b	196,31 a	82,23 a
P-Ca	2,06 c	26,81 b	17,69 a	14,50 a	14,89 b	187,63 a	66,23 b
Sem fonte P	1,36 c	13,85 c	11,64 b	8,99 b	2,57 c	109,47 a	55,81 b
P-Solúvel (31 mg L <sup>-1</sup> )	10,02 b	33,53 a	18,25 a	16,49 a	4,47 c	238,66 a	55,53 b
P-Solúvel (62 mg L <sup>-1</sup> )	20,38 a	25,72 b	10,11 b	10,92 b	18,54 b	187,82 a	52,06 b
% CV	15,29	15,82	20,61	18,59	28,50	22,06	25,60

Em cada coluna, valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott-Knott com 5% de probabilidade. NS: Não significativo para Cu e Mn. P-Ca: Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>

### 3.3 Efeito das bactérias solubilizadoras de fosfato em feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e milho (*Zea mays*) em vasos com solo.

No segundo experimento utilizando o solo, nenhuma estirpe aumentou a matéria seca da parte aérea e raiz da planta de feijoeiro-comum em relação à planta que recebeu somente o fosfato natural de Araxá (Fosfato natural) (Figura 5).

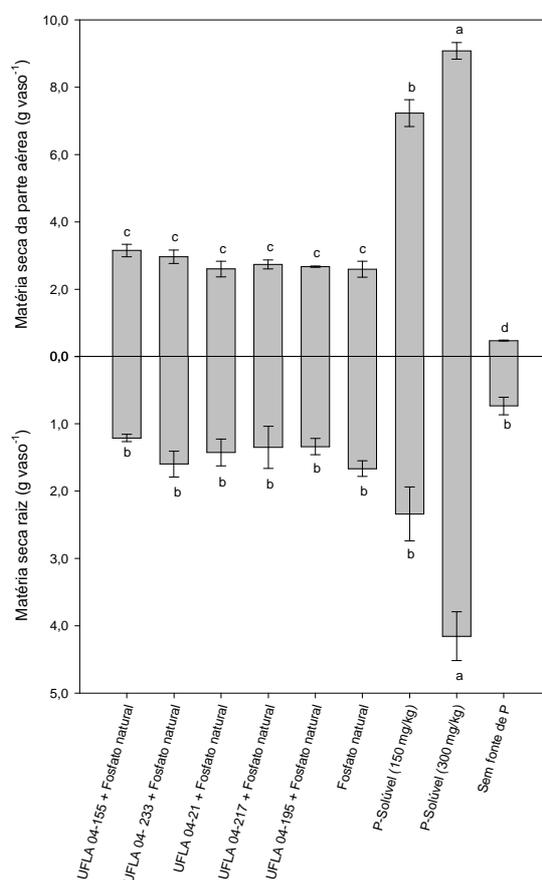


Figura 5 Efeito da inoculação das estirpes solubilizadoras de fosfato de cálcio *Burkholderia fungorum* e *Burkholderia* sp. e o controle não solubilizador UFLA 04-195 (*Rhizobium* sp.) na matéria seca da parte aérea e raiz do feijoeiro-comum em vasos com solo. Barras de erro:  $\pm$  Erro padrão da média

A matéria seca da parte aérea, raiz (Figura 5) e os conteúdos de todos os nutrientes (Tabela 5) aumentaram quando a planta recebeu 300 mg de P-solúvel por kg de solo em relação a dosagem de 150 mg kg<sup>-1</sup>.

As plantas de feijoeiro-comum inoculadas com as estirpes não diferiram no conteúdo dos nutrientes em relação à planta que recebeu somente o fosfato natural de Araxá (Fosfato natural), exceto UFLA 04-155, que apresentou aumento significativo no conteúdo de K, Ca e Zn (Tabela 5).

Tabela 5 Efeito da inoculação das estirpes solubilizadoras de fosfato de cálcio *Burkholderia fungorum* e *Burkholderia* sp. e o controle não solubilizador UFLA 04-195 (*Rhizobium* sp.) no conteúdo de nutrientes da parte aérea do feijoeiro-comum em vaso com solo (*Phaseolus vulgaris* L.)

