



**LEANDRO MARCIANO MARRA**

**SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS POR  
BACTÉRIAS E SUA CONTRIBUIÇÃO NO  
CRESCIMENTO DE LEGUMINOSAS E  
GRAMÍNEAS**

**LAVRAS – MG  
2012**

**LEANDRO MARCIANO MARRA**

**SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS POR BACTÉRIAS E SUA  
CONTRIBUIÇÃO NO CRESCIMENTO DE LEGUMINOSAS E  
GRAMÍNEAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, área de concentração Microbiologia e Bioquímica do Solo, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Fatima Maria de Souza Moreira

**LAVRAS- MG  
2012**

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

Marra, Leandro Marciano.

Solubilização de fosfatos por bactérias e sua contribuição no crescimento de leguminosas e gramíneas / Leandro Marciano Marra.  
– Lavras : UFLA, 2012.

141 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Fatima Maria de Souza Moreira.

Bibliografia.

1. *Acinetobacter*. 2. *Rhizobium*. 3. *Zea mays*. 4. *Phaseolus vulgaris*. 5. *Brachiaria decumbens*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.85

**LEANDRO MARCIANO MARRA**

**SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS POR BACTÉRIAS E SUA  
CONTRIBUIÇÃO NO CRESCIMENTO DE LEGUMINOSAS E  
GRAMÍNEAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, área de concentração Microbiologia e Bioquímica do Solo, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 17 de fevereiro de 2012.

Dr. Fábio Lopes Olivares	UENF
Dr. Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares	UFSC
Dra. Adelir Aparecida Saczk	UFLA
Dr. José Maria de Lima	UFLA

Dra. Fatima Maria de Souza Moreira  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2012**

Aos meus pais, Marilene Marciana e Waldemar Marra,  
por me permitir sonhar.

## **OFEREÇO**

às minhas irmãs,

Cyntia Marciana Marra  
Glasiely Marciana Marra

às minhas sobrinhas,

Eduarda e Marinelly

aos meus sobrinhos,

Pedro Gabriel e João Vitor

à minha noiva e futura esposa,

Lindayane C. Chaves

## **DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Quem ama a correção ama o saber; quem detesta a correção torna-se imbecil

(Provérbios 12,1)

Nunca se afaste de seus sonhos, pois se eles forem você continuará vivendo, mas deixará de existir (Charles Chaplin).

A Deus, pela existência, por ser amparo, por ser amigo, por ser misericordioso, por ser luz na escuridão, por me conceder força, inteligência, saúde, paz e momentos de alegria, pela Família, enfim, por estar sempre ao meu lado, principalmente nos momentos mais difíceis. Obrigado!

À minha Família, alicerce profundo na minha vida.

Aos meus tios, primos e amigos, pelo apoio, pelas conversas, pelos conselhos, pela amizade, pelo respeito, pela confiança: Miguel, Roberto, Luciano, Maria Ângela, Rosilene, José Teixeira, Romualdo, Onice, Olinda, Sônia, Fahime, Ernani, Sabino, Maria Inês, Miguelzinho, Zulma, Cristina, Madalena, Zé Bonifácio, Ângelo, Vera, João, Ângela (*in memorian*), Abel, Suely, Rosaly, Davi, Rosângela, Hélia, Ney, Nelinha, Nhõ, Helinho, Neuza, Orozimbo, Luciene, Marrinha, Marilene, Maria, Ladinha, Zé (*in memorian*), Valder, Lúcia, Narciso, Maria Luíza, Christian, Paulinho (Vidraceiro), Eloísio, Rúbens, Renato, Débora, Dona Íria e em especial a meus avós (*in memoriam*) Waldemar e Cândida, Vicente e Geni.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência do Solo, pela oportunidade e por acreditarem na minha capacidade.

À CAPES e à Fapemig, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares, pela amizade.

À Professora Fatima Maria de Souza Moreira, pela oportunidade, confiança, disponibilidade, colaboração, orientação e pelo exemplo de competência.

Aos Professores Dr. Fábio Lopes Olivares, Dr. José Maria de Lima e Dra. Adelir Aparecida Saczk, pela participação na banca e pelas sugestões que muito contribuíram para a melhoria do trabalho.

Aos amigos, Manoel, Eliane, Fabiana, Dirce e Mira pela disposição, auxílio e convivência durante estes anos.

Conviver para conhecer, conhecer para confiar, confiar para juntos construir..., é assim que quero agradecer aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo, em especial à (ao) Amanda, Ana Luíza, Bruno, Cândido,

Cleide, Fernanda, Jessé, Karina, Maíra, Márcia, Marco, Marlene, Maurício, Paula, Paulo, Pedro, Plínio, Rogério, Sílvia, Teotônio e Wesley.

A todos os amigos do Departamento de Ciência do Solo e da UFLA.

Aos amigos e primos de “longe”: Hernane, Julliane, Inara, Sara, Olívia, Halker, Diogo, Elison, Elaine, Dayane, Fábio, Riala, Luizão, Thiago, Lucas, Rafael, Cristiano, Cássia, Flávio, Vanessa, Welington, Wesley, Wilton, Sabrina, Stanley que mesmo distantes, estão sempre dando aquele apoio.

Ao primo-irmão de república, José Augusto, obrigado pela convivência.

À Lindayane, minha querida noiva, “flor de jabuticaba”, pela paciência, compreensão, amor, confiança e companheirismo. Te amo.

A todos que, embora não citados, contribuíram para o sucesso desse trabalho.

Mais uma vez sou eternamente, Grato!

## RESUMO

Os objetivos desse trabalho foram avaliar se a produção de ácidos orgânicos está envolvida com a solubilização de fosfatos por bactérias em meio de cultura NBRIP com diferentes fontes de carbono e com diferentes valores iniciais de pH, além de verificar a contribuição destas no crescimento de leguminosas e gramíneas. As estirpes utilizadas foram a UFLA 03-08, UFLA 03-09, UFLA 03-10, UFLA 03-106 e UFLA 03-116 isoladas de nódulos de feijão caupi. Testou-se quatro fontes de carbono, separadamente, em meio NBRIP sólido e líquido com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  e também com  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Os valores iniciais do pH foram: 5,0; 6,0 e 7,0. Os experimentos foram avaliados de forma independente. Também se avaliou a produção de ácidos orgânicos. Para os experimentos *in vivo*, em condições estéreis, os tratamentos consistiram da inoculação das cinco estirpes, separadamente, em vasos Leonard contendo, na parte superior, 0,25 g de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  e quatro controles, sem inoculação, três com as seguintes concentrações de fósforo solúvel: 0,75; 7,5 e 15,0 mg de P L<sup>-1</sup>, e um, sem inoculação mas com 0,25 g de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Já em condições não estéreis, os tratamentos consistiram da inoculação das mesmas estirpes, separadamente, em vasos com solo (2 dm<sup>3</sup>) contendo 6,0 g de fosfato natural de Araxá; um controle com o fosfato natural de Araxá sem inoculação; dois controles contendo 150,0 e 300,0 mg de fósforo solúvel vaso<sup>-1</sup> aplicado na forma do adubo super triplo; e um controle sem a adição de fósforo solúvel, sem adição de fosfato natural de Araxá e sem inoculação. As estirpes UFLA 03-08, UFLA 03-10 e UFLA 03-106 solubilizaram  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , no meio líquido, independentemente da fonte de carbono. Porém, houve diferenças na quantidade solubilizada, sendo os maiores valores de fósforo solúvel, encontrados na presença de glicose seguida de manitol, depois lactose e celulose. Nenhuma das estirpes produziu ácidos no meio com celulose. Não houve solubilização do  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . As estirpes UFLA 03-08, UFLA 03-09, UFLA 03-10 e UFLA 03-106 solubilizaram  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , no meio líquido, independentemente do valor inicial do pH, sem, no entanto, haver diferenças significativas entre os tratamentos. Para essas estirpes, foi verificada a produção de ácidos orgânicos, também para todos os valores iniciais de pH, mas apresentando diferenças significativas entre os tratamentos. A estirpe UFLA 03-116 foi a única a não produzir ácidos orgânicos em nenhuma das condições de cultivo. Os resultados demonstram variação na contribuição do crescimento das plantas via solubilização de fosfato quando analisadas em condições estéreis e não estéreis, mas ficou evidente a contribuição na promoção do crescimento de leguminosas e gramíneas por meio da melhoria da nutrição fosfatada, nitrogenada e em alguns casos melhorou a nutrição de diversos nutrientes.

Palavras chaves: *Acinetobacter*. *Rhizobium*. *Zea may.*, *Phaseolus vulgaris*. *Brachiaria decumbens*. *Vigna unguiculata*.



## ABSTRACT

The objectives of this study were to evaluate if the organic acids production is involved in phosphate solubilization by bacteria in culture medium NBRIP with different carbon sources and with different initial values of pH, further to identify their contribution in the growth of legumes and grasses. The strains used were UFLA 03-08, UFLA 03-09, UFLA 03-10, UFLA 03-106 and UFLA 03-116 isolated from nodules of cowpea. Four carbon sources were tested, separately, in midst NBRIP solid and liquid with  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  and also with  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . The initial pH values were: 5.0, 6.0 and 7.0. The experiments were evaluated independently. The organic acids production also was evaluated. For *in vivo* experiments, in sterile conditions, the inoculation treatments consisted of five strains, separately, in pots Leonard containing at the top, 0.25g of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  and four controls, without inoculation, three following concentrations of soluble phosphorus: 0.75, 7.5 and 15.0mg of  $\text{P L}^{-1}$ , and one, without inoculation, but with 0.25g of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Already in non-sterile conditions, the inoculation treatments consisted of the same strains, separately, in pots containing soil ( $2 \text{ dm}^{-3}$ ) 6.0 g of natural phosphate Araxá; a control with a natural phosphate Araxá without inoculation; two controls containing 150.0 and 300.0 mg of soluble phosphorus  $\text{pot}^{-1}$  applied as the fertilizer triple super; and a control without the soluble phosphorus addition, without the addition of natural phosphate Araxá and without inoculation. Strains UFLA 03-08, UFLA 03-10 and UFLA 03-106 solubilized  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , in liquid medium, independently of the carbon source. However, there was difference in the amount solubilized, being the highest values of soluble phosphorus, found in the glucose presence followed by mannitol, after lactose and cellulose. None of the strains produced acid in medium with cellulose. There was not solubilization of  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Strains UFLA 03-08, UFLA 03-09, UFLA 03-10 and UFLA 03-106 solubilized  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , in the liquid medium, independently the initial value of pH, without, however, significant differences between treatments. For these strains was observed the organic acids production, also for all initial values of pH, but presenting significant differences between treatments. Strain UFLA 03-116 was the only one not produce organic acids in any of the cultivation conditions. The results show variation in the growth contribution of plants through phosphate solubilization when analyzed in sterile and non-sterile conditions, but it was evident the contribution in promoting the growth of legumes and grasses through improved phosphorus nutrition, nitrogen and in some cases improved nutrition of various nutrients.

Keywords: *Acinetobacter*. *Rhizobium*. *Zea may*. *Phaseolus vulgaris*. *Brachiaria decumbens*. *Vigna unguiculata*.

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE.....</b>	<b>10</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Fósforo no solo e microrganismos solubilizadores de fosfatos.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Mecanismos de solubilização de fosfatos.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3 Promoção do crescimento de plantas por microrganismos solubilizadores de fosfatos.....</b>	<b>21</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>25</b>
<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGO(S).....</b>	<b>35</b>
<b>ARTIGO 1 Sources of carbon and the production of organic acids in phosphate solubilization.....</b>	<b>35</b>
<b>ARTIGO 2 Effect of initial pH of culture medium on production of organic acids and calcium phosphate solubilization.....</b>	<b>61</b>
<b>ARTIGO 3 Bactérias solubilizadoras de fosfatos na contribuição do crescimento de leguminosas e gramíneas.....</b>	<b>83</b>

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1 INTRODUÇÃO**

O fósforo é um elemento que desempenha importantes funções metabólicas nas plantas, limitando o crescimento vegetal em solos onde é baixa sua disponibilidade, como é o caso dos solos tropicais.

A interação do fósforo com os constituintes do solo, como o cálcio, o alumínio e o ferro e sua lenta taxa de difusão na solução do solo, o tornam o nutriente menos prontamente disponível às plantas em solos tropicais e subtropicais. A retenção do fósforo adicionado ao solo, em formas lábeis ou não, ocorre tanto pela precipitação deste em solução com formas iônicas de cálcio, ferro e alumínio como, principalmente, pela sua adsorção à superfície de óxidos, hidróxidos e oxi-hidróxidos de ferro e alumínio, presentes, em maiores quantidades em solos mais intemperizados (NOVAIS; SMITH, 1999), dando origem aos fosfatos inorgânicos insolúveis. Essa transformação diminui a disponibilidade desse nutriente para as plantas e reduz a eficácia do adubo. Com isso há a necessidade da aplicação de quantidades crescentes de fertilizantes fosfatados para sustentar a produção agrícola. Portanto, apesar de muitos solos possuírem uma elevada quantidade de fósforo total, atingindo cerca de 0,05% do conteúdo no solo, apenas 0,1% desse fósforo está prontamente disponível para as plantas (ZOU; BINKLEY; DOXTADER, 1992).

Os microrganismos desempenham funções primordiais no aumento da disponibilidade do fósforo do solo para as plantas, por meio de mecanismos que afetam a estrutura, a química, a bioquímica e a fisiologia do ambiente radicular. Dentre esses mecanismos, destaca-se a capacidade de solubilizar fontes de fosfatos inorgânicos insolúveis, aumentando o conteúdo de fósforo solúvel na solução do solo e, conseqüentemente, a disponibilidade para as plantas,

desempenhando, assim, papel fundamental no ciclo biogeoquímico do fósforo em ecossistemas naturais e agrícolas. Diferentes grupos de microrganismos desempenham esta função, sendo representados por bactérias, fungos e actinobactérias, entre eles têm-se os gêneros: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Mesorhizobium*, *Paenibacillus*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia marcescens*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Micromonospora* como os que têm se destacado na solubilização de fosfatos (HALDER et al., 1990, RODRIGUEZ; FRAGA, 1999; PEIX et al., 2001; ALIKHANI; SALEH-RASTIN; ANTOUN, 2006; RICHA; KHOSLA; REDDY, 2007; EL-TARABILY et al., 2008; HAMEEDA et al., 2008; FARHAT et al., 2009; MARRA et al., 2011; MARRA et al., 2012; ZENG et al., 2012).

Os microrganismos utilizam-se de mecanismos como a produção e liberação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular (SPERBER, 1958; MARRA et al., 2012), que solubilizam formas precipitadas de fósforo, como os fosfatos de ferro e alumínio nos solos ácidos e os fosfatos de cálcio em solos alcalinos, atuando como fontes de prótons ou na quelação do elemento acompanhante do íon fosfato. Destacam-se, entre a grande variedade de ácidos orgânicos produzidos, os ácidos butírico, cítrico, glucônico, 2-cetoglucônico, fumárico, láctico, málico, maléico, malônico, oxálico, propiônico, succínico e tartárico. Entretanto, outros mecanismos como a extrusão de prótons via respiração celular e absorção de amônio como fonte de nitrogênio (ILLMER; SCHINNER, 1992), além da produção de exopolissacarídeos (YI; HUANG; GE, 2008) e de sideróforos (HAMDALI et al., 2008) também são relatados.

Alguns trabalhos têm demonstrado que a inoculação de *Rhizobium* promove a solubilização de fosfatos do solo aumentando a produção de espécies não leguminosas como milho e alface (CHABOT; ANTOUN; CECAS, 1993; CHABOT et al., 1996); outros têm demonstrado a contribuição na inoculação de

bactérias do gênero *Acinetobacter* no crescimento de repolho, pepino, margarida, cevada, trigo e grão-de-bico (KANG et al., 2009; PEIX et al., 2009; OGUT; ER; KANDEMIR, 2010).

Dessa forma, os objetivos desse trabalho foram avaliar se a produção de ácidos orgânicos por bactérias está envolvida com a solubilização de fosfatos e verificar a contribuição dessas no crescimento de leguminosas e gramíneas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Fósforo no solo e microrganismos solubilizadores de fosfatos

O Brasil possui a maior área de terras agricultáveis do mundo. No entanto, essas terras são geralmente solos de baixa fertilidade que requerem a aplicação de grandes quantidades de corretivos e fertilizantes, destacando-se os fosfatados. As culturas apresentam excelentes respostas a fósforo, que se tornou um insumo essencial para o agronegócio brasileiro, especialmente na região do cerrado, onde mais de 90% dos solos apresentam extrema deficiência, com menos de 2 mg de fósforo  $\text{kg}^{-1}$  de solo extraído por Mehlich-1 (LOPES, 1989). A demanda brasileira por este recurso é muito expressiva e crescente e tem sido atendida em sua grande maioria empregando-se matéria prima importada. Portanto, o fósforo é um recurso estratégico para o País, pois sem este a produção agrícola é limitada.

A proporção entre fósforo de formas orgânicas e inorgânicas varia com o teor de matéria orgânica dos solos, sendo a maior parte das formas inorgânicas sais do ácido ortofosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Nem todas as espécies de fosfatos são comuns na faixa normal do pH dos solos. O ácido indissociado ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) só predomina em meios muito ácidos ( $\text{pH} < 2,15$ ), ao passo que o ânion trivalente ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) só aparece em valores de pH muito altos ( $\text{pH} > 12,3$ ). As espécies mono e divalentes são que predominam nos ambientes naturais, com valores de pH fora dos extremos (TAN, 1993; MELLO; PEREZ, 2009).

A maior parte do fósforo aplicado ao solo fica retida (precipitada ou adsorvida) em suas partículas, acumulando-se, com o tempo, na forma de fosfato inorgânico insolúvel. Essa forma é bastante estável e pode ser determinada por fracionamento químico (CHANG; JACKSON, 1957), que tem mostrado predominância de fosfato de ferro, seguida do fosfato de alumínio e do fosfato

de cálcio, para a maioria dos solos. O mineral goethita, seguido de hematita, da caulinita e da gibbsita contribuem com a adsorção de fósforo na ordem de 8060  $\mu\text{g g}^{-1}$ , 5613  $\mu\text{g g}^{-1}$ , 728  $\mu\text{g g}^{-1}$  e 534  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente (RESENDE; CURI; SANTANA, 1988). Estas formas são muito estáveis e de baixa reversibilidade, não sendo aproveitáveis pelas plantas. Além disso, a solubilidade destas formas diminui com suas respectivas idades (RAIJ, 2004). A quantidade de fósforo em diferentes frações em solos brasileiros cultivados por mais de 10 anos aumenta em média 2,8 vezes para fosfato de alumínio, 2,3 vezes para fosfato de ferro e praticamente sem alteração para fosfato de cálcio, como verificado por Motta et al., (2002).

Devido à sua dinâmica no solo, o fósforo é, dentre os nutrientes para as plantas, o mais limitante nos solos tropicais e sub-tropicais (RAIJ, 1991; NOVAIS et al., 2007). Por outro lado, Goldstein et al. (1993) estimam que a quantidade de fósforo acumulada nos solos agrícolas seria suficiente para sustentar a produção agrícola mundial por cerca de 100 anos sem a adição do fósforo extra, se o fósforo já aplicado e retido pudesse ser aproveitado pelas culturas.

Vários grupos importantes da comunidade microbiana edáfica ou da rizosfera são capazes de solubilizar fosfatos inorgânicos insolúveis, por meio de mecanismos diversos (GERRETSEN, 1948; SPERBER, 1957, 1958; ALEXANDER, 1961; SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982; NAHAS; ASSIS, 1992; RASHID et al., 2004; EL-TARABILY et al., 2008; MARRA et al., 2011). Isso torna a solubilização de diferentes fontes de fósforo inorgânicos insolúveis (hidroxiapatita, fluorapatita, variscita, strengita, etc) em uma das principais alternativas sustentáveis para aumentar a disponibilidade deste nutriente às plantas (CHABOT; ANTOUN; CECAS, 1993; CHABOT et al., 1996, 1998; KIM et al., 1998; RICHA; KHOSLA; REDDY, 2007; HAMEEDA et al., 2008;

PEIX et al., 2009; GULATI et al., 2010; OGUT; ER; NEUMANN, 2011; ZENG et al., 2012).

A comunidade microbiana do solo é extremamente abundante na rizosfera, onde sua atividade bioquímica pode aumentar sensivelmente a absorção de fósforo pelas plantas (ALEXANDER, 1961). Gerretsen (1948) conseguiu demonstrar que a atividade microbiana na rizosfera dissolveu o  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$  e fosfato natural de Marrocos e promoveu melhor nutrição fosfatada de centeio (*Secale cereale* L.), aveia (*Avena sativa* L.), mostarda (*Sinapis alba*) e girassol (*Helianthus annuus* L.).

Essa capacidade solubilizadora existe também entre os fitossimbiontes, como rizóbio (*Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, e *Sinorhizobium*) e fungos micorrízicos (ecto e endomicorrízicos) (HALDER et al., 1990; SURANGE; KUMAR, 1993; SESHADRI et al., 2000; PEIX et al., 2001; RODRIGUEZ et al., 2004; SIQUEIRA; ANDRADE; FAQUIN, 2004; ALIKHANI; SALEH-RASTIN; ANTOUN, 2006; DAIMON et al., 2006; RIVAS et al., 2006; SRIDEVI; MALLAIAH; YADAV, 2007; MARRA et al., 2011), destacando-se os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Penicillium* e *Aspergillus* como os de maiores capacidade solubilizadora de fosfatos inorgânicos insolúveis (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999). Também tem sido relatada a solubilização por leveduras (NARSIAN et al., 2010) e actinobactérias (EL-TARABILY et al., 2008). Assim, microrganismos com capacidade de solubilizar diferentes formas de fosfatos têm potencial para aumentar o aproveitamento do fósforo presente na fase sólida do solo, constituindo-se em alternativa viável para inoculação de plantas.



## 2.2 Mecanismos de solubilização de fosfatos

A capacidade dos microrganismos em solubilizar fosfatos inorgânicos insolúveis tem sido atribuída à redução do pH ao seu redor. Segundo Stumm e Morgan (1995) e Whitelaw (2000) o abaixamento do pH promove maior solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis tais como  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ ,  $\text{AlPO}_4$  e  $\text{FePO}_4$ .

Apesar de alguns autores (HALDER et al., 1990; HWANGBO et al., 2003; CHUANG et al., 2007) demonstrarem que a quantidade de fósforo solubilizada por diferentes microrganismos foi relacionada à produção de ácidos orgânicos no meio de cultura, para Illmer e Schinner, (1992) não existe uma correlação linear e positiva neste processo.

Neste contexto, este trabalho descreve alguns mecanismos de solubilização: a) o primeiro que será abordado é a produção de ácidos orgânicos (SPERBER, 1957, 1958; DUFF; WEBLEY, 1959; TAHA et al., 1969; HALDER et al., 1990; CUNNINGHAM; KUIACK, 1992; HARIPRASAD; NIRANJANA, 2009), o qual é, frequentemente, o mais citado e estudado pelos pesquisadores.

Para este mecanismo, as fontes de fosfatos inorgânicos insolúveis são solubilizadas pelos microrganismos considerados solubilizadores por meio da produção de ácidos orgânicos que tanto podem diminuir o valor do pH quanto atuar como agentes quelantes dos elementos acompanhantes do íon fosfato (Ca, Al e Fe) (BOLAN et al., 1994; NAHAS, 1999; LIN et al., 2006). Assim, a oxidação da glicose a ácido glucônico, por meio da enzima glicose desidrogenase, que por ação da enzima ácido glucônico desidrogenase é oxidada a ácido 2-cetoglucônico, resulta na acidificação da região ao redor da célula, constituindo-se em mecanismo eficiente de solubilização de fosfatos para algumas bactérias Gram negativas (KPOMBLEKOU-A; TABATABAI, 1994;

BABU-KHAN et al., 1995; RODRIGUEZ; FRAGA, 1999; SONG et al., 2008). Os prótons ( $H^+$ ) liberados na oxidação do ácido glucônico, elevando a concentração de  $H^+$  em solução, é um dos fatores mais importantes na solubilização de fosfatos por *Burkholderia cepacia* (LIN et al., 2006). Portanto, a solubilização de fosfatos por meio da oxidação dos ácidos orgânicos, e consequente diminuição do pH, requer um suprimento adequado de  $H^+$ .

Vários ácidos orgânicos são produzidos por microrganismos solubilizadores de fosfatos (Tabela 1). O ácido 2-cetoglucônico foi identificado em estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv *viceae*, que apresentaram capacidade de solubilização entre 47 e 52% de fosfato de rocha em meio de cultura extrato de levedura glicose, após três dias de incubação (HALDER et al., 1990). Isolados de rizóbio, após 15 dias de incubação em meio Sperber (1958) apresentaram capacidade de solubilização de  $Ca_3(PO_4)_2$ , na ordem de 39,4% (*R. leguminosarum* bv *viceae*), de 22,5% (*Sinorhizobium meliloti*), de 20,4% (*Mesorhizobium ciceri* e *M. mediterraneum*) e de 17,7% (*R. leguminosarum* bv *phaseoli*), todos apresentando diminuição de pH (ALIKHANI; SALEH-RASTIN; ANTOUN, 2006). Os ácidos glucônico, isovalérico, oxálico e butírico foram identificados em *Acinetobacter* sp., que apresentaram capacidade de solubilização de fosfato tricálcio e  $Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6$  em meio de cultura (PUENTE et al., 2009; OGUT; ER; KANDEMIR, 2010).

Tabela 1 Ácidos orgânicos produzidos por microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF)

MSF	Ácidos Orgânicos <sup>(1)</sup>	Referência
<i>Acinetobacter</i> sp.	G + O + B	PUENTE et al. (2009)
<i>Aspergillus niger</i>	O + C + G + Gl + S	SPERBER (1958)
<i>Aspergillus</i> sp.	G + M + O + C	CHUANG et al. (2007)
<i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Azospirillum lipoferum</i>	G	RODRIGUEZ et al. (2004)
<i>Azotobacter</i> sp.	O + G + S + T + F + L	YI; HUANG; GE (2008)
<i>Bacillus megaterium</i>	L + Mal	TAHA et al. (1969)
<i>Bacillus atrophaeus</i>	Ib + P + S	VAZQUEZ et al. (2000)
<i>Burkholderia cepacia</i>	G + 2KTG	LIN et al. (2006) e SONG et al. (2008)
<i>Enterobacter intermedium</i>	G + 2KTG	KIM et al. (2003)
<i>Citrobacter</i> sp.	G + A	PATEL et al. (2008)
<i>Enterobacter intermedium</i>	G + 2KTG	HWANGBO et al. (2003)
<i>Fusarium oxysporum</i>	L + Mal + M + S + T + C	AKINTOKUN et al. (2007)
<i>Paenibacillus kribbensis</i>	G + O + P	MARRA et al. (2012)
<i>Penicillium</i> sp.	L + Gl	SPERBER (1958)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	G	BABU-KHAN et al. (1995)
<i>Pseudomonas corrugata</i>	2 KTG	TRIVEDI & SA (2008)
<i>Pseudomonas</i> sp.	C + G	TAHA et al. (1969)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	2 KTG	HALDER et al. (1990)
<i>Serratia marcescens</i>	G + C + S + L	FARHAT et al. (2007)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	G	XIÃO et al. (2009)

<sup>(1)</sup> A = acético, C = cítrico, 2KTG = 2-cetoglucônico, F = fumárico, Gl = glicólico, G = glucônico, Ib = isobutírico, L = láctico, Mal = maléico, M = málico, O = oxálico, P = propiônico, S = succínico, T = tartárico, B = butírico

A quelação pelos ácidos orgânicos ocorre pela via oxigenada, contendo grupos hidroxílicos e carboxílicos (WHITELAW, 2000). Esta quelação envolve a molécula ligante (ácido orgânico) e o elemento químico acompanhante do íon fosfato, resultando na formação de uma estrutura complexa, sendo que o grau de complexação depende da molécula de ácido orgânico envolvida (número de grupos carboxílicos), da concentração desta e do pH da solução do solo (JONES, 1998). Ácidos orgânicos com apenas um grupo carboxílico (láctico, glucônico, propiônico, fumárico, acético) possuem baixa capacidade de complexação, já os

que têm dois ou mais grupos (málico, oxálico, tartárico, succínico, cítrico) apresentam uma maior capacidade de complexação (KPOMBLEKOU-A; TABATABAI, 2003). A constante de estabilidade do complexo químico envolvido, como demonstrado por Jones (1998), também interfere neste processo, sendo que os ácidos cítrico, málico e oxálico apresentam alta afinidade pelos metais trivalentes  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$ . Johnson e Loeppert (2006), estudando a influência de ácidos orgânicos na solubilização de fósforo ligados a óxidos de ferro, verificaram que os ácidos cítrico e málico foram os mais eficazes.

Além de complexar os cátions ligados ao fosfato, resultando na liberação de fósforo, os grupos carboxílicos também competem pelos sítios de adsorção, diminuindo assim, a fixação do fósforo nas partículas do solo, o que aumenta sua disponibilidade na solução do solo.

A presença de ácido e aumento da sua concentração nem sempre significam aumento de solubilização; isso, certamente, dependerá do fosfato presente na solução e também do ácido presente e sua concentração (MARRA et al., 2012).

b) o segundo mecanismo aqui discutido, está relacionado à extrusão de prótons ( $\text{H}^+$ ), uma vez que a produção de ácidos orgânicos não é o único mecanismo de solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis (ILLMER; SCHINNER, 1992). Estes autores observaram que a solubilização também é dependente dos mecanismos que envolvem o crescimento microbiano e que favorecem a extrusão de  $\text{H}^+$ , resultantes da assimilação de  $\text{NH}_4^+$ , ou pelo mecanismo de translocação do  $\text{H}^+$  pela enzima  $\text{H}^+$ -ATPase no processo de produção de energia pela hidrólise do ATP ( $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{Pi} + \text{H}^+$ ). Essa enzima funciona como uma bomba de  $\text{H}^+$  acionada pela hidrólise de ATP, sendo responsável pelo transporte primário de  $\text{H}^+$  do interior da célula para o apoplasto e, conseqüentemente, pela formação do gradiente de  $\text{H}^+$  gerado através da membrana plasmática (CANELLAS et al., 2006).

Illmer e Schinner (1992), avaliando a solubilização de  $\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3$  por *Pseudomonas* sp. e *Penicillium aurantiogriseum*, observaram que houve solubilização sem, necessariamente, haver produção de ácidos orgânicos. A liberação de  $\text{H}^+$  acompanhada da absorção de  $\text{NH}_4^+$  estaria relacionada com a solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis (ILLMER; BARBATO; SCHINNER, 1995; XIE; KNIGHT; LEGGETT, 2009). Para comprovar este mecanismo, vários trabalhos têm demonstrado que a quantidade de fosfato solubilizado em meio com amônio é maior do que em meio com nitrato (ASEA; KUCEY; STEWART, 1988; NAUTIYAL, 1999; SRIDEVI; MALLAIAH; YADAV, 2007; SHARAN; SHIKHA; DARMWAL, 2008; RELWANI; KRISHNA; REDDY, 2008).

c) o terceiro mecanismo abordado é a produção de exopolissacarídeos (EPS) por microrganismos do solo, os quais são, na maioria das vezes, heteropolissacarídeos (compostos por diferentes tipos de monossacarídeos), exercendo importante função na adaptabilidade destes microrganismos quando submetidas às condições de estresse ambiental (MIGUEL; MOREIRA, 2001; BARBERI et al., 2004; BOMFETI et al., 2010). Uma grande diversidade nas estruturas químicas dos EPS pode ser encontrada de acordo com a composição dos açúcares. Yi; Huang; Ge, (2008) demonstraram que a solubilização de fosfato tricálcico foi influenciada pela origem e concentração do EPS no meio de cultura.

d) um quarto mecanismo pode ser mencionado, que está relacionado com a produção de sideróforos por microrganismos, que são peptídeos de síntese não-ribossômica com altíssima afinidade por ferro. Estes metabólitos são produzidos e secretados sob estresse de ferro para sequestrar este elemento do ambiente, auxiliando no crescimento da planta, pois aumenta a disponibilidade de ferro próximo à raiz (YU et al., 2011) o que pode vir a aumentar a disponibilidade de fósforo. Hamdali et al., (2008) demonstraram que a

solubilização de fosfato natural de Marrocos está relacionada a produção de sideróforos.

Portanto, independentemente do mecanismo utilizado, pode-se presumir que um balanço entre os íons secretados e absorvidos deve prevalecer a fim de adequar o metabolismo interno microbiano a um equilíbrio iônico (NAHAS, 1999).

### **2.3 Promoção do crescimento de plantas por microrganismos solubilizadores de fosfatos**

A inoculação com microrganismos solubilizadores de fosfatos ou o manejo de suas populações tem sido sugerido como forma de diminuir o uso de fertilizantes fosfatados solúveis, mediante um melhor aproveitamento dos fosfatos inorgânicos insolúveis presentes ou adicionados ao solo e aqueles formados pela aplicação de fontes solúveis. Mas no Brasil, a inoculação em larga escala com microrganismos solubilizadores de fosfato ainda não é praticada.

A eficiência da inoculação varia com o tipo de solo, cultivares envolvidas, microrganismos utilizados, fatores ambientais, dentre outros. Entretanto, o conteúdo de fósforo no solo é provavelmente um dos fatores cruciais para determinar a eficácia do produto (NAHAS, 1999). Por sua vez, as espécies vegetais, por meio de efeito rizosférico diferenciado, também influenciam e favorecem as populações de solubilizadores e, assim, estas podem contribuir de maneira mais significativa para a nutrição vegetal (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Segundo Sylvester-Bradley et al. (1982), na rizosfera de gramíneas como *Brachiaria decumbens* e *Hyparrhenia rufa* é encontrada menor incidência de solubilizadores, enquanto nas leguminosas *Zornia* sp. e *Desmodium ovalifolium*, encontraram-se as maiores incidências.

Os isolados de rizóbio, que além da capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, quando em simbiose com espécies da família Leguminosae, também solubilizam fosfatos inorgânicos insolúveis, disponibilizando o fósforo para as plantas, tornam-se, uma alternativa de uso não somente em leguminosas (Rivas et al., 2006), mas também em espécies de outras famílias como, por exemplo, nas Brassicaceae (ANTOUN et al., 1998; ELVIA; ORTEGA-RODÉS; ORTEGA, 2008) e Gramineae (CHABOT; ANTOUN; CECAS, 1993; CHABOT et al., 1996; PEIX et al., 2001; SELVAKUMAR et al., 2008).

Alguns trabalhos têm demonstrado que a inoculação de *Rhizobium* promove a solubilização de fosfatos do solo, aumentando a produção de espécies não leguminosas como milho e alface (CHABOT; ANTOUN; CECAS, 1993; CHABOT et al., 1996). Neste experimento, foi observado que a solubilização parece ser um mecanismo importante para a promoção de crescimento da planta em um solo moderadamente fértil e em outro muito fértil, por causa do aumento da disponibilidade do nutriente. Peix et al. (2001) também demonstraram que estirpes de *Mesorhizobium mediterraneum* favoreceram o crescimento e aumentaram a absorção de nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio e cálcio (Ca) em espécies leguminosas como o grão-de-bico (*Cicer arietinum*) e não leguminosas como a cevada (*Hordeum vulgare*). Em ambos os estudos, as estirpes apresentaram potencial de promoção de crescimento de plantas por meio da solubilização de fosfatos insolúveis, ainda que bactérias desse grupo sejam mais evidenciadas como fixadoras simbióticas de nitrogênio em leguminosas.