Tratamentos	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn	Zn
	(mg vaso <sup>-1</sup> )					(µg vaso <sup>-1</sup> )			
UFLA 04-155 + Fosfato natural	5,31 c	34,33 b	40,42 c	20,06 c	54,40 c	19,38 c	584,2 c	410,3 c	161,35 b
UFLA 04-233 + Fosfato natural	4,59 c	26,36 c	29,22 d	15,71 c	34,26 c	18,59 c	569,0 c	288,9 c	115,48 c
UFLA 04-21 + Fosfato natural	4,48 c	24,47 c	26,66 d	14,89 c	40,50 c	16,66 c	558,0 c	285,36 c	107,49 c
UFLA 04-217 + Fosfato natural	3,78 c	23,72 c	26,22 d	14,12 c	30,61 c	12,99 c	388,5 c	260,7 c	105,06 c
UFLA 04-195 + Fosfato natural	4,11 c	25,87 c	29,22 d	14,56 c	31,97 c	16,23 c	530,7 c	288,6c	128,39 c
Fosfato natural	4,20 c	23,71 c	31,03 d	16,30 c	36,95 c	16,51 c	624,9 c	297 c	142,26 c
Sem fonte de P	0,36 d	3,96 d	4,13 e	2,95 d	8,97 d	4,93 d	93,58 d	48,2 d	26,72 d
P-Solúvel (150 mg Kg <sup>-1</sup> )	36,55 b	55,05 b	91,71 b	41,75 b	111,42 b	52,42 b	1661 b	683 b	195,29 b
P-Solúvel (300 mg Kg <sup>-1</sup> )	55,65 a	74,07 a	148,29 a	51,66 a	258,50 a	66,04 a	2188 a	1268 a	312,38 a
% CV	12,09	9,71	12,15	16,30	14,94	18,54	23,80	20,45	19,94

Em cada coluna, valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott-Knott com 5% de probabilidade

Trinta dias após o plantio do milho, as estirpes UFLA 04-233 e UFLA 04-217 (*B. fungorum*) aumentaram a matéria seca da parte aérea das plantas em relação ao controle que recebeu somente o fosfato natural de Araxá (Fosfato natural) (Figura 6).

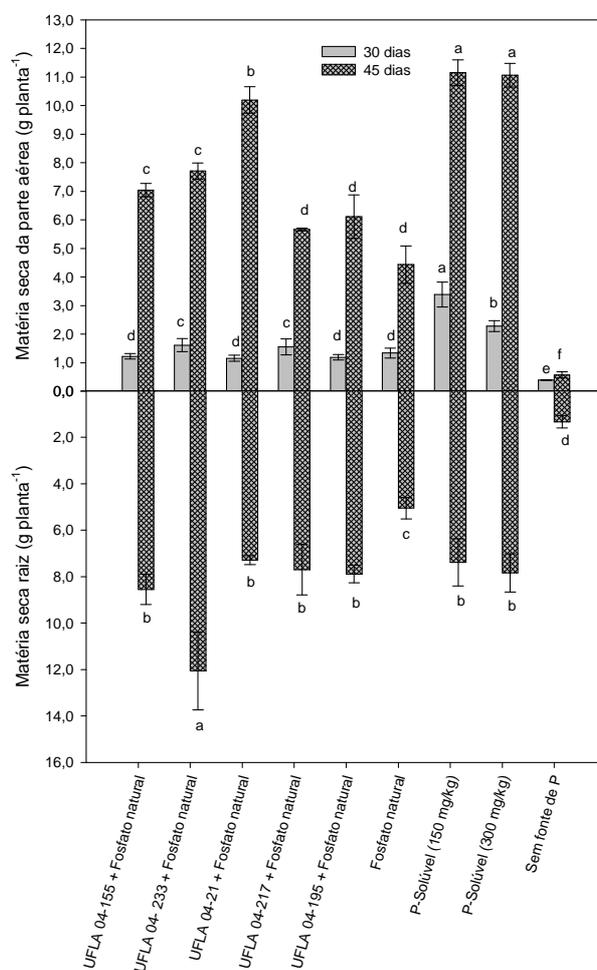


Figura 6 Efeito da inoculação das estirpes solubilizadoras de fosfato de cálcio *Burkholderia fungorum* e *Burkholderia* sp. e o controle não solubilizador UFLA 04-195 (*Rhizobium* sp.) na matéria seca da parte aérea e raiz do milho em vasos com solo. Barras de erro:  $\pm$  Erro padrão da média

No entanto, com 45 dias, as estirpes UFLA 04-233, UFLA 04-155 e UFLA 04-21 aumentaram a matéria seca da parte aérea em relação à planta que recebeu somente o fosfato natural de Araxá (Fosfato natural) (Figura 6) e não houve diferença entre as duas doses de P-solúvel utilizadas (Figura 6).