Em trabalho comparando a absorção de fósforo pela aveia inoculada em solo esterilizado e não esterilizado, Alexander (1961) demonstrou haver aumento na absorção quando a fonte era  $\text{FePO}_4$ ,  $\text{CaHPO}_4$  e  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , todos na presença do solo não estéril, mostrando assim a capacidade dos microrganismos em disponibilizar fósforo e, conseqüentemente, melhorar sua nutrição fosfatada. A inoculação pode introduzir alterações nas populações do solo que podem

aumentar a disponibilidade de nutrientes e o crescimento e rendimento das plantas. Tanto os microrganismos utilizam o fósforo solubilizado como liberam na solução do solo e este pode ser utilizado na nutrição de plantas.

Estudos realizados com plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas com *Enterobacter aerogenes* também mostraram maior produção de matéria seca de raízes e maior absorção de fósforo e nitrogênio, quando comparado com plantas não inoculadas na presença de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (insolúvel) (COLLAVINO et al., 2010). Estudos com milho, em solo na casa de vegetação, inoculados com *Serratia marcescens* e *Pseudomonas* sp., *Bacillus coagulans*, *Enterobacter asburiae* não mostraram crescimento das plantas em relação ao tratamento sem inoculação, empregando fosfato de rocha; entretanto em condições de campo, 96 dias após a emergência, foi observado contribuição na produção da parte aérea, na produção de grãos e no acúmulo de fósforo e nitrogênio na parte aérea (HAMEEDA et al., 2008).

Por outro lado, Fernández et al., (2007), avaliando a capacidade de promoção do crescimento de soja (*Glycine max* L. Merrill, cv. Nidera) por bactérias solubilizadoras de fosfatos (*Enterobacter* sp.; *Burkholderia* sp.; *Bradyrhizobium* sp.), observaram que estas favoreceram o crescimento da parte aérea, mas não aumentaram o conteúdo de fósforo nas plantas.

Embora o mecanismo pelo qual as bactérias solubilizadoras de fosfatos estimulam o crescimento de plantas ainda não esteja definido, o potencial de uso desses microrganismos como biofertilizantes é indiscutível.

Experimentos para a avaliação da solubilização *in vitro* em condições axênicas não apresentam as características físico-químicas encontradas no solo (condições não axênicas), sugerindo, assim, que a seleção de estirpes eficientes na solubilização de fosfatos deva ser baseada na combinação de experimentos *in vitro*, e principalmente, em casa de vegetação e em condições de campo (*in*



*vivo*), gerando assim resultados mais consistentes com relação à melhoria do estado nutricional das plantas, principalmente em relação ao fósforo.

No entanto, para a maximização do processo de solubilização, ainda há necessidade de melhor conhecimento destes microrganismos e dos mecanismos envolvidos na solubilização para que esse processo seja indicado em escalas maiores.

## REFERÊNCIAS

- AKINTOKUN, A. K.; AKANDE, G. A.; AKINTOKUN, P. O.; POPOOLA, T. O. S.; BABALOLA, A. O. Solubilization of insoluble phosphate by organic acid-producing fungi isolated from Nigerian soil. **International Journal of Soil Science**, v.4, p.301-307, 2007.
- ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. New York and London, John Wiley & Sons, 1961. 472p.
- ALIKHANI, H. A.; SALEH-RASTIN, N.; ANTOUN, H. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. **Plant and Soil**, The Hague, v.287, p.35-41, 2006.
- ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C. J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. 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, p.57-67, 1998.
- ASEA, P. E. A.; KUCEY, R. M. N.; STEWART, J. W. B. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v.20, p.459-464, 1988.
- BABU-KHAN, S.; YEO, T. C.; MARTIN, W. L.; DURON, M. R.; ROGERS, R. D.; GOLDSTEIN, A. H. Cloning of mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.972-978, 1995.
- BARBERI, A.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D. Crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe BR29 em meios de cultivo com diferentes valores de pH inicial. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, p.397-405, 2004.
- BOLAN, N. S.; NAIDU, R.; MAHIMAIRAJA, S.; BASKARAN, S. Influence of low-molecular-weight organic acids on the solubilization of phosphates. **Biology Fertility Soils**, Berlin, v.18, p.311-319, 1994.
- BOMFETI, C. A.; FLORENTINO, L. A.; GUIMARÃES, A. P. CARDOSO, P. G.; GUERREIRO, M. C.; MOREIRA, F. M. S. Exopolysaccharides produced by the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of leguminosae. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.35, p.657-671, 2011.

CANELLAS, L. P.; ZANDONADI, D. B.; OLIVARES, F. L.; FAÇANHA, A. R. Efeitos fisiológicos de substâncias húmicas – o estímulo às H<sup>+</sup>-ATPases. In: FERNANDES, M.S. **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa, MG: SBCS, 2006. p.175-200, 432p.

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

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; KLOEPPER, J. W.; BEAUCHAMP, C. J. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*. **Applied Environment Microbiology**, Washington, v.62, p.2767-2772, 1996.

CHABOT, R.; BEAUCHAMP, C. J.; KLOEPPER, J. W.; ANTOUN, H. 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, p.1615-1618, 1998.

CHANG, S. C.; JACKSON, M. L. Fractionation of soil phosphorus. **Soil Science**, Baltimore, v.84, p.133-144, 1957.

CHEN, Y. P.; REKHA, P. D.; ARUN, A. B.; SHEN, F. T.; LAI, W. A.; YOUNG, C. C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**, v.34, p.33-41, 2006.

CHUANG, C. C.; KUO, Y. L.; CHAO, C. C.; CHAO, W. L. Solubilization of inorganic phosphate and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. **Biology Fertility Soils**, Berlin, v.43, p.575-584, 2007.

COLLAVINO, M. M.; SANSBERRO, P. A.; MROGINSKI, L. A.; AGUILAR, O. M. Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. **Biology and Fertility Soils**, v.46, p.727-738, 2010.

CUNNINGHAM, J.; KUIACK, C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.1451-1458, 1992.

DAIMON, H.; NOBUTA, K.; OHE, M.; HARADA, J.; NAKAYAMA, Y. Tricalcium phosphate solubilizing by root nodule bacteria of *Sesbania cannabina* and *Crotalaria juncea*. **Plant Production Science**, Cambridge, v.9, p.388-389, 2006.

DUFF, R. B.; WEBLEY, D. M. 2-Ketogluconic acid as a natural chelator produced by soil bacteria. **Chemistry Industrial**, p.1376-1377, Oct. 1959.

EL-TARABILY, K. A.; NASSAR, A. H.; SIVASITHAMPARAM, K. Promotion of growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a calcareous soil by a phosphate-solubilizing, rhizosphere-competent isolate of *Micromonospora endolithica*. **Applied Soil Ecology**, v.39, p.161-171, 2008.

ELVIA, J. C.; ORTEGA-RODÉS, P.; ORTEGA, E. La inoculación de plantas con *Pantoea* sp., bacteria solubilizadora de fosfatos, incrementa la concentración de P en los tejidos foliares. **Revista Colombiana de Biotecnología**, Bogotá, v.10, p.111-121, 2008.

FARHAT, M. B.; FARHAT, A.; BEJAR, W.; KAMMOUN, R.; BOUCHAALA, K.; FOURATI, A.; ANTOUN, H.; BEJAR, S.; CHOUAYEKH, H. Characterization of the mineral phosphate solubilizing activity of *Serratia marcescens* CTM 50650 isolated from the phosphate mine of Gafsa. **Archives of Microbiology**, v.191, p.815-824, 2009.

FERNÁNDEZ, L. A.; ZALBA, P.; GÓMEZ, M. A.; SAGARDOY, M. A. Phosphate-solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. **Biology Fertility Soils**, Berlin, v.43, p.805-809, 2007.

GERRETSEN, F. C. The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant. **Plant and Soil**, The Hague, v.1, p.51-81, 1948.

GULATI, A.; SHARMA, N.; VYAS, P.; SOOD, S.; RAHI, P.; PATHANIA, V.; PRASAD, R. Organic acid production and plant growth promotion as a function of phosphate solubilization by *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 isolated from the cold deserts of the trans-Himalayas. **Arch Microbiology**, v.192, p.975-983, 2010.

HAMDALI, H.; BOUIZGARNE, B.; HAFIDI, M.; LEBRIHI, A.; VIROLLE, M. J.; OUHDOUCH, Y. Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. **Applied Soil Ecology** v.38, p.12-19, 2008.

HAMEEDA, B.; HARINI, G.; RUPELA, O. P.; WANI, S. P.; REDDY, G. Growth promotion of maize by phosphatesolubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiological Research*, v.163, p.234-242, 2008.

HALDER, A. K.; MISHRA, A. K.; BHATTACHARYYA, P.; CHAKRABARTTY, P. K. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Journal Genetics Applied Microbiology*, v.36, p.81-92, 1990.

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, p.13-24, 2009.

HWANGBO, H.; PARK, R. D.; KIM, Y. W.; RIM, Y. S.; PARK, K. H.; KIM, T. H.; SUH, J. S.; KIM, K. Y. 2-Ketogluconic acid production and phosphate solubilizing by *Enterobacter intermedium*. *Current Microbiology*, v.47, p.87-92, 2003.

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

ILLMER, P.; BARBATO, A.; SCHINNER, F. Solubilization of hardlysoluble  $AlPO_4$  with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biology & Biochemistry*, Elmsford, v.27, p.265-270, 1995.

JOHNSON, S. E.; LOEPPERT, R. H. Role of organic acids in phosphate mobilization from iron oxide. *Soil Science Society America Journal*, Madison, v.70, p.222-234, 2006.

JONES, D. L. Organic acids in the rhizosphere: a critical review. *Plant and Soil*, The Hague, v.205, p.25-44, 1998.

KANG, S. M.; JOO, G. J.; HAMAYUN, M. NA, C. I.; SHIN, D. H.; KIM, H. Y.; HONG, J. K.; LEE, I. J. Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. *Biotechnology Letters*, v.31, p.277-281, 2009.

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 Fertility Soil*, Berlin, v.26, p.79-87, 1998.

- KIM, C. H.; HAN, S. H.; KIM, K. Y.; CHO, B. H.; KIM, Y. H.; KOO, B. S. Cloning and expression of Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) genes from a phosphate-solubilizing bacterium *Enterobacter intermedius*. **Current Microbiology**, v.47, p.457-461, 2003.
- KPOMBLEKOU-A, K.; TABATABAI, M. A. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. **Soil Science**, Baltimore, v.158, p.442-453, 1994.
- 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**, v.100, p.275-284, 2003.
- LIN, T. F.; HUANG, H.; SHEN, F. T.; YOUNG, C. C. The protons of glucônico acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. **Bioresource Technology**, v.97, p.957-960, 2006.
- LOPES, A. S. **Manual de fertilidade do solo**. São Paulo: ANDA/Potafos, 1989. 155p.
- MARRA, L. M.; OLIVEIRA, S. M.; SOARES, C. R. F. S.; MOREIRA, F. M. S. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. **Scientia Agricola**, v.68, p.603-609, 2011.
- MARRA, L. M.; SOARES, C. R. F. S.; OLIVEIRA, S. M.; FERREIRA, P. A. A.; SOARES, B. L.; CARVALHO, R. F.; LIMA, J. M.; MOREIRA, F. M. S. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. *Plant and Soil*, XX:YY-ZZ, 2012.
- MELLO, J. W. V.; PEREZ, D. V. Equilíbrio químico das reações do solo. In: MELO, V. de F.; ALLEONI, L. R. F. **Química e Mineralogia do Solo**. Viçosa, MG: SBCS, 2009, v.1- Conceitos Básicos, p.151-249, p.695.
- MIGUEL, D. L.; MOREIRA, F. M. S. Influência do pH do meio de cultivo e da turfa no comportamento de estirpes de *Bradyrhizobium*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v25, p.873-883, 2001.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. 729p.

MOTTA, P. E. F.; CURTI, N.; SIQUEIRA, J. O.; RAIJ, B. van; FURTINI NETO, A. E.; LIMA, J. M. Adsorção e formas de fósforo em latossolos: influência da mineralogia e histórico de uso. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.26, p.349-359, 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, p.325-331, 1992.

NAHAS, E. Solubilização microbiana de fosfatos e de outros elementos. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Ed.). **Inter-relação fertilidade biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa, MG: SBCS/UFLA/DCS, 1999. p.467-486.

NARSIAN, V.; S.M. SAMAHA, A. A.; PATEL, H. H. Rock phosphate dissolution by specific yeast. **Indian Journal Microbiology**, v.50, p.57-62, 2010.

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

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

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J.; NUNES, F. N. Fósforo. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. V. H.; BARROS, N. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG: SBCS, 2007. p.471-550, 1017p.

OGUT, M.; ER, F.; KANDEMIR, N. Phosphate solubilization potentials of soil *Acinetobacter* strains. **Biology and Fertility Soils**, v.46, p.707-715, 2010.

OGUT, M.; ER, F.; NEUMANN, G. Increased proton extrusion of wheat roots by inoculation with phosphorus solubilising microorganims. **Plant and Soil**, The Hague, v.339, p.285-297, 2011.

PATEL, D. K.; ARCHANA, G.; NARESH-KUMAR, G. Variation in the Nature of Organic Acid Secretion and Mineral Phosphate Solubilization by *Citrobacter* sp. DHRSS in the Presence of Different Sugars. **Current Microbiology**, v.56, p.168-174, 2008.

PEIX, A.; RIVAS, R.; MATEOS, P. F.; MOLINA-MARTÍNEZ, E.; BARRUECO-RODRIGUEZ, C.; VELÁZQUEZ, E. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. **Soil Biology Biochemistry**, Elmsford, v.33, p.103-110, 2001.

PEIX, A.; LANG, E.; VERBARG, S.; SPRÖER, C.; RIVAS, R.; SANTA-REGINA, I.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; RODRÍGUEZ-BARRUECO, C.; VELÁZQUEZ, E. *Acinetobacter* strains IH9 and OC11, two rhizospheric phosphate solubilizing isolate sable to promote plant growth, constitute a new genomovar of *Acinetobacter calcoaceticus*. **Systematic and Applied Microbiology**, v.32, p.334-341, 2009.

PUENTE, M. E.; LI, C. Y.; BASHAN, Y. Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. **Environmental and Experimental Botany**, v.66, p.389-401, 2009.

RAIJ, B. van. **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba: Ceres; Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1991. 343p.

RAIJ, B. van. Fósforo no solo e interação com outros elementos. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S. (Ed.). **Fósforo na agricultura brasileira**. Piracicaba: Potafos, 2004. p.107-116.

RASHID, M.; KHALIL, S.; AYUB, N.; ALAM, S.; LATIF, F. Organic acids production and phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under *in vitro* conditions. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.7, p.187-196, 2004.

RESENDE, M.; CURI, N.; SANTANA, D. P. **Pedologia e Fertilidade do Solo: interações e aplicações**. Brasília: Ministério da Educação; Lavras: ESAL, 1988, p.81.

RELWANI, L.; KRISHNA, P.; REDDY, M.S. Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Phosphate Solubilization by a Wild-Type Strain and UV-Induced Mutants of *Aspergillus tubingensis*. **Current Microbiology**, v.57, p.401-406, 2008.

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, p.481-484, 2007.



RIVAS, R.; PEIX, A.; MATEOS, P. F.; TRUJILLO, M. E.; MLINA-MARTÍNEZ, E.; VELÁZQUEZ, E. Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different Spanish soils. **Plant and Soil**, The Hague, v.287, p.23-33, 2006.

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

RODRÍGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v.91, p.552-555, 2004.

SELVAKUMAR, G.; KUNDU, S.; GUPTA, A. D.; SHOUCHE, Y. S.; GUPTA, H. S. Isolation and characterization of nonrhizobial plant growth promoting bacteria from nodules of *Kudzu* (*Pueraria thunbergiana*) and their effect on wheat seedling growth. **Current Microbiology**, v.56, p.134-139, 2008.

SESHADRI, S.; MUTHUKUMARASAMY, R.; LAKSHMINARASIMHAN, C.; IGNACIMUTHU, S. Solubilization of inorganic phosphate by *Azospirillum halopraeferans*. **Current Science**, v.79, p.565-567, 2000.

SHARAN, A.; SHIKHA; DARMWAL, N.S. Efficient phosphorus solubilization by mutant strain of *Xanthomonas campestris* using different carbon, nitrogen and phosphorus sources. **World Journal Microbiology Biotechnology**, Oxford, v.24, p.3087-3090, 2008.

SIQUEIRA, J. O.; ANDRADE, A. T.; FAQUIN, V. O papel dos microrganismos na disponibilização e aquisição de fósforo pelas plantas. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S. **Fósforo na Agricultura Brasileira**. Piracicaba: Potafos, 2004. p.117-149.

SONG, O. R.; LEE, S. J.; LEE, S. C.; KIM, K. K.; CHOI, Y. L. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.39, p.151-156, 2008.

SPERBER, J. I. Solution of mineral phosphates by soil bacteria. **Nature**, London, v.180, p.994-995, 1957.

SPERBER, J. I. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. **Australian Journal Agricultural Research**, Victoria, v.9, p.782-787, 1958.

SRIDEVI, M.; MALLAIAH, K. V.; YADAV, N. C. S. Phosphate solubilization by *Rhizobium* isolates from *Crotalaria* species. **Journal of Plant Sciences**, Shannon, v.2, p.635-639, 2007.

STUMM, W.; MORGAN, J. J. **Aquatic Chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters**. 3.ed. Wiley, New York, 1995. 1022p.

SURANGE, S.; KUMAR, N. Phosphate solubilization under varying pH by *Rhizobium* from tree legumes. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v.31, p.855-857, 1993.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; TORRACA, S. L. A.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazônica**, Manaus, v.12, p.15-22, 1982.

TAHA, M.; MAHMOUD, A. Z.; EL-DAMATY, A. H.; EL-HAFEZ, A. M. A. Activity of phosphate-dissolving bacteria in egyptian soil. **Plant and Soil**, The Hague, v.1, p.149-160, 1969.

TAN, K. H. **Principles of soil chemistry**. New York: Springer-Verlag, 1993.

TRIVEDI, P.; SA, T. *Pseudomonas corrugate* (NRRL B-30409) mutants increased phosphate solubilization, organic acid production, and plant growth at lower temperatures. **Current Microbiology**, v.56, p.140-144, 2008.

VAZQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M. E.; LOPEZ-CORTES, A.; BASHAN, Y. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology Fertility Soils**, Berlin, v.31, p.460-468, 2000.

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

XIÃO, C.; CHI, R.; HE, H.; ZHANG, W. Characterization of tricalcium phosphate solubilization by *Stenotrophomonas maltophilia* YC isolated from phosphate mines. **Journal Cent. South University Technology**. Pequin, v.16, p.581-587, 2009.

XIE, J.; KNIGHT, J.D.; LEGGETT, M.E. Comparison of media used to evaluate *Rhizobium leguminosarum* bivar *viciae* for phosphatesolubilizing ability. **Canadian Journal Microbiology**, v.55, p.910-915, 2009.

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, 2008.

YU, X.; AI, C.; XIN, L.; ZHOU, G. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on Fusarium wilt and promotes the growth of pepper. **European Journal of Soil Biology**, v.47, p.138-145, 2011.

ZENG, Q.; LUO, F.; ZHANG, Z.; YAN, R.; ZHU, D.; Phosphate solubilizing rhizosphere bacterial T21 isolated from dongxian wild rice species promotes cultivated rice growyh. **Applied Mechanics and Materials**, Millersville, v.108, p.167-175, 2012.

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, p.243-250, 1992.

**SEGUNDA PARTE**

**ARTIGO 1**

**Sources of carbon and production of organic acids on the phosphate  
solubilization by bacteria**

**Normas da revista Plant and Soil**

**(versão preliminar)**

Leandro Marciano Marra - Silvia Maria de Oliveira - Cláudio Roberto Fonsêca  
Sousa Soares - José Maria de Lima - Fatima Maria de Souza Moreira<sup>(\*)</sup>

-----  
L. M. Marra: C. R. F. S. Soares: P. A. A. Ferreira: B. L. Soares: R. F. de Carvalho: J. M.  
de Lima: F. M. de Souza Moreira<sup>(\*)</sup>

Postgraduate program of Soil Science - Department of Soil Science, Federal University  
of Lavras, P.O. 3037, 37200-000 Lavras, MG, Brazil. e-mail: [fmoreira@dcs.ufla.br](mailto:fmoreira@dcs.ufla.br)

C. R. F. S. Soares. Federal University of Santa Catarina, CCB-MIP, Campus Trindade,  
P.O. 476, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil.

S. M. de Oliveira: F. M. de Souza Moreira. Postgraduate program of Agricultural  
Microbiology. Department of Biology, Federal University of Lavras, P.O. 3037, 37200-  
000 Lavras, MG, Brazil

**Resumo**

A solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis por microrganismos heterotróficos do solo pode ser influenciada por diversos fatores entre eles a fonte de carbono. No entanto, poucos trabalhos são disponíveis sobre esse assunto. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes fontes de carbono na solubilização de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  e de  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , por bactérias, em meio NBRIP, além de identificar e quantificar os ácidos orgânicos produzidos. As estirpes utilizadas foram a UFLA 03-08 (*Rhizobium tropici*), UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp), UFLA 03-10 (*Paenibacillus kribbensis*), UFLA 03-106 (*Paenibacillus kribbensis*) e UFLA 03-116 (*Paenibacillus* sp) isoladas de nódulos de feijão caupi. Como fontes de carbono, testou-se celulose, glicose, lactose e manitol. Além de verificar a capacidade destas estirpes em solubilizar  $\text{CaHPO}_4$  e  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  em meio NBRIP sólido e líquido, avaliou-se a produção de onze ácidos orgânicos comumente associados a solubilização de fosfatos por microrganismos: 2-cetoglucônico, cítrico, glucônico, láctico, málico, maléico, malônico, oxálico, propiônico, succínico e tartárico. As estirpes UFLA 03-08, UFLA 03-10 e UFLA 03-106 solubilizaram  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , no meio líquido, independentemente da fonte de carbono estudada. Porém, houve diferenças na quantidade solubilizada, sendo os maiores valores de fósforo solúvel, encontrados na presença de glicose seguida de manitol, depois lactose e por fim, celulose. Para essas estirpes, foi verificada a produção de ácidos orgânicos na presença de glicose e manitol. A estirpe UFLA 03-10 foi a única a produzir ácidos orgânicos no meio com lactose. Nenhuma das estirpes produziu ácidos no meio com celulose. Não houve solubilização do  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , no meio NBRIP sólido ou líquido em nenhuma das fontes de carbono. Houve correlação positiva e significativa entre a quantidade de fósforo solubilizado do  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  no meio NBRIP líquido e a concentração de ácidos orgânicos totais, na presença de glicose e manitol. A glicose favorece a produção de ácidos orgânicos, contribuindo para maior solubilização de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . A presença de ácidos orgânicos com as diferentes fontes de carbono estudadas, não propiciou a solubilização de  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

**Palavras-Chave:** *Acinetobacter*; *Rhizobium*; *Paenibacillus*; carbono; bactérias solubilizadoras de fosfatos

**Abstract**

The solubilization of insoluble inorganic phosphates by soil heterotrophic microorganisms may be influenced by several factors, including the carbon source. However, few studies are available on this subject, mainly in relation to the organic acids produced. The objective of this study was to evaluate the influence of different carbon sources on the solubilization of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  and  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  by bacteria in the National Botanical Research Institute's phosphate (NBRIP) growth medium and to identify and quantify the organic acids produced. Strains UFLA 03-08 (*Rhizobium tropici*), UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp.), UFLA 03-10 (*Paenibacillus kribbensis*), UFLA 03-106 (*Paenibacillus kribbensis*) and UFLA 03-116 (*Paenibacillus* sp.), which were isolated from cowpea nodules, were studied. We tested cellulose, glucose, lactose and mannitol as carbon sources. In addition to evaluating the capacity of these strains to solubilize  $\text{CaHPO}_4$  and  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in solid and liquid NBRIP medium, the production of eleven organic acids that are commonly associated with phosphate solubilization by microorganisms was evaluated: 2-keto-gluconic, citric, gluconic, lactic, malic, maleic, malonic, oxalic, propionic, succinic and tartaric acids. The strains UFLA 03-08, UFLA 03-10 and UFLA 03-106 solubilized  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in liquid medium, regardless of the carbon source studied. However, there were differences in the amount solubilized. The highest levels of soluble phosphorus were found in the presence of glucose followed by mannitol, lactose and finally cellulose. Additionally, we detected the production of organic acids by these strains in the presence of glucose and mannitol. UFLA 03-10 was the only strain to produce organic acids in the medium with lactose. None of the strains produced acid in medium containing cellulose. There was no solubilization of  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in either liquid or solid NBRIP medium in the presence of any carbon source studied. There was a significant positive correlation between the amount of phosphorus solubilized from  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in the NBRIP liquid medium and the concentration of total organic acids in the presence of glucose and mannitol. Glucose promotes the production of organic acids, which contributes to greater solubilization of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . The presence of organic acids and the different carbon sources investigated did not result in the solubilization of  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

**Key-words:** *Acinetobacter*; *Rhizobium*; *Paenibacillus*; carbon; phosphate solubilizing bacteria

## 1 Introduction

The availability of phosphorous in tropical soils is one of the most limiting factors for plant productivity. Therefore application of high doses of phosphate fertilizers to increase crop productivity is needed. This low availability of phosphorous is mainly due to the immobilization of phosphorus through precipitation with other components in the soil, which then form insoluble calcium, aluminum and iron phosphates.

Using microorganisms that are capable of solubilizing these precipitated, and adsorption on the surface of iron and aluminium oxides phosphates is an option for increasing phosphorus availability. Studies have shown that some bacteria and fungi are capable of solubilizing phosphate in rocks, which then results in better plant growth (Gerretsen, 1940; Collavino et al., 2010).

The capacity of microorganisms to solubilize insoluble inorganic phosphates, such as  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{AlPO}_4$  and  $\text{FePO}_4$ , has been attributed to their ability to reduce the surrounding pH (Stumm and Morgan, 1995; Whitelaw, 2000).

The most studied mechanism of solubilization is the production of organic acids (Sperber, 1958; Hariprasad and Niranjana 2009), which can lower the pH and act as chelators of the elements that are bound to the phosphate ion. Additionally, it can prevent reprecipitation (Bolan et al. 1994). Alexander (1961) reported that the amount of phosphate solubilized by microorganisms in solution varies according to which carbohydrates are present. The main source of carbohydrates are the plants as they secrete and produce a variety of these compounds. Glucose is the carbohydrate that is secreted in the largest quantities (Krafczyk et al., 1984) and cellulose is the most common natural polysaccharide as it contains most of the  $\text{CO}_2$  fixed by plants.

Studies on the solubilization of insoluble inorganic phosphates with

different carbon sources have reported that the carbon source is a key factor in the efficiency of solubilization by either bacteria (Nautiyal, 1999; Sridevi and Mallaiah, 2009) or fungi (Ahuja et al. 2007; Relwani et al., 2008). However, few studies have evaluated the production of organic acids, and only a few acids were evaluated in these studies.

Thus, the objectives of this study were to evaluate the influence of cellulose, glucose, lactose and mannitol on the solubilization of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  and  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in solid and liquid NBRIP culture medium and to identify and quantify the organic acids produced in liquid medium.

## 2 Material and Methods

### 2.1 Strains

The ability to grow in culture medium 79 (Fred & Waksman, 1928) with different carbon sources, including mannitol, which integrates its original composition, were tested separately for the strains UFLA 03-08 (*Rhizobium tropici*), UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp.), UFLA 03-10 (*Paenibacillus kribbensis*), UFLA 03-106 (*Paenibacillus kribbensis*) and UFLA 03-116 (*Paenibacillus* sp.). These strains were isolated from cowpea nodules (Marra et al., Accepted). Medium 79 contained different sources of carbon at a concentration of  $10 \text{ g L}^{-1}$ : cellulose, glucose, lactose and mannitol was used. The strains were subcultured by streaking them onto plates containing the culture medium and then incubated at  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  for 10 days. The presence or absence of growth was determined at the end of this period. The experimental design was completely randomized with three replicates.



## 2.2 Solubilization of phosphates and production of organic acids

Four experiments were conducted to test the capacity of the UFLA 03-08 (*Rhizobium tropici*), UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp.), UFLA 03-10 (*Paenibacillus kribbensis*), UFLA 03-106 (*Paenibacillus kribbensis*) and UFLA 03-116 (*Paenibacillus* sp.) strains to solubilize insoluble inorganic calcium and iron phosphates in solid and liquid NBRIP culture medium (Nautiyal, 1999) that originally contained glucose and the following components ( $L^{-1}$ ): 5 g of  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0.25 g of  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.2 g of KCl and 0.1 g of  $(NH_4)_2SO_4$ . This medium was supplemented with  $Ca_3(PO_4)_2$  and  $FePO_4 \cdot 2H_2O$  at a concentration of 1000 mg  $L^{-1}$  of phosphorus in the solid medium and 100 mg  $L^{-1}$  of phosphorus in the liquid medium. Different carbon sources were evaluated in both solid and liquid media: cellulose, glucose, lactose and mannitol (at a concentration of 10 g  $L^{-1}$ ). The initial pH of the media was adjusted to 7.0.

To obtain and standardize the inocula, strains were inoculated in liquid medium 79 (Fred and Waksman, 1928) containing the following components: 0.5 g  $L^{-1}$   $K_2HPO_4$ , 0.2 g  $L^{-1}$   $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.1 g  $L^{-1}$  NaCl, 10.0 g  $L^{-1}$  mannitol and 0.4 g  $L^{-1}$  yeast extract, at pH 6.8. The strains were incubated under shaking (100 rpm) and aerobic conditions at room temperature. Measurements were taken over time using a spectrophotometer at the wavelength of 560 nm until the bacteria reached an optical density (OD) of 0.5, which indicates that there were approximately  $10^8$  cells per mL. If the OD was greater than 0.5, 0.85 % saline was added to dilute and adjust the culture to the desired cell concentration.

To evaluate the different carbon sources in solid NBRIP medium, four 20  $\mu L$  aliquots of each culture (strain) with an OD of 0.5 were inoculated onto Petri dishes. The controls consisted of NBRIP media containing each phosphate and carbon source not inoculated with microorganisms. The culture plates were incubated at 28 °C, and the diameter of the solubilization halos (translucent area

around the colony) was measured using a digital caliper at the beginning of solubilization and after 15 days of incubation. From these measurements, we determined the solubilization index (SI), which is equal to the diameter of the halo (mm) divided by the diameter of the colony (mm) (Berraquero et al. 1976). Based on this solubilization index, the strains were classified as having low ( $SI < 2.00$ ), moderate ( $2.00 < SI < 4.00$ ) or high ( $SI > 4.00$ ) solubilization ability.

For the liquid NBRIP medium, the evaluation was performed by inoculating a 1 mL aliquot of culture into liquid 79 medium, with an OD of 0.5 at 560 nm, into an Erlenmeyer flask (125 mL) containing 50 mL of NBRIP medium with each insoluble inorganic phosphate and carbon source. The flasks were incubated at 28 °C on a shaker at 130 rpm for 10 days. Then, the samples were centrifuged (19,187 g for 5 min). After separation of the pellet, the pH and concentration of soluble phosphorus in the supernatant were measured using the phosphomolybdic method (Murphy and Riley, 1962). The organic acids produced in the medium were also quantified. The control, without inoculation, was also tested for each phosphate and carbon source. The ability of each strain to solubilize phosphate was determined by the difference between the concentration of soluble phosphorus found in the culture medium and the concentration of the control treatment without inoculation.

High performance liquid chromatography (HPLC) (Agilent HP 1100 Series) was used to identify and quantify the organic acids. After the samples were collected, they were filtered through a cellulose membrane with a pore diameter of 0.45  $\mu\text{M}$  before being injected into a Supelcogel C-610H 9  $\mu\text{m}$  chromatographic column measuring 30 cm x 7.8 mm. The eleven Merck® pro-analysis organic acids that have been reported in the literature as being involved in solubilization were used as analytical standards. The mobile phase consisted of 0.1 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (pH 1.81), with a flow of 0.5  $\text{mL min}^{-1}$  and an injection of 100  $\mu\text{L}$  per sample. The method was according to manufacturer (SUPELCO/SIGMA

ALDRICH) of the column Supelcogel. The acquisition time of the chromatograms was set to 30 minutes with an interval of 30 minutes between the runs. Components were detected by UV at 210 nm using a diode array detector (DAD). The identified molecules and standard retention times for the acids were as follows: oxalic (10.10 min), 2-keto-gluconic (12.10 min), citric (12.40 min), gluconic (13.04 min), maleic (13.33 min), tartaric (13.45 min), malic (14.85 min), malonic (15.23 min), lactic (17.89), succinic (17.91 min) and propionic (25.08 min) acids. The quantity of the acids was measured using calibration curves with analytical standards. In table 1 are some chemical characteristics of the organic acids studied.

Table 1 Chemical characteristics of organic acids (Moss et al., 1994)

Common name	Iupac name	Chemical formula	MW <sup>(1)</sup>	pKa <sup>(2)</sup>
2-Keto-gluconic acid	Calcium (3S,4R,5R)-3,4,5,6-tetrahydroxy-2-oxohexanoate hydrate	$C_6H_9O_7 \cdot \frac{1}{2}Ca \cdot xH_2O$	213.17	
Citric acid	2-hidroxi-1,2,3-propanetricarboxylic Acid	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	210.14	1°) 3.15 2°) 4.77 3°) 6.40
Gluconic acid	(2R,3S,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexanoic acid	$C_6H_{10}O_6$	178.14	1°) 3.86
Lactic acid	2-hidroxiopropanoic acid	$C_3H_6O_3$	90.08	1°) 3.85
Maleic acid	butenedioic acid	$C_4H_4O_4$	116.1	
Malic acid	Hidroxiutanodioic acid	$C_4H_6O_5$	134.06	
Malonic acid	Propanodioic acid	$C_3H_4O_4$	104.03	
Oxalic acid	Ethanedioic acid	$C_2H_2O_4$	90.04	1°) 1.23 2°) 4.19
Propionic acid	Propanoic acid	$C_3H_6O_2$	74.07	1°) 4.87
Succinic acid	Butanedioic acid	$C_4H_6O_4$	118.09	1°) 4.16 2°) 5.61
Tartaric acid	2,3-dihidroxiutanedioic acid	$C_4H_6O_6$	150.08	

<sup>(1)</sup>Molecular weight (g mol<sup>-1</sup>). <sup>(2)</sup>pH where 50% of the acid is dissociated.

The experiments in liquid NBRIP culture medium were designed as independent assays according to the phosphate source. The design was completely randomized and consisted of two replicates for each carbon source. The results were subjected to analysis of variance using the statistical analysis program Sisvar version 4.6 (Ferreira, 2008), and the means were compared using the Scott-Knott test at 5%.

### 3 Results

#### 3.1 Growth and solubilization in solid media with $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

The strains UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp.) and UFLA 03-106 (*Paenibacillus kribbensis*) grew in solid culture medium 79 with all carbon sources tested (Table 2).