Todas as estirpes estimularam o aumento das raízes da planta do milho, em relação à planta que recebeu somente o fosfato natural de Araxá (Fosfato natural), permanecendo semelhante às plantas que receberam as doses de P-solúvel (Figura 6).

Após 30 dias de plantio, os conteúdos dos nutrientes P, Ca, Mg, S e Cu nas plantas inoculadas com as estirpes não diferiram da planta que recebeu somente o fosfato natural de Araxá (Fosfato natural) (Tabela 6). A estirpe UFLA 04-155 proporcionou aumento no conteúdo de K e Mn, UFLA 04-217 além do K também aumentou o Fe, Mn e Zn e UFLA 04-233 Fe e Mn (Tabela 6).

Já com 45 dias, as estirpes UFLA 04-155, UFLA 04-233 e UFLA 04-21 aumentaram o conteúdo de P nas plantas de milho, em relação a planta que recebeu somente o fosfato natural de Araxá (Fosfato natural) (Tabela 7). Além do conteúdo de P, todos os outros conteúdos de nutrientes na parte aérea do milho aumentaram significativamente nas plantas, exceto o Zn que, com a inoculação da UFLA 04-155 e UFLA 04-21, se manteve em concentrações semelhante ao da planta que recebeu somente o fosfato natural de Araxá (Fosfato natural).

A dosagem de 300 mg de P-solúvel por kilo de solo, aumentou o conteúdo de P e Cu na parte aérea do milho em relação a dosagem de 150 mg kg<sup>-1</sup>, enquanto, que os conteúdos de Ca, Mg, S, Fe Mn permaneceram semelhante (Tabela 7).

Tabela 6 Efeito da inoculação das estirpes solubilizadoras de fosfato de cálcio *Burkholderia fungorum* e *Burkholderia* sp. e o controle não solubilizador UFLA 04-195 (*Rhizobium* sp.) no conteúdo de nutrientes da parte aérea do milho (*Zea mays* L.) em vaso com solo com 30 dias após emergência (DAE)

Tratamentos	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn	Zn
	(mg vaso <sup>-1</sup> )					(µg vaso <sup>-1</sup> )			
UFLA 04-155 + Fosfato natural	1,61 c	23,91 b	10,39 b	7,49 b	3,55 b	12,07 b	95,60 c	179,76 b	52,85 c
UFLA 04-233 + Fosfato natural	2,44 c	18,63 c	10,73 b	8,21 b	3,91 b	17,08 b	115,39 b	193,80 b	54,06 c
UFLA 04-21 + Fosfato natural	1,59 c	15,49 c	7,62 b	5,43 b	3,5 b	9,97 b	79,74 c	126,29 c	38,81 d
UFLA 04-217 + Fosfato natural	2,63 c	29,33 b	11,81 b	8,46 b	5,06 b	14,49 b	113,76 b	191,00 b	75,58 b
UFLA 04-195 + Fosfato natural	2,15 c	17,88 c	7,69 b	10,13 b	3,27 b	10,30 b	91,30 c	143,25 c	52,75 c
Fosfato natural	1,88 c	16,36 c	9,49 b	7,68 b	3,74 b	11,37 b	104,62 c	147,99 c	54,18 c
Sem fonte de P	0,23 c	4,71 d	3,13 c	4,77 b	1,12 b	3,29 c	38,97 d	46,64 d	18,08 e
P-Solúvel (150 mg kg <sup>-1</sup> )	14,80 b	39,99 a	19,62 a	17,66 a	13,86 a	27,30 a	239,63 a	314,03 a	118,71 a
P-Solúvel (300 mg kg <sup>-1</sup> )	25,93 a	30,32 b	18,84 a	17,66 a	12,95 a	30,02 a	142,62 b	148,26 c	50,67 c
% CV	15,92	17,85	19,00	23,30	21,92	21,87	15,02	18,26	12,59

Em cada coluna, valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott-Knott com 5% de probabilidade