Table 2 Growth of strains in culture medium 79 containing the different carbon sources with yeast and minerals after 10 days of incubation at 28 °C

Strains	Cellulose	Glucose	Lactose	Mannitol
UFLA 03-08 ( <i>Rhizobium tropici</i> )	+	+	+	+
UFLA 03-09 ( <i>Acinetobacter</i> sp.)	+	+	+	+
UFLA 03-10 ( <i>Paenibacillus kribbensis</i> )	+	+	+	+
UFLA 03-106 ( <i>Paenibacillus kribbensis</i> )	+	+	+	+
UFLA 03-116 ( <i>Paenibacillus</i> sp.)	+	+	+	+

(+) grew;

The UFLA 03-116 (*Paenibacillus* sp.) strain grew in the solid NBRIP culture medium but it was unable to solubilize  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in any of the carbon sources studied. The other strains grew but were unable to solubilize  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  when cellulose was used as the carbon source. All strains that were able to

solubilize  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  had a low solubilization index after 15 days of incubation, except for strain UFLA 03-08 (*Rhizobium tropici*). The strains UFLA 03-08 showed a moderate solubilization index (2.51), only when glucose was used (Table 3).

Table 3 Solubilization index of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in solid NBRIP medium containing different carbon sources for strains isolated from cowpea nodules after 3 and 15 days of cultivation at 28 °C

Strains	Cellulose		Glucose		Lactose		Mannitol	
	3 days	15 days	3 days	15 days	3 days	15 days	3 days	15 days
UFLA 03-08 <sup>(1)</sup>	GNS <sup>(5)</sup>		1.41 <sup>(6)</sup>	2.51	1.25	1.88	1.18	1.05
UFLA 03-09 <sup>(2)</sup>	GNS		1.32	1.61	1.03	1.11	1.03	1.06
UFLA 03-10 <sup>(3)</sup>	GNS		1.29	1.02	1.21	1.05	1.13	1.04
UFLA 03-106 <sup>(3)</sup>	GNS		1.23	1.41	1.26	1.86	1.26	1.03
UFLA 03-116 <sup>(4)</sup>	GNS		GNS		GNS		GNS	

<sup>(1)</sup>*Rhizobium tropici*. <sup>(2)</sup>*Acinetobacter* sp. <sup>(3)</sup>*Paenibacillus kribbensis*. <sup>(4)</sup>*Paenibacillus* sp.

<sup>(5)</sup>GNS= Grew and did not solubilize. <sup>(6)</sup>S.I. = halo diameter (mm) / colony diameter (mm), evaluated after 3 and 15 days of incubation.

### 3.2 Growth and solubilization in liquid media with $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

The strain UFLA 03-116 (*Paenibacillus* sp.) did not solubilize  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in liquid NBRIP culture medium containing any of the carbon sources. Additionally, when this bacteria was cultured, the pH of the medium did not change relatively to the pH at the start of the experiment (Figure 1). In contrast, the UFLA 03-08 (*Rhizobium tropici*), UFLA 03-10 (*Paenibacillus kribbensis*) and UFLA 03-106 (*Paenibacillus kribbensis*) strains were able to solubilize  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in the presence of all of the carbon sources studied. The highest levels of soluble phosphorus were found in the presence of glucose, followed by mannitol, lactose and finally cellulose. The UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp.) strain was able to solubilize  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in medium with

glucose and cellulose (Figure 1). Notably, the UFLA 03-106 strain provided higher levels of soluble phosphorus in glucose ( $70.09 \text{ mg L}^{-1}$ ) than did the UFLA 03-08 ( $35.58 \text{ mg L}^{-1}$ ), UFLA 03-09 ( $29.72 \text{ mg L}^{-1}$ ) and UFLA 03-10 ( $23.42 \text{ mg L}^{-1}$ ) strains. Additionally, it also provided higher levels of soluble phosphorus than did the other strains for mannitol and lactose. The amount of soluble phosphorus was the same among all the strains but the UFLA 03-116 grown in cellulose (Figure 1).

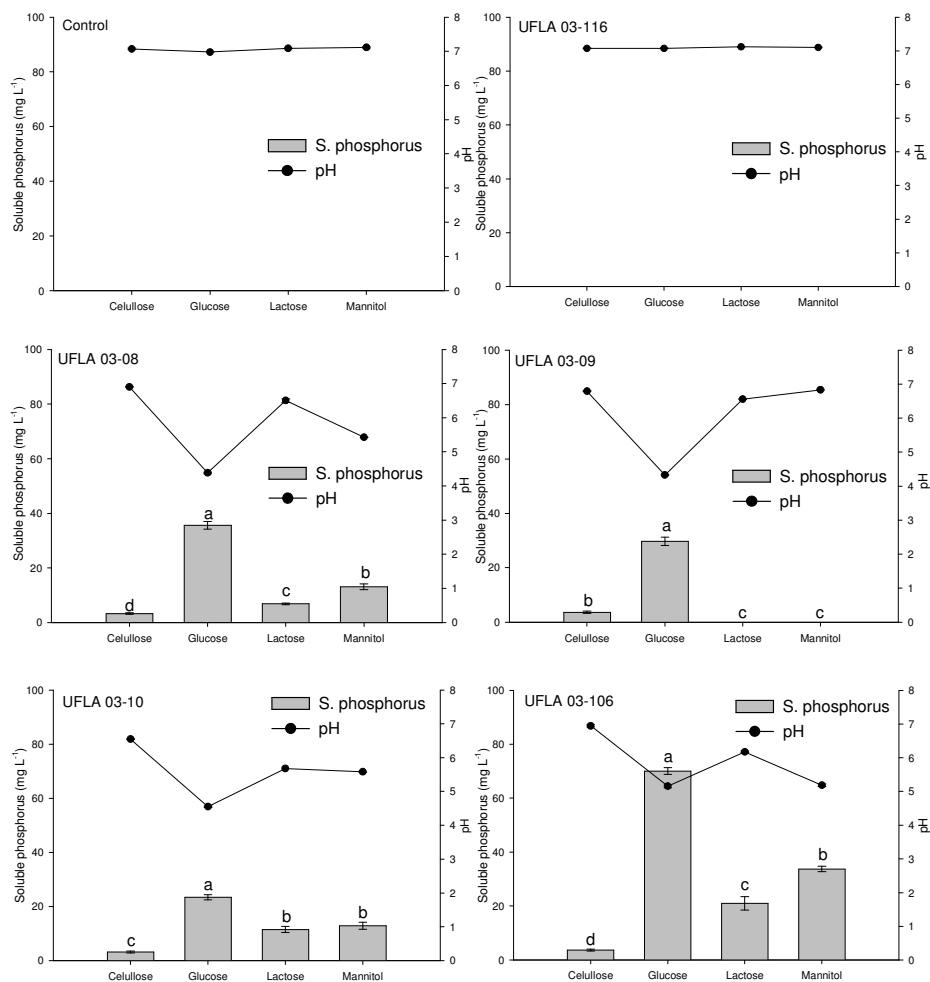


Figure 1 Soluble phosphorus ( $\text{mg L}^{-1}$ ) and pH in liquid NBRIP medium containing  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  and different carbon sources after 10 days of bacterial cultivation. Error bars represent the standard error of the means,  $n = 2$

There was no change in the pH of the medium containing cellulose for strains that were able to solubilize phosphate. Therefore, there was no correlation between the pH and the amount of soluble phosphorus in this case.

However, there was a reduction in the pH (Figure 1) of the media that contained glucose, lactose and mannitol, causing a significant negative correlation between the amount of soluble phosphorus and the pH in the culture media that contained glucose ( $R^2 = -0.63$ ), lactose ( $R^2 = -0.71$ ) and mannitol ( $R^2 = -0.88$ ) (Figure 2).

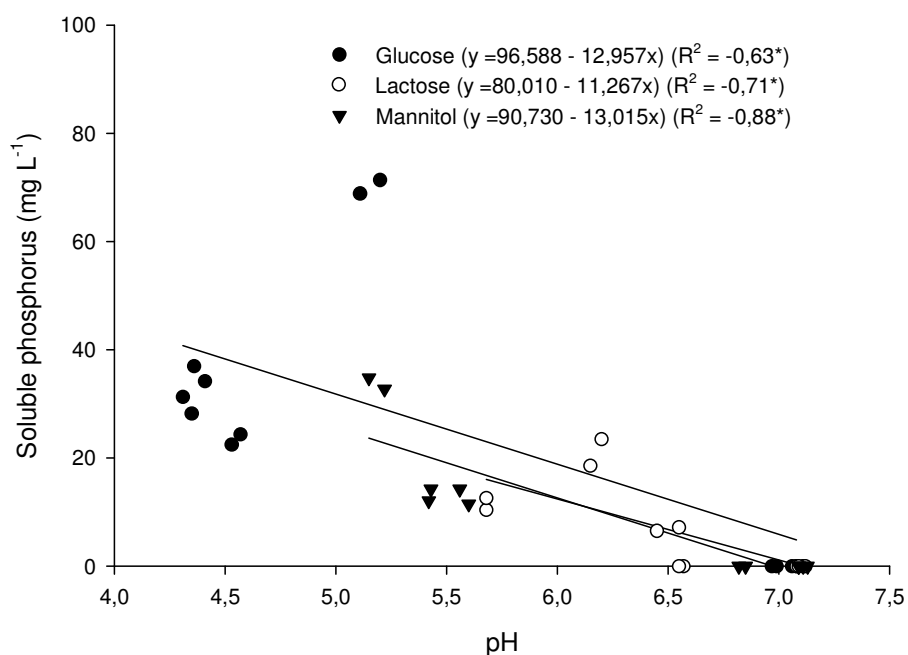


Figure 2 Pearson's correlation between the pH and the concentration of soluble phosphorus in liquid NBRIP medium containing  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  and glucose, lactose and mannitol after 10 days of bacterial cultivation ( $n = 12$ )

In relation to the identification and quantification of organic acids in the liquid media containing  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , the UFLA 03-08 (*Rhizobium tropici*), UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp.), UFLA 03-10 (*Paenibacillus kribbensis*) and UFLA 03-106 (*Paenibacillus kribbensis*) strains produced organic acids when the carbon source was glucose or mannitol (Figure 3). In the medium containing glucose, gluconic and succinic/lactic acids were observed for the UFLA 03-08



strain, and tartaric acid was observed for the UFLA 03-09 strain. Furthermore, 2-keto-gluconic, propionic, succinic/lactic and tartaric acids were observed for the UFLA 03-106 strain. Maleic acid was observed in the medium containing mannitol after incubation with the UFLA 03-08, UFLA 03-09 and UFLA 03-106 strains. Citric and tartaric acids were found in the media after incubation with the UFLA 03-10 strain in the medium containing glucose and in the medium containing mannitol, but different concentrations of citric and tartaric acids were found.

UFLA 03-10 was the only strain to produce organic acids (2-keto-gluconic ( $0.28 \text{ mmol L}^{-1}$ ) and tartaric acid ( $0.32 \text{ mmol L}^{-1}$ ) in medium containing lactose. None of the strains produced organic acids in the medium containing cellulose (Figure 4). UFLA 03-116 (*Paenibacillus* sp.) was the only strain that did not produce acid in media containing  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . The highest concentration of acids was observed for the UFLA 03-106 strain ( $47.76 \text{ mmol L}^{-1}$ ), followed by the strains UFLA 03-09 ( $32.95 \text{ mmol L}^{-1}$ ), UFLA 03-10 ( $25.90 \text{ mmol L}^{-1}$ ) and UFLA 03-08 ( $23.46 \text{ mmol L}^{-1}$ ). More than 94% of the acids were detected in the medium containing glucose for all strains (Figure 3).

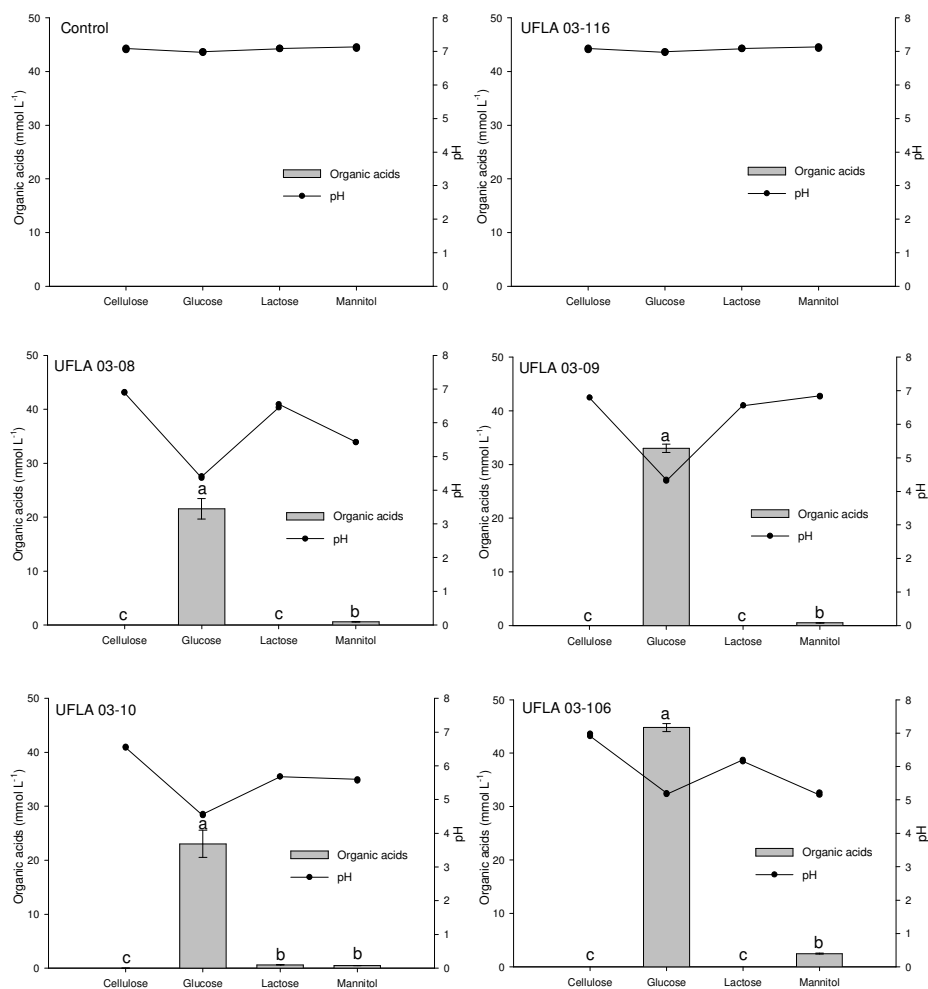


Figure 3 Total organic acids (mmol L<sup>-1</sup>) and pH in liquid NBRIP medium containing Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> and different carbon sources after 10 days of bacterial cultivation. Error bars represent the standard error of the means, n = 2

There was a significant positive correlation between the amount of soluble phosphorus in the liquid NBRIP medium and the concentration of total organic acids produced in the presence of Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> only for the medias

containing glucose ( $R^2 = 0.93$ ) and mannitol ( $R^2 = 0.93$ ) (Figure 4).

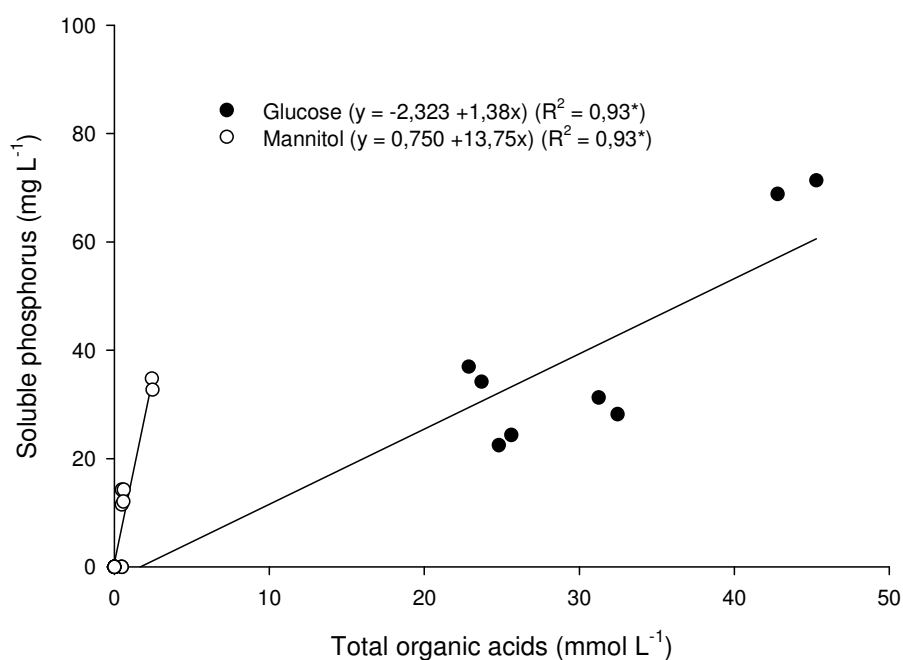


Figure 4 Pearson's correlation between the concentration of soluble phosphorus and the concentration of total organic acids in liquid NBRIP medium containing  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  with glucose or mannitol after 10 days of bacterial cultivation ( $n = 12$ )

### 3.3 Growth and solubilization in solid and liquid media with $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

None of the strains were able to solubilize phosphorous in the presence of any of the carbon sources tested in either solid or liquid NBRIP culture medium containing  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . However, there was a greater reduction of pH in the media in which the UFLA 03-10 and UFLA 03-106 strains were cultured, regardless of the carbon source. The same results were found for the UFLA 03-08 strain, except for when it was grown in lactose-containing medium (Figure

5).

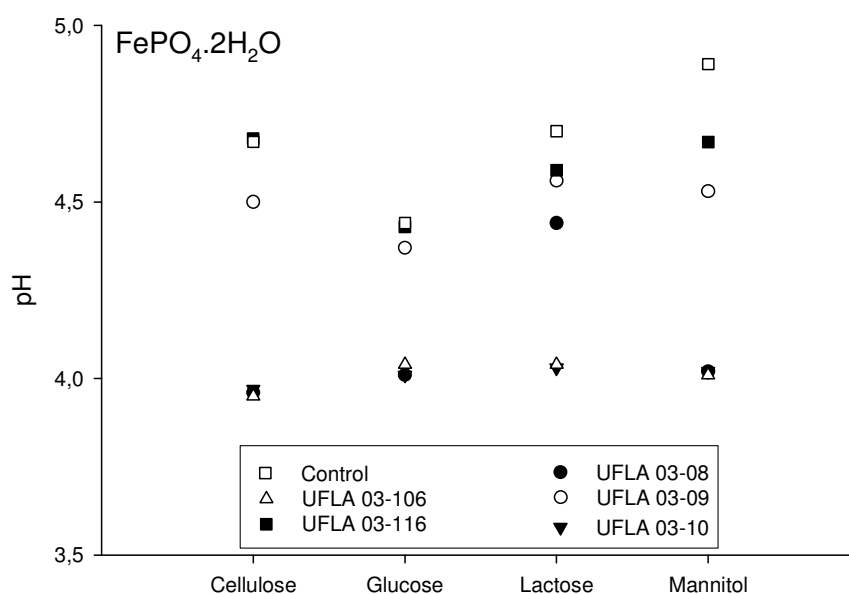


Figure 5 pH of the liquid NBRIP medium containing  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and the different carbon sources after 10 days of bacterial cultivation

All the strains produced organic acids in the medium containing  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , regardless of the carbon source. The acid concentration was higher in the medium containing glucose than in the media containing the other carbon sources (Figure 6). Gluconic and 2-keto-gluconic acids were detected for all strains in the medium containing glucose. Maleic and malonic acids were also observed in the medium containing mannitol for all the strains. All the strains produced succinic/lactic, citric and tartaric acids in medium containing lactose. All the strains produced citric and propionic acids in the medium containing cellulose, especially UFLA 03-116, which produced the highest concentration of total acids when cultured in the medium containing cellulose ( $0.25 \text{ mmol L}^{-1}$ ) (Figure 6).

The highest acid concentration was detected for the UFLA 03-106 strain ( $7.29 \text{ mmol L}^{-1}$ ), followed by UFLA 03-116 ( $5.55 \text{ mmol L}^{-1}$ ), UFLA 03-08 ( $2.29 \text{ mmol L}^{-1}$ ), UFLA 03-10 ( $1.99 \text{ mmol L}^{-1}$ ), and UFLA 03-09 ( $1.26 \text{ mmol L}^{-1}$ ). More than 35% of acid was detected for all the strains when they were grown in medium containing glucose (Figure 6).

Notably, the total concentration of organic acids was 6 to 26 times higher in the medium containing  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  than in the medium containing  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  for the different strains; this phenomenon was independent of the carbon source.

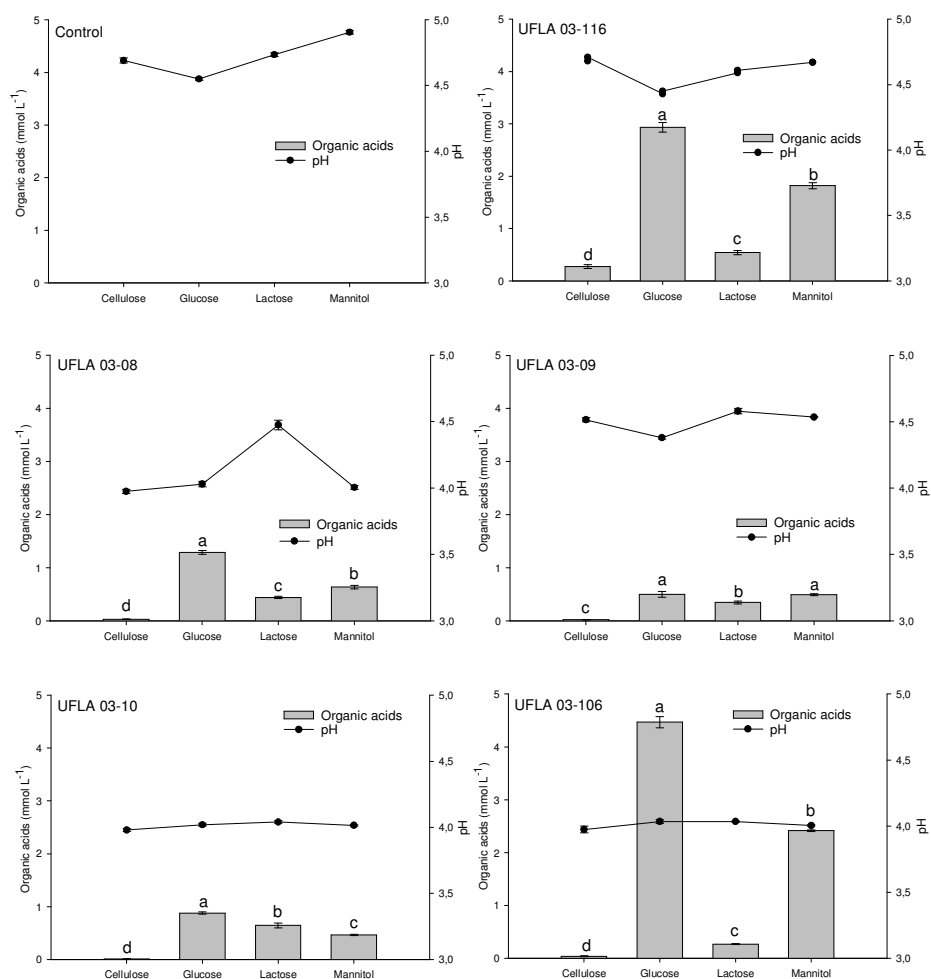


Figure 6 Total organic acids ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) and pH in liquid NBRIP medium containing  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and different carbon sources after 10 days of bacterial cultivation. Error bars represent the standard error of the means,  $n = 2$

## 4 Discussion

The carbon source directly influences the growth of heterotrophic microorganisms and affects some biochemical processes in both positive and negative ways. The use of more readily available sources favors the solubilization of insoluble inorganic phosphates in some groups of microorganisms (Halder et al., 1990; Silva-Filho and Vidor, 2000; Son et al. 2006; Sridevi et al., 2007). In the present study, we report the ability of five bacterial strains to solubilize  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  and  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in culture media containing different carbon sources.

The results demonstrate that the carbon source does not influence the ability of the strains to solubilize  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in either solid or liquid NBRIP medium. Furthermore, none of the strains was able to solubilize phosphates in these conditions, despite the fact that they produced organic acids. Studies performed with bacterial and fungal isolates in solid GEL (glucose and yeast extract) medium (Sylvester-Bradley et al., 1982) also demonstrated the inability of these microorganisms to solubilize  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Silva-Filho and Vidor, 2000). In a previous study, the same strains studied in this work were inoculated on GELP solid medium (Sylvester-Bradley et al., 1982) with a single carbon source, and  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  was not solubilized (Marra et al., Accepted). However, the UFLA 03-10 (*Paenibacillus kribbensis*), UFLA 03-106 (*Paenibacillus kribbensis*) and UFLA 03-116 (*Paenibacillus* sp.) strains solubilized 10 to 20 mg of  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  per liter of solution (Marra et al., accepted) in liquid GELP medium. Therefore, it is noteworthy that using glucose as the carbon source in GELP medium can promote the solubilization of  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , depending on the strain.

Cellulose was the only carbon source studied that did not promote the solubilization of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in the solid medium. The same result was observed

in GES (glucose and soil extract) medium inoculated with bacterial and fungal isolates using cellulose, starch, glucose, fructose, sucrose and xylose as the carbon source (Silva-Filho and Vidor, 2000). Moreover, varying the carbon source did not influence the solubilization capacity of strain UFLA 03-116, even in liquid NBRIP medium supplemented with  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

The use of a carbon source depends on the presence of transport mechanisms, metabolic pathways and specific enzymes that are capable of breaking down the substance. The oxidation of glucose to organic acids by the glucose dehydrogenase and gluconic acid dehydrogenase enzymes results in acidification of the region around the cell, which provides an efficient environment for phosphate solubilization by some Gram-negative bacteria (Kpombrekou-A and Tabatabai, 1994; Rodriguez and Fraga, 1999).

UFLA 03-08 (*Rhizobium tropici*) was the only strain that was able to solubilize  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  and achieved a moderate solubilization index, which occurred in the medium containing glucose, indicating that glucose promotes greater solubilization. This solubilization index was higher than the values found for the species of *Rhizobium* derived from *Crotalaria retusa* and *C. verrucosa* that were inoculated in solid Pikovskaya culture medium (Pikovskaya, 1948), containing glucose as a carbon source (Sridevi et al., 2007).

In the liquid medium containing glucose, a greater amount of organic acids and, consequently, acidification of the medium, was observed, which contributes to the increased solubilization. Son et al. (2006) also observed that the bacterial species *Pantoea agglomerans* reduced the pH of the medium (2.6), when glucose was used as the carbon source, which consequently resulted in greater solubilization of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . However, these authors did not evaluate the production of organic acids. Studies with *Pseudomonas* sp., *Xanthomonas campestris* and *Rhizobium* sp. also demonstrated that growing bacteria in the presence of glucose results in greater solubilization of insoluble phosphates than



when they are grown in the presence of arabinose, fructose, galactose, mannitol, maltose, sucrose or xylose (Nautiyal, 1999; Sharan et al. 2008; Sridevi and Mallaiah, 2009). When glucose or sucrose was used as the carbon source, fungi caused reduction the pH of the media, which resulted in greater solubilization of phosphate (Relwani et al. 2008) than when fructose, galactose, lactose or xylose was used. In contrast, Ahuja et al. (2007), who were also working with fungi, demonstrated greater solubilization when fructose was used as the carbon source rather than glucose, galactose, lactose, sucrose, glycerol, maltose or mannose.

After glucose, mannitol was the carbon source that resulted in the greatest solubilization of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ; this was related to a reduction in the pH (Figure 2) and production of organic acids (Figure 4). Son et al. (2006) and Sridevi et al. (2007) also found that the greatest solubilization of phosphate occurred in a mannitol-containing medium, followed by glucose-containing medium.

It has been suggested in the literature that the reduction in pH, caused by the production of organic acids and the release of protons, is a basic factor on phosphate solubilization (Sperber, 1958, Whitelaw, 2000, Chen et al., 2006). However, although a negative correlation between pH and phosphate solubilization was observed for lactose, it was not correlated with the production of organic acids. Only the strain UFLA 03-10 (*Paenibacillus kribbensis*) produced 2-keto-gluconic ( $0.28 \text{ mmol L}^{-1}$ ) and tartaric ( $0.32 \text{ mmol L}^{-1}$ ) acids when grown in the presence of this carbon source, which indicates that the production of organic acids is the mechanism used to promote solubilization, when lactose is present in the medium. Interesting, the presence of soluble phosphorus, even in small quantities, did not result in a reduction in pH or in the levels of the eleven organic acids that were evaluated. This finding shows that some other mechanism of solubilization is involved (Illmer and Schinner, 1992; Hamdali et al., 2008) and that these strains have different solubilization

mechanisms that act depending on the carbon source.

Notably, the UFLA 03-08 (*Rhizobium tropici*), UFLA 03-10 (*Paenibacillus kribbensis*) and UFLA 03-106 (*Paenibacillus kribbensis*) strains were able to solubilize  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in the presence of all the four carbon sources studied. Plants secrete a variety of carbohydrates, and glucose is the one secreted in greatest quantities (Krafczyk et al., 1984). Furthermore, cellulose is the most common natural polysaccharide, and it contains most of the  $\text{CO}_2$  that is fixed by plants. Therefore, these strains can increase and maintain the availability of phosphorus for plants in soils with diverse carbon sources, as a result of their ability to promote phosphorus solubilization under variable conditions.

Reduction on pH was observed in the liquid medium containing  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , for the UFLA 03-10 and UFLA 03-106 strains, relative to the control treatment for all tested carbon sources and for the UFLA 03-08 strain in media containing cellulose, glucose and mannitol. In addition, organic acids were detected for all the sources of carbon for all strains. However, there was no solubilization of that inorganic phosphate source. These results indicate that the production of organic acids not always result in  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  solubilization.

## 5 Conclusions

The use of glucose as a carbon source favors the production of organic acids and contributes to increase solubilization of calcium phosphate.

Acidification of the medium is not the mechanism of calcium phosphate solubilization when cellulose is present.

The presence of organic acids in a medium containing iron phosphate and, regardless of the carbon sources does not favor phosphate solubilization.

## References

- Ahuja A, Ghosh SB, D'Souza SF (2007) Isolation of a starch utilizing, phosphate solubilizing fungus on buffered medium and its characterization. *Bioresource Technol* 98:3408–3411
- Alexander M (1961) *Introduction to soil microbiology*. New York and London, John Wiley & Sons
- Berraquero FR, Baya AM, Cormenzana AR (1976) Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *Ars Pharmaceutica* 17:399-406
- Bolan NS, Naidu R, Mahimairaja S, Baskaran S (1994) Influence of low-molecular-weight organic acids on the solubilization of phosphates. *Biol Fertil Soils* 18: 311-319
- Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai WA, Young CC (2006) Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl Soil Ecol* 34:33-41
- Collavino MM, Sansberro PA, Mroginski LA, Aguilar OM (2010) Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biol Fertil Soils* 46:727-738
- Ferreira DF (2008) SISVAR: a program for statistical analysis and teaching. *Rev Symposium* 6: 36-41
- Fred EB, Waksman SA (1928) *Laboratory manual of general microbiology*. New York: McGraw-Hill Book
- Gerretsen FC (1948) The influence of microorganisms on the phosphate intake by the plant. *Plant Soil* 1:51–81
- Halder AK, Mishra AK, Bhattacharyya P, Chakrabartty PK (1990) Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *J Gen Appl Microbiol* 36:81-92
- Hamdali H, Bouizgarne B, Hafidi M, Lebrihi A, Virolle MJ, Ouhdouch Y (2008) Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Appl Soil Ecol* 38: 12-19
- Hariprasad P, Niranjana SR (2009) Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. *Plant Soil* 316:13-24
- Illmer P, Schinner F (1992) Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biology & Biochemistry* 24:389-395

Kpombekou-a K, Tabatabai MA (1994) Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Science* 158:442-453

Krafczyk I, Trolldenier G, Beringer H (1984) Soluble root exudates of maize: Influence of potassium supply and rhizosphere microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* 16: 315-322

Marra LM, Soares CRFS, Oliveira SM, Ferreira PAA, Soares BL, Carvalho RF, Lima JM, Moreira FMS (2012) Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils *Plant and Soil* XX:1-19

Moss GP, Smith PAS, Tavernier D (1994) Glossary of class names of organic compounds and reactive intermediates based on structure. London: International Union of Pure and Applied Chemistry, 1994. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/class/>>. Acesso em: 02 fev. 2012.

Murphy J, Riley JPA (1962) Modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta* 27:31-36

Nautiyal CS (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Letters* 170:265-270

Pikovskaya RI (1948) Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiologiya* 17:362-370

Relwani L, Krishna P, Reddy MS (2008) Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Phosphate Solubilization by a Wild-Type Strain and UV-Induced Mutants of *Aspergillus tubingensis*. *Curr Microbiol* 57:401-406

Rodríguez H, Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* 17:319-339

Sharan A, Shikha, Darmwal NS (2008) Efficient phosphorus solubilization by mutant strain of *Xanthomonas campestris* using different carbon, nitrogen and phosphorus sources. *World J Microbiol Biotechnol* 24:3087-3090

Silva-Filho GN, Vidor C (2000) Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. *Rev Bras Ciên Solo*, 24:311-329

Son HJ, Park GT, Cha MS, Heo MS (2006) Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Technology* 97:204-210, 2006.

Sperber JI (1958) Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. *Australian Journal Agricultural Research* 9:782-787

Sridevi M, Mallaiah KV (2009) Phosphate solubilization by *Rhizobium* strains. Indian J Microbiol 49:98-102

Sridevi M, Mallaiah KV, Yadav NCS (2007) Phosphate solubilization by *Rhizobium* isolates from *Crotalaria* species. J Plant Sciences 2:635-639

Stumm W, Morgan JJ (1995) Aquatic Chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters. 3.ed. Wiley, New York

Sylvester-Bradley R, Asakawa N, Torraca SLA, Magalhães FMM, Oliveira LA, Pereira RM (1982) Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. Acta Amaz 12:15-22

**ARTIGO 2**

**Effect of initial pH of culture medium on the production of  
organic acids and calcium phosphate solubilization**

**Normas da revista Plant and Soil**

**(versão preliminar)**

Leandro Marciano Marra - Silvia Maria de Oliveira - Cláudio Roberto Fonsêca  
Sousa Soares - José Maria de Lima - Fatima Maria de Souza Moreira<sup>(\*)</sup>

-----  
L. M. Marra: C. R. F. S. Soares: P. A. A. Ferreira: B. L. Soares: R. F. de Carvalho: J. M.  
de Lima: F. M. de Souza Moreira<sup>(\*)</sup>  
Postgraduate program of Soil Science - Department of Soil Science, Federal University  
of Lavras, P.O. 3037, 37200-000 Lavras, MG, Brazil. e-mail: [fmoreira@dcs.ufla.br](mailto:fmoreira@dcs.ufla.br)

C. R. F. S. Soares. Federal University of Santa Catarina, CCB-MIP, Campus Trindade,  
P.O. 476, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil.