Tabela 7 Efeito da inoculação das estirpes solubilizadoras de fosfato de cálcio *Burkholderia fungorum* e *Burkholderia* sp. e o controle não solubilizador UFLA 04-195 (*Rhizobium* sp.) no conteúdo de nutrientes da parte aérea do milho (*Zea mays* L.) em vaso com solo com 45 dias após emergência (DAE)

Tratamentos	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn	Zn
	(mg vaso <sup>-1</sup> )					(µg vaso <sup>-1</sup> )			
UFLA 04-155 + Fosfato natural	9,16 c	108,40 c	39,47 c	26,86 c	23,21 b	54,28 c	646,24 b	849,09 b	273,27 b
UFLA 04-233 + Fosfato natural	10,56 c	110,41 c	47,19 b	29,40 c	26,88 b	58,59 c	912,19 a	1184,58 a	567,16 a
UFLA 04-21 + Fosfato Natural	11,93 c	140,20 b	56,55 a	40,42 b	23,30 b	69,01 b	944,51 a	1055,57 a	356,67 b
UFLA 04-217 + Fosfato Natural	6,84 d	76,48 d	31,69 c	19,83 d	18,42 c	43,37 d	569,12 b	747,41 b	310,68 b
UFLA 04-195 + Fosfato Natural	6,51 d	79,46 d	32,47 c	27,44 c	20,58 c	41,33 d	643,40 b	770,68 b	301,76 b
Fosfato natural	5,32 d	55,33 d	22,91 d	15,86 d	10,14 d	32,58 d	434,82 c	471,18 c	255,87 b
Sem fonte de P	0,35 e	8,22 e	4,34 e	7,03 e	2,43 e	6,49 e	40,83 d	44,25 d	23,18 c
P-Solúvel (150 mg kg <sup>-1</sup> )	36,24 b	185,03 a	51,13 a	48,03 a	45,56 a	65,91 b	842,24 a	944,36 a	466,26 a
P-Solúvel (300 mg kg <sup>-1</sup> )	60,79 a	148,39 b	58,23 a	53,84 a	45,91 a	80,52 a	866,45 a	985,79 a	316,69 b
% CV	18,03	14,69	10,54	14,57	11,61	13,39	10,70	18,75	23,69

Em cada coluna, valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott-Knott com 5% de probabilidade

#### 4 DISCUSSÃO

O P-solúvel liberado no meio de cultura foram acompanhadas pela diminuição do pH do meio. Estas observações corroboram resultados anteriores que mostram que a solubilização do fosfato inorgânico insolúvel é acompanhada pela redução do pH (CHEN et al., 2006; LIN et al., 2006; MARRA et al., 2011; PARK et al., 2010; TAO et al., 2008).

A correlação inversa entre os valores de pH na cultura e concentração de P-liberado indicam que a produção dos ácidos orgânicos 2-cetoglucônico e oxálico pelas estirpes de *B. fungorum*, *Burkholderia.sp.* e *B.cepacia* desempenham o papel principal da solubilização do fosfato insolúvel.

Entre 13 tipos de ácidos orgânicos estudados, *B. cepacia* (CC-A174) produziu somente os ácidos glucônico e o 2-cetoglucônico, sendo o primeiro produzido em maior quantidade (LIN et al., 2006). O ácido glucônico foi relatado como principal ácido produzido e envolvido na solubilização de fosfato de cálcio por *B. cepacia* (estirpe DA3) (SONG et al., 2008). No entanto, este ácido foi o único estudado pelos autores. Em nossos resultados não houve produção do ácido glucônico por *B. cepacia* (LMG 1222), mas a produção do 2-cetoglucônico foi confirmada para esta espécie e para *Burkholderia fugorum*. Assim, pode-se verificar que o ácido orgânico produzido pelas estirpes e responsável pela solubilização pode variar entre espécies e até mesmo entre estirpes de uma mesma espécie. O potencial de solubilização pela estirpe de *B. vietnamiensis* M6 pode ser aumentado pela produção simultânea de ácido glucônico e 2 cetoglucônico (PARK et al., 2010).