S. M. de Oliveira: F. M. de Souza Moreira. Postgraduate program of Agricultural  
Microbiology. Department of Biology, Federal University of Lavras, P.O. 3037, 37200-  
000 Lavras, MG, Brazil

**Resumo**

O pH do meio influencia diretamente o crescimento dos microrganismos e os processos bioquímicos realizados por eles. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do pH inicial do meio de cultura na produção de ácidos orgânicos de baixo peso molecular e, conseqüentemente, na solubilização de fosfato de cálcio por bactérias, em meio NBRIP. As estirpes utilizadas foram a UFLA 03-08 (*Rhizobium tropici*), UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp), UFLA 03-10 (*Paenibacillus kribbensis*), UFLA 03-106 (*Paenibacillus kribbensis*) e UFLA 03-116 (*Paenibacillus* sp) obtidas de nódulos de feijão caupi. Os tratamentos consistiram na variação do pH inicial do meio NBRIP: 5,0; 6,0 e 7,0. Além de verificar a capacidade destas estirpes em solubilizar  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  em meio NBRIP sólido e líquido, avaliou-se a produção de onze ácidos orgânicos comumente associados à solubilização de fosfatos por microrganismos: 2-cetoglucônico, cítrico, glucônico, láctico, málico, maléico, malônico, oxálico, propiônico, succínico e tartárico. As estirpes UFLA 03-08, UFLA 03-09, UFLA 03-10 e UFLA 03-106 solubilizaram  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , no meio líquido, independentemente do valor inicial do pH, sem, no entanto, haver diferenças entre os tratamentos. Para essas estirpes, foi verificada a produção de ácidos orgânicos, também para todos os valores iniciais de pH, mas apresentando diferenças significativas entre os tratamentos. As estirpes UFLA 03-09 e UFLA 03-10 produziram os mesmos ácidos para os diferentes valores iniciais de pH do meio de cultura. A estirpe UFLA 03-116 (*Paenibacillus* sp) foi a única a não produzir ácidos orgânicos em nenhuma das condições de cultivo. Não houve correlação entre a quantidade de fósforo solubilizado do  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  no meio NBRIP líquido e a concentração de ácidos orgânicos totais, para os diferentes valores iniciais de pH. O valor do pH inicial do meio de cultura influencia a produção de ácidos orgânicos pelas estirpes UFLA 03-08, UFLA 03-09, UFLA 03-10 e UFLA 03-106, mas não influencia a solubilização de fosfato de cálcio.

**Palavras chaves:** quelação; propiônico; 2-cetoglucônico; glucônico; solos tropicais

**Abstract**

The pH of the culture medium directly influences the growth of microorganisms and the chemical processes that they perform. The aim of this study was to assess the influence of the initial pH of the culture medium on the production of low-molecular-weight organic acids and on the solubilization of calcium phosphate by bacteria in National Botanical Research Institute's growth medium (NBRIP). The following strains from cowpea nodules were used: UFLA (Lavras Federal University – Universidade Federal de Lavras) 03-08 (*Rhizobium tropici*), UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp.), UFLA 03-10 (*Paenibacillus kribbensis*), UFLA 03-106 (*P. kribbensis*) and UFLA 03-116 (*Paenibacillus* sp.). In addition to verifying the ability of these strains to solubilize  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in NBRIP solid and liquid medium, we assessed the production of 11 organic acids usually associated with the solubilization of phosphates by microorganisms: 2-ketogluconic acid, citric acid, gluconic acid, lactic acid, malic acid, maleic acid, malonic acid, oxalic acid, propionic acid, succinic acid and tartaric acid. The strains UFLA 03-08, UFLA 03-09, UFLA 03-10 and UFLA 03-106 solubilized  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in liquid medium independent of the initial pH, although without a significant difference between the treatments. The production of organic acids by these strains was assessed for all of the initial pH values investigated, and differences between the treatments were observed. Strains UFLA 03-09 and UFLA 03-10 produced the same acids at different initial pH values of the culture medium. UFLA 03-116 (*Paenibacillus* sp.) was the only strain that did not produce organic acids under any culture condition. There was no correlation between phosphorus solubilized from  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in NBRIP liquid medium and the concentration of total organic acids at the different initial pH values. Therefore, the initial pH of the culture medium influences the production of organic acids by the strains UFLA 03-08, UFLA 03-09, UFLA 03-10 and UFLA 03-106 but it does not affect calcium phosphate solubilization.

**Key words:** chelation, propionic, 2-cetoglucônico, gluconic, tropical soils



## 1 Introduction

Acidity has a direct effect on the activity of the soil microorganisms involved in a variety of processes, including organic matter decomposition, mineralization, immobilization, ammonification, nitrification, volatilization, biological nitrogen fixation and insoluble inorganic phosphate solubilization. Therefore, acidity is a chemical property of soils that plays a central role in agriculture.

Biological, chemical and physical factors may interfere with the ability of soil microorganisms to solubilize insoluble inorganic phosphates. In many cases, acidification is the main mechanism involved in phosphate solubilization. A significant negative correlation between the pH of the culture medium and phosphate solubilization by several genera and species of microorganisms was demonstrated by Illmer and Schinner (1992) ( $r = -0.49$ ), Chen et al. (2006) ( $r = -0.80$ ), and Marra et al. (2011) ( $r = -0.89$ ). *Arthrobacter* sp. solubilized 519.7 mg P L<sup>-1</sup> when the pH of the culture medium decreased from 6.8 to 4.9 (Chen et al., 2006). In contrast, several studies have shown phosphate solubilization without a significant negative correlation with culture medium pH. For example, *Pseudomonas* sp. solubilized 31.0 mg P L<sup>-1</sup> with no alteration of the culture medium, which was at an initial pH of 6.0 (Hariprasad and Niranjana, 2009). Narsian et al. (1995) also reported lack of correlation between pH and Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> solubilization by *Aspergillus aculeatus* after a 7 day incubation.

Phosphate solubilization depends not only on the decrease of the culture medium pH but also on other factors, such as the type and concentration of the organic acids secreted by microorganisms. Under the same culture conditions, *Arthrobacter* sp. solubilized 111.7 mg P L<sup>-1</sup> as the culture medium pH was lowered from 7.0 to 4.5, whereas *Enterobacter* sp. solubilized 632.6 mg P L<sup>-1</sup> when the culture medium pH decreased from 7.0 to 4.3 (Yi et al., 2008).

Besides promoting a decrease in the pH of the medium, low-molecular-weight organic acids also chelate metals in solution, which increases the phosphorus available to plants. The degree of chelation depends on the type of organic acid involved, the number and proximity of carboxyl groups, the type of metal and the pH of the solution (Jones, 1998).

Only one study by Chaiharn and Lumyong (2009) has assessed the influence of the initial pH of the growth medium on phosphate solubilization; however, these authors did not assess the production of organic acids.

Therefore, in this study, we sought to assess the influence of the initial pH of the culture medium on the production of low-molecular-weight organic acids and on the solubilization of calcium phosphate.

## **2 Materials and Methods**

### **2.1 Strains**

The strains UFLA 03-08 (*Rhizobium tropici*), UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp.), UFLA 03-10 (*Paenibacillus kribbensis*), UFLA 03-106 (*P. kribbensis*) and UFLA 03-116 (*Paenibacillus* sp.) were individually examined for their ability to grow in medium 79 (Fred and Waksman, 1928) at different initial pH values, specifically, 5.0, 6.0 and 7.0. All strains were isolated from cowpea nodules. The strains UFLA 03-08, UFLA 03-09 and UFLA 03-10 demonstrated efficiency in biological nitrogen fixation and solubilization of  $\text{CaHPO}_4$  or  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , the UFLA 03-106 strain solubilized  $\text{CaHPO}_4$  and  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and the UFLA 03-116 strain served as negative control for calcium phosphate solubilization (Marra et al., 2012). The strains were streaked on plates containing the culture medium and incubated at 28 °C for 10 days. At the end of

this period, the presence or absence of growth was assessed. The study design was completely randomized and included three replicates.

## **2.2 Solubilization of calcium phosphate and production of organic acids**

Two experiments were performed to verify the ability of the above strains to solubilize insoluble inorganic phosphate from calcium phosphate in National Botanical Research Institute's solid and liquid growth media (NBRIP) (Nautiyal, 1999) containing 10 g L<sup>-1</sup> glucose, 5 g L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0.25 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.2 g L<sup>-1</sup> KCl and 0.1 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. NBRIP medium was supplemented with Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> to a final concentration of 1000 mg of phosphorus per L in the solid medium and 100 mg of phosphorus per L in the liquid medium; different initial pH values were adjusted: 5.0, 6.0 and 7.0.

To produce and standardize inocula, the strains were inoculated into liquid medium 79 (Fred and Waksman, 1928) containing 0.5 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.1 g L<sup>-1</sup> NaCl, 10.0 g L<sup>-1</sup> mannitol and 0.4 g L<sup>-1</sup> yeast extract, pH 6.8. Strains were incubated with shaking (110 rpm) at room temperature under aerobic conditions. Readings were performed periodically on a spectrophotometer at a wavelength of 560 nm until an optical density (OD) of 0.5 was reached, which was equal to approximately 10<sup>8</sup> cells per mL. A 0.85% saline solution was used to adjust cells to the desired density when the OD exceeded 0.5.

For assessment in solid NBRIP medium, Petri dishes containing NBRIP medium at each initial pH condition were inoculated in quadruplicate with 20 µL aliquots of each culture (strain) at an OD of 0.5. The control treatment consisted of non-inoculated NBRIP medium. The culture dishes were incubated at 28 °C, the diameter of the solubilization halo (translucent area surrounding colonies) was measured at the beginning of solubilization and after a 15 day

incubation using a digital paquimeter, and the Solubilization Index (SI) was expressed as halo diameter (mm) / colony diameter (mm) was calculated (Berraquero et al. 1976). The investigated strains were classified based on their SI as demonstrating low ( $SI < 2.00$ ), intermediate ( $2.00 < SI < 4.00$ ) and high ( $SI > 4.0$ ) solubilization capacities.

For assessment in liquid NBRIP medium, a 1 mL aliquot of culture medium 79 with an OD of 0.5 at 560 nm was inoculated into a 125 mL Erlenmeyer flask containing 50 mL of NBRIP medium at different initial pH values. The flasks were incubated at 28 °C with shaking at 130 rpm for 10 days. Subsequently, the samples were centrifuged (19,187 g for 5 min), and the pH was measured, as well as the amount of soluble phosphorus in the supernatant using the phosphomolybdate method (Murphy and Riley, 1962). In addition, the organic acids produced in the medium were quantified. For each initial pH value, a non-inoculated control was assessed. The ability of each strain to solubilize phosphate was calculated as the difference between the concentration of soluble phosphorus in the culture medium of samples that had been inoculated with bacterial strains and that of the non-inoculated control treatment.

High-performance liquid chromatography (HPLC) (Agilent HP Series 1100) was used to identify and quantify organic acids. Samples were collected, filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  cellulose membrane and injected into a Supelcogel C-610H 9  $\mu\text{m}$  chromatographic column measuring 30 cm x 7.8 mm. The eleven Merck® pro-analysis organic acids that have been reported in the literature as being involved in solubilization were used as analytical standards. The mobile phase was 0.1%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (pH 1.81) with a 0.5  $\text{mL min}^{-1}$  flow rate and a 100  $\mu\text{L}$  injection per sample. The method was according manufacturer (SUPELCO/SIGMA ALDRICH) of the column Supelcogel. The acquisition time of the chromatograms was estimated to be 30 minutes with 30 minutes intervals between runs. Detection was performed by UV at 210 nm with a diode

array detector (DAD). The molecules identified and their typical retention times (Figure 1) were as follows: oxalic acid (10.10 min), 2-ketogluconic acid (12.10 min), citric acid (12.40 min), gluconic acid (13.04 min), maleic acid (13.33 min), tartaric acid (13.45 min), malic acid (14.85 min), malonic acid (15.23 min), lactic acid (17.89 min), succinic acid (17.91 min) and propionic acid (25.08 min). The quantification of acids was performed using calibration curves of the standards.

The experiment with NBRIP liquid medium was performed in independent assays for each initial pH value with a completely randomized design and two replicates. The results were evaluated by variance analysis using Sisvar (version 4.6) (Ferreira, 2008), and means were compared using the Scott-Knott test at 5%.

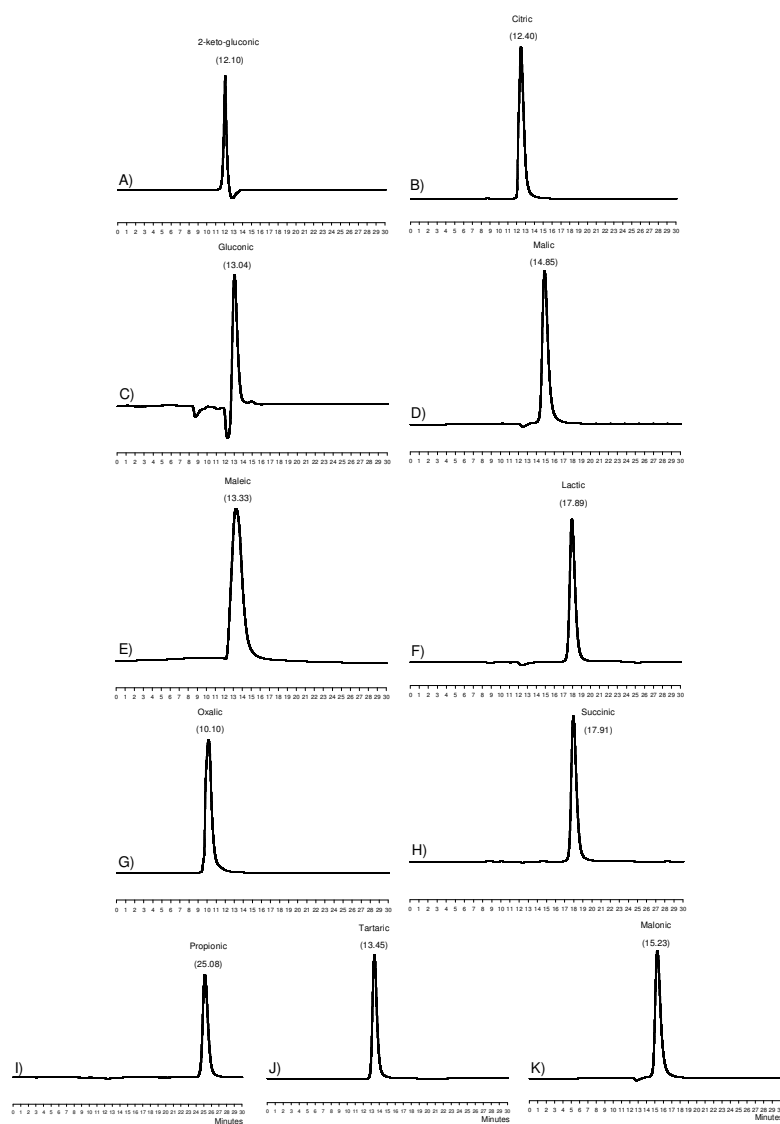


Figure 1 Retention time of organic acids studied. Numbers in parentheses correspond to the retention time in minutes, the pure acid (Chromatograms - A: 2-keto-gluconic; B: Citric C: gluconic, D: malic, E: maleic, F: lactic, G: oxalic, H: succinic, I: propionic, J: tartaric, K: malonic)

### 3 Results

All strains grew in culture medium 79 at all of the initial pH values studied (Table 1).

Table 1 Growth of strains in culture medium 79 with mineral salts and yeast and with different initial values of pH after 10 days of incubation at 28 °C

Strains	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.0
UFLA 03-08 ( <i>Rhizobium tropici</i> )	+	+	+
UFLA 03-09 ( <i>Acinetobacter</i> sp.)	+	+	+
UFLA 03-10 ( <i>Paenibacillus kribbensis</i> )	+	+	+
UFLA 03-106 ( <i>Paenibacillus kribbensis</i> )	+	+	+
UFLA 03-116 ( <i>Paenibacillus</i> sp.)	+	+	+

(+) grew.

In solid NBRIP medium, the strain UFLA 03-116 did not solubilize  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  at any of the initial pH values studied. The other strains did solubilize  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  at all pH values and exhibited low SI after a 15-day incubation. The only exception was the strain UFLA 03-08 (*R. tropici*), which demonstrated an intermediate SI at all of the investigated initial pH values (Table 2).

Table 2 Solubilization index of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in solid NBRIP medium with different initial values of pH for strains obtained from nodules of cowpea, after 3 and 15 days of incubation at 28 °C

Strains	pH 5.0		pH 6.0		pH 7.0	
	3 days	15 days	3 days	15 days	3 days	15 days
UFLA 03-08 <sup>(1)</sup>	1.39 <sup>(6)</sup>	2.56	1.42	2.41	1.43	2.47
UFLA 03-09 <sup>(2)</sup>	1.13	1.66	1.34	1.79	1.32	1.66
UFLA 03-10 <sup>(3)</sup>	1.17	1.15	1.13	1.10	1.25	1.12
UFLA 03-106 <sup>(3)</sup>	1.19	1.43	1.17	1.50	1.32	1.68
UFLA 03-116 <sup>(4)</sup>	GNS <sup>(5)</sup>		GNS		GNS	

<sup>(1)</sup>*Rhizobium tropici*. <sup>(2)</sup>*Acinetobacter* sp. <sup>(3)</sup>*Paenibacillus kribbensis*. <sup>(4)</sup>*Paenibacillus* sp. <sup>(5)</sup>GNS= Grew and did not solubilize. <sup>(6)</sup> S.I. = halo diameter (mm) / colony diameter (mm), evaluated after 3 and 15 days of incubation.