Apesar de as condições axênicas (vaso Leonard) não mostrarem a eficiência das estirpes em solubilizar o fosfato de cálcio (P-Ca) em feijoeiro-comum e milho, isso não impediu que as estirpes de *Burkholderia* (UFLA 04-155 e UFLA 04-21) promovessem o crescimento do feijoeiro-comum. A estirpe

UFLA 04-155 de *B. fugorum*, já é relatada por sua habilidade em estimular o crescimento do feijoeiro-comum, principalmente por meio do incremento na absorção de fósforo para a planta (OLIVEIRA, 2009). Em condições de P-solúvel, a estirpe de *B. cepacia* (SAOCV2) promove o crescimento do feijoeiro-comum pela mobilização de P na planta, com melhoria na absorção de outros nutrientes (PEIX et al., 2001b).

De modo geral, nessas condições as estirpes mostraram maior potencial para a promoção de crescimento nas plantas de feijoeiro-comum do que nas plantas de milho. Isso pode ser identificado pelos melhores resultados na absorção de K, Mg, S, Cu, Mn e Zn encontrado no feijoeiro. Enquanto que o milho só ocorreu melhoras na absorção de K, S e Zn. O teor inadequado de micronutrientes nas culturas, que é limitante ao seu crescimento, e que pode passar despercebido, não só tem efeito direto sobre o desenvolvimento da cultura, mas também reduz a eficiência de uso dos fertilizantes contendo macronutrientes (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

Já em vasos com solo, os efeitos positivos na produção de matéria seca da parte aérea das duas estirpes (UFLA 04-155 e UFLA 04-21) que promoveram o crescimento do feijoeiro-comum não sobressaíram. No entanto, para o milho, efeitos positivos na solubilização do fosfato natural de Araxá foram observados para essas duas estirpes e pela UFLA 04-233 em vasos com solo, aumentando o conteúdo de P em 72,18, 124,25 e 98,5 %, respectivamente, em relação ao conteúdo de P da planta, refletindo aumento de 58,9, 109 e 74 % na matéria seca da parte aérea em relação à planta que recebeu somente o fosfato natural de Araxá. Laherurte e Berthelin (1988) observaram que o desenvolvimento das plantas de milho não foi estimulado pela inoculação com bactérias solubilizadora de fosfato em meio deficiente de fósforo e nem em presença de fosfato de rocha. Isso pode ser explicado pela influência do ambiente na composição dos exsudados radiculares produzidos tanto pela planta, quanto

pelas bactérias que, em geral, está relacionado com a disponibilidade de nutrientes para absorção pelas plantas, especialmente o P (GRIERSON, 1992).

## 5 CONCLUSÕES

Estirpes de *Burkholderia fungorum* (UFLA 04-155, UFLA 04-233) e *Burkholderia* sp. (UFLA 04-21) promovem o crescimento do milho quando cultivadas em solo pela solubilização de fosfato de cálcio insolúvel, destacando-se a UFLA 04-21 como maior potencial para promoção do crescimento em milho.

O ácido 2 cetoglucônico provavelmente é o responsável pela solubilização do fosfato de cálcio inorgânico insolúvel das três estirpes.

As estirpes não são eficientes em promoverem o crescimento do feijoeiro-comum pela solubilização de fosfato de cálcio insolúvel.

## REFERÊNCIAS

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**, The Hague, v. 287, n. 1, p. 51-58, 2006.

CHABOT, R. et al. Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. **Soil Biology**, Elmsford, v. 30, n. 12, p. 1615-1618, Dec. 1998.

\_\_\_\_\_. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*. **Applied Environment Microbiology**, Washington, v. 62, n. 8, p. 2767-2772, Aug. 1996.

CHEN, Y. P. et al. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalciumphosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 34, n. 1, p. 33-41, Mar. 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: EMBRAPA Produção de Informação; Rio de Janeiro: EMBRAPA Solos, 2006. 306 p.

FERNÁNDEZ, L. A. et al. Phosphate-solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 43, n. 6, p. 805-809, Aug. 2007.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa de análises estatísticas e ensino. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 36-41, 2008.

FERREIRA, P. A. A. et al. Efficient nitrogen-fixing *Rhizobium* strains isolated from amazonian soils are highly tolerant to acidity and aluminium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, 2012. In press.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology**. New York: McGraw-Hill, 1928. 143 p.

FREITAS, J. R. de; BANERJEE, M. R.; GERMIDA, J. J. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 24, n. 4, p. 358-364, May 1997.

GRIERSON, P. F. Organic aids in the rhizosphere of *Banksia integrifolia* L.f. **Plant and Soil**, The Hague, v. 144, n. 2, p. 259-265, Aug. 1992.

HARIPRASAD, P.; NIRANJANA, S. R. Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. **Plant and Soil**, The Hague, v. 316, n. 1, p. 13-24, 2009.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agriculture Experimental Station, 1950. 32 p.

HWANGBO, H. et al. 2-Ketogluconic acid production and phosphate solubilizing by *Enterobacter intermedius*. **Current Microbiology**, New York, v. 47, n. 1, p. 87-92, Feb. 2003.

ILLMER, P.; SCHINNER, F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 24, n. 4, p. 389-395, Apr. 1992.

KPOMBLEKOU, A. K.; TABATABAI, M. A. Effect of low-molecular weight organic acids on phosphorus release and phytoavailability of phosphorus in phosphate rocks added to soils. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 100, n. 2/3, p. 275-284, Dec. 2003.

\_\_\_\_\_. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rock. **Soil Science**, Baltimore, v. 158, n. 6, p. 442-453, Dec. 1994.

LAHEURTE, F.; BERTHELIN, J. Effect of a phosphate solubilizing bacteria on maize growth and root exudation over four levels of labile phosphorus. **Plant and Soil**, The Hague, v. 105, n. 1, p. 11-17, 1988.

LIMA, A. S. et al. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macropodium atropurpureum*). **Plant and Soil**, The Hague, v. 319, n. 1, p. 127-145, 2009.

LIN, T. F. et al. The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 7, p. 957-960, May 2006.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319 p.

MARRA, L. M. et al. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 5, p. 603-609, Sept./Oct. 2011.

MEHLICH, A. Mehlich 3 soil test extractant: a modification of Mehlich 2 extractant. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 15, n. 12, p. 1409-1416, Dec. 1984.

\_\_\_\_\_. New extractant for soil test evaluation of phosphorus, potassium, magnesium, calcium, sodium, manganese and zinc. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 9, n. 2, p. 477-492, 1978.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A. Modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 27, p. 31-36, 1962.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 170, n. 1, p. 265-270, Jan. 1999.

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

OLIVEIRA, S. M. de. **Processos promotores de crescimento vegetal por bactérias diazotróficas de vida livre ou simbióticas de feijão comum, caupi e siratro**. 2009. 66 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

PARK, K. H. et al. Rapid solubilization of insoluble phosphate by a novel environmental stress-tolerant *Burkholderia vietnamiensis* M6 isolated from ginseng rhizospheric soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 86, n. 3, p. 947-955, Apr. 2010.

PEIX, A. et al. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 33, n. 1, p. 103-110, Jan. 2001a.

\_\_\_\_\_. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 33, n. 14, p. 1927-1935, Nov. 2001b.

RAMALHO, M. A. P. et al. **O 'Talismã' de sua lavoura de feijoeiro**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2002. 4 p. (EMBRAPA Arroz e Feijão. Comunicado Técnico, 36).

REYES, I. et al. Effect of nitrogen source on solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Pencillium rugulosum* and twoUV-induced mutants. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 28, n. 3, p. 281-290, Mar. 1999.

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. H. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa, MG: CFSEMG, 1999. 359 p.

RICHA, G.; KHOSLA, B.; REDDY, M. S. Improvement of maize plant growth by phosphate solubilizing fungi in rock phosphate amended soils. **World Journal of Agricultural Sciences**, Oxford, v. 3, n. 4, p. 481-484, 2007.

RIVAS, R. et al. Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different Spanish soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 287, n. 1, p. 23-33, 2006.

RODRÍGUEZ, H. et al. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 91, n. 11, p. 552-555, Nov. 2004.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, New York, v. 17, n. 4/5, p. 319-339, Oct. 1999.

SONG, O. R. et al. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 151-156, Feb. 2008.

TAN, K. H. **Principles of soil chemistry**. New York: M. Dekker, 1993. 362 p.

TAO, G. C. et al. Phosphate-solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. **Pedosphere**, Bethesda, v. 18, n. 4, p. 515-523, Aug. 2008.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164 p. (International Biological Programme Handbook, 15).

YI, Y.; HUANG, W.; GE, H. Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. **World Journal Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 7, p. 1059-1065, July 2008.