In liquid NBRIP medium, the strain UFLA 03-116 (*Paenibacillus* sp.) exhibited the same behavior as in the solid medium and did not solubilize  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  at any initial pH value, and the pH of the medium did not change from its initial value (Figure 2). The strains UFLA 03-08 (*R. tropici*), UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp.), UFLA 03-10 (*P. kribbensis*) and UFLA 03-106 (*P. kribbensis*) solubilized  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  at all initial pH values in liquid NBRIP medium, with no difference being observed in the amount of soluble phosphorus among the different initial pH values of the medium. It is worth noting that more than 60% (as much as 77% in some cases) of insoluble inorganic phosphate ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) was solubilized by these strains.

For most strains, the initial pH of 5.0 did not change after a 10-day incubation nor it differed from the control (Figure 2); the only exception was the strain UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp.) in which the pH decreased to less than 4.0. At initial pH values of 6.0 and 7.0, the pH decreased after a 10-day incubation among all the strains where solubilization occurred. The greatest difference was found at the initial pH of 7.0, which decreased to less than 4.0 for the UFLA 03-09 strain. A significant negative correlation was found between the amount of soluble phosphorus and the pH of the culture medium at the initial pH of 5.0 ( $R^2 = -0.59$ ), 6.0 ( $R^2 = -0.72$ ) and 7.0 ( $R^2 = -0.82$ ) (Figure 3).



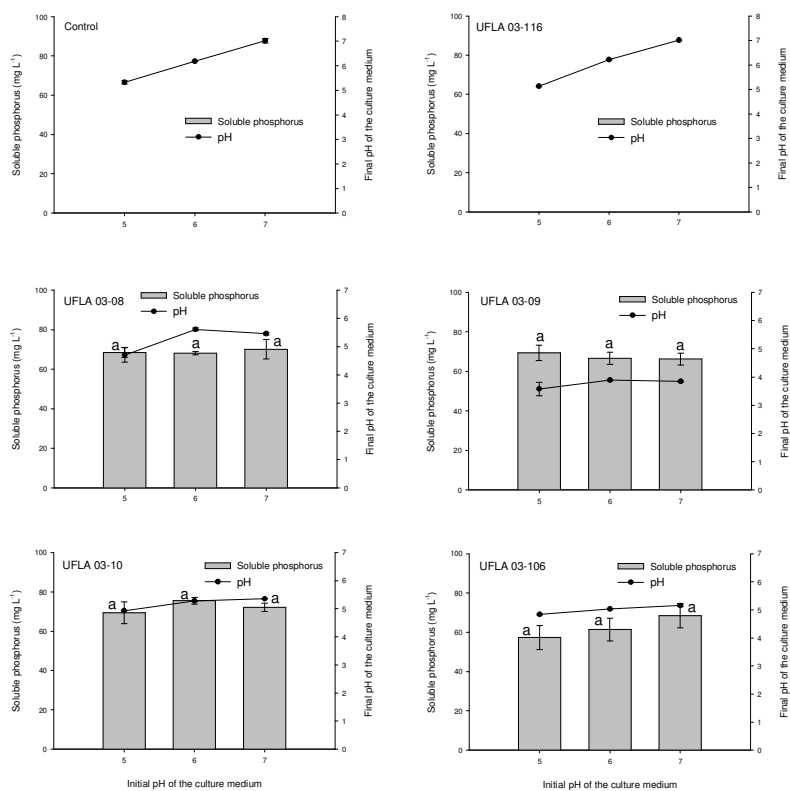


Figure 2 Soluble phosphorus ( $\text{mg L}^{-1}$ ) and pH in liquid medium NBRIP after 10 days of incubation with bacterial strains in the presence of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  for different initial values of pH. Error bars represent the standard errors of the means,  $n = 2$

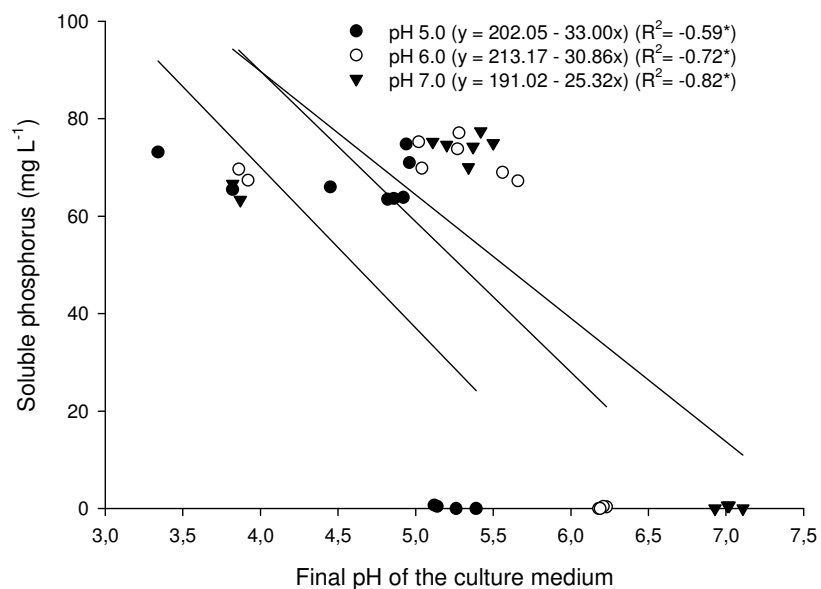


Figure 3 Pearson's correlation between the final pH of the medium NBRIP liquid and the concentration of soluble phosphorus in the presence of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  for different initial values of pH (5.0, 6.0 and 7.0) after 10 days of incubation with strains bacterial (n = 12)

With respect to the identification and quantification of organic acids, the strains UFLA 03-08, UFLA 03-09, UFLA 03-10 and UFLA 03-106 produced organic acids in the culture media at all of the initial pH values studied (Figure 4). For the strain UFLA 03-08 (*R. tropici*), the highest total acid concentration (malic acid,  $18.90 \text{ mmol L}^{-1}$ ) was found at an initial pH of 7.0; for this strain, acid production varied with the initial pH of the culture medium (Figure 5 – Chromatograms G, H and I).

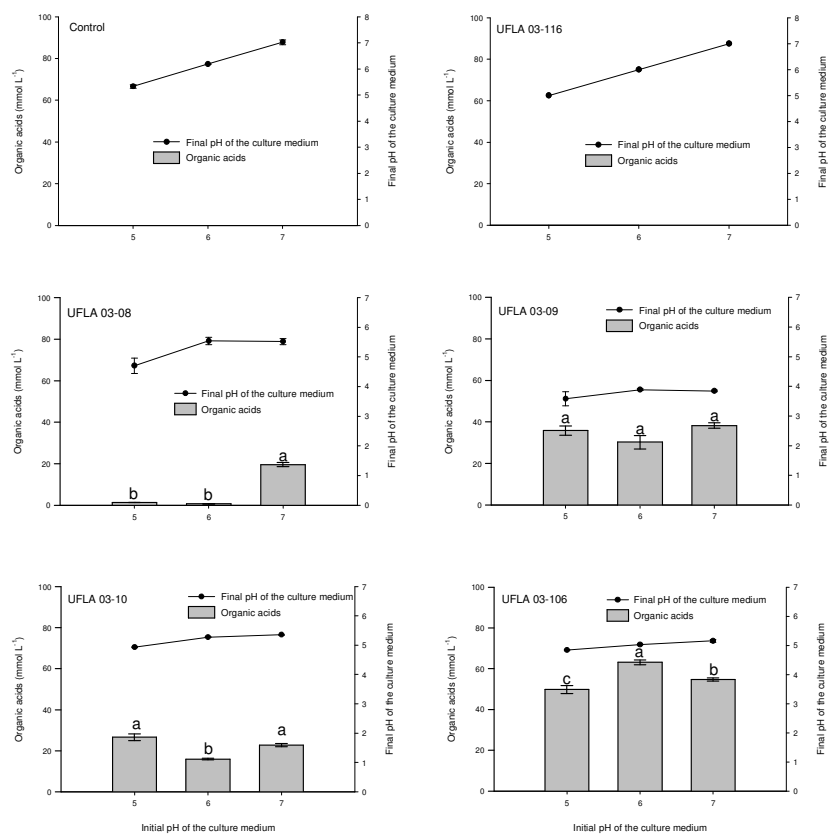


Figure 4 Total organic acids (mmol L<sup>-1</sup>) and pH in liquid NBRIP medium after 10 days of incubation with bacterial strains in the presence of Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> for different initial values of pH (5.0, 6.0 and 7.0). Error bars represent the standard errors of the means, n = 2

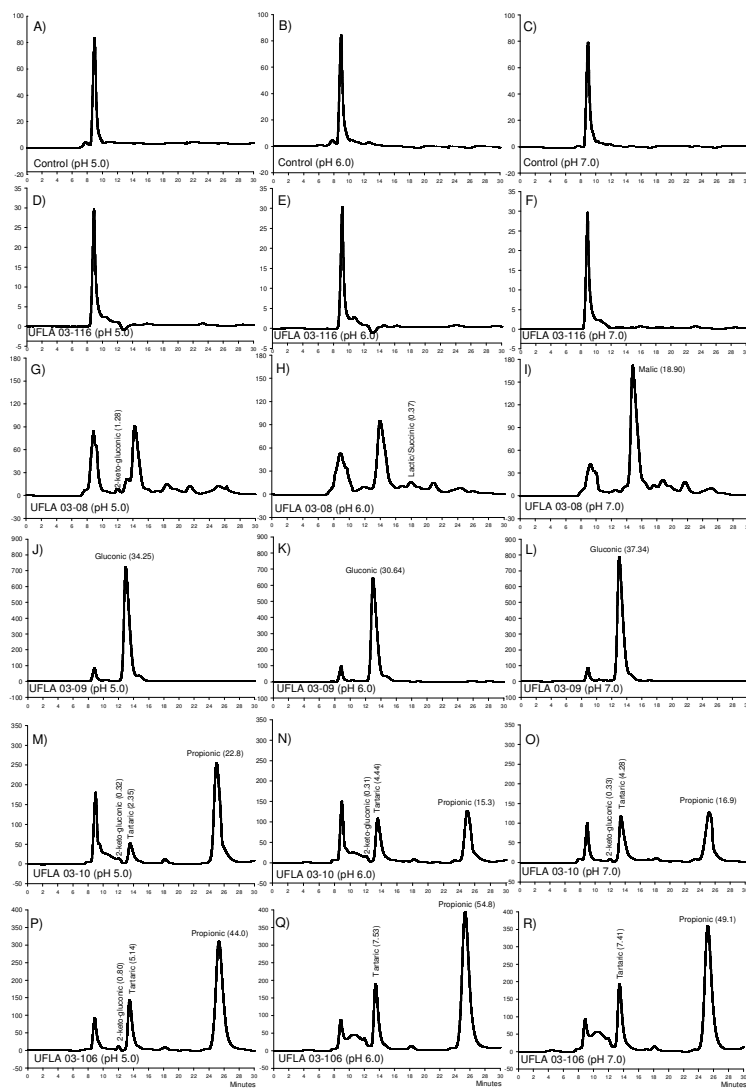


Figure 5 Identification and quantification of organic acids produced in liquid NBRIP culture medium at different initial pH values, inoculated with different bacterial strains. Numbers in parentheses correspond to acid concentration ( $\text{mmol L}^{-1}$ ). (Chromatograms - **A**: control/pH 5.0; **B**: control/pH 6.0; **C**: control/pH 7.0; **D**: UFLA 03-116/pH 5.0; **E**: UFLA 03-116/pH 6.0; **F**: UFLA 03-116/pH 7.0; **G**: UFLA 03-08/pH 5.0; **H**: UFLA 03-08/pH 6.0; **I**: UFLA 03-08/pH 7.0; **J**: UFLA 03-09/pH 5.0

**K:** UFLA 03-09/pH 6.0; **L:** UFLA 03-09/pH 7.0; **M:** UFLA 03-10/pH 5.0; **N:** UFLA 03-10/pH 6.0; **O:** UFLA 03-10/pH 7.0; **P:** UFLA 03-106/pH 5.0; **Q:** UFLA 03-106/pH 6.0; **R:** UFLA 03-106/pH 7.0)

The strain UFLA 03-10 (*P. kribbensis*) produced 2-ketogluconic, tartaric, and propionic acids at all of the initial pH values studied; however, the highest total acid concentration was found in the culture media with initial pH values of 5.0 and 7.0 (Figures 4 and 5). The strain UFLA 03-106 (*P. kribbensis*) also produced tartaric and propionic acid at all of the initial pH values but the pH of 5.0 in which 2-keto-gluconic acid was also detected. For this strain, the highest total acid concentration was found in the medium with the initial pH of 6.0 (Figures 4 and 5).

For the strain UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp.), the only acid detected was the gluconic acid, at pH values of 5.0 (34.25 mmol L<sup>-1</sup>), 6.0 (30.64 mmol L<sup>-1</sup>) and 7.0 (37.34 mmol L<sup>-1</sup>), which indicates consistency in the production of acids independent of the initial pH of the growth medium.

The UFLA 03-116 (*Paenibacillus* sp.) was the only strain that did not produce any organic acids under any culture condition and, therefore, it exhibited the same behavior as the control treatment; the chromatograms show a peak at a retention time of 8.91 min, which differs from all the retention times exhibited by the acids in this study (Figures 1 and 5). It is worth noting that this peak was also present in all of the other treatments and does not interfere with the identification and quantification of the acids studied. Under these treatment conditions, citric acid, oxalic acid, maleic acid and malonic acid were not found.

Considering all of the initial pH values, the highest total acid concentration was produced by the strain UFLA 03-106 (167.7 mmol L<sup>-1</sup>), with the lower concentrations being produced by UFLA 03-09 (104.4 mmol L<sup>-1</sup>), UFLA 03-10 (65.35 mmol L<sup>-1</sup>), and UFLA 03-08 (21.52 mmol L<sup>-1</sup>). Considering all of the strains, the highest total acid concentration was found at pH 7.0 (135.2

mmol L<sup>-1</sup>), with lower concentrations being detected at pH 5.0 (113.65 mmol L<sup>-1</sup>) and pH 6.0 (110.0 mmol L<sup>-1</sup>).

#### 4 Discussion

The pH of the culture medium directly influences the growth of microorganisms and the biochemical processes they perform. In many cases, acidification is the main mechanism involved in phosphate solubilization (Halder et al., 1990; Whitelaw, 2000; Jha et al., 2009; Marra et al., 2011; Marra et al., in press). However, several studies have shown a lack of correlation between solubilized phosphorus and pH of the medium (Xie et al., 2009; Chaihan and Lumyong, 2009). Therefore, a better understanding of the behavior of phosphate-solubilizing bacteria inoculated into culture media at different initial pH values may contribute to the production and management of inoculants that improve crop production.

Our results showed that in both solid and liquid NBRIP medium, the initial pH did not affect the solubilizing activity of strain UFLA 03-116 (*Paenibacillus* sp.) because it was not able to solubilize Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> under these conditions. These results reveal that the inability to solubilize phosphate under these conditions is intrinsic to this strain, because it grew on solid medium, which was visible in Petri dishes, and liquid medium, as was verified by the presence of bacterial biomass during the centrifugation process. Studies performed with this same strain of *Paenibacillus* sp. in solid and liquid GELP medium (Sylvester-Bradley et al., 1982) at an initial pH of 7.0 also demonstrated its inability to solubilize CaHPO<sub>4</sub>, Al(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> and FePO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O. The only exception was for FePO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O in liquid medium; for this phosphate, more than 20% of the phosphorus was solubilized (Marra et al., 2012). An initial pH of 7.0

in GELP medium may contribute to the solubilization of  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  by strain UFLA 03-116 (*Paenibacillus* sp.).

With respect to the strains that solubilized  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , UFLA 03-08 (*R. tropici*) was the only one to have an intermediate SI, which occurred at all of the initial pH values studied, after a 15-day incubation at 28 °C. These SI values were higher than those reported for *Rhizobium* species obtained from *Crotalaria retusa* and *Crotalaria verrucosa* inoculated onto solid Pikovskaya culture medium (Pikovskaya, 1948) at an initial pH of 7.0 (Sridevi et al., 2007), thereby demonstrating that pH does not interfere with solubilization by this strain.

Conversely, the low SI exhibited by the strains UFLA 03-09, UFLA 03-10 and UFLA 03-106 on solid medium contrasts with that of liquid medium in which these strains solubilized significant quantities of phosphates.

The strains UFLA 03-08 (*R. tropici*), UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp.), UFLA 03-10 (*P. kribbensis*) and UFLA 03-106 (*P. kribbensis*) solubilized  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  to a similar degree (more than 60%) at all of the initial pH values of NBRIP medium studied. UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp.) was the only strain that decreased the pH during all treatments, which may be related to its production of gluconic acid. Chaiharn and Lumyong (2009) found that after a 5-day incubation of *Acinetobacter* sp. in nutrient broth with an initial pH of 7.0 or 9.0, the pH of the medium decreased, but the pH increased to 6.17 in medium with an initial pH of 5.0; nevertheless, solubilization of calcium occurred. However, these authors did not assess the production of organic acids.

Several authors have suggested that a decrease in pH due to the production of organic acids and the release of protons is a basic principle of phosphate solubilization, (Sperber, 1958; Whitelaw, 2000; Chen et al., 2006). However, the strains UFLA 03-08, UFLA 03-10 and UFLA 03-106 did not decrease the initial pH of 5.0 after a 10-day incubation, thereby demonstrating that acidification is not the mechanism used to promote solubilization at this

initial pH, even when organic acids are produced in different concentrations. In this case, the acids may be present in anionic forms and therefore do not function in medium acidification but, rather, in  $\text{Ca}^{2+}$  chelation (Jones, 1998; Whitelaw, 2000). Moreover, the strain UFLA 03-08 at an initial pH of 6.0 exhibited efficient solubilization, with a decrease of pH but producing a low concentration of lactic/succinic acid ( $0.37 \text{ mmol L}^{-1}$ ). This result indicates that other solubilization mechanisms are involved and that this strain utilizes different mechanisms when the pH of the medium varies.

Conversely, medium acidification occurred at initial pH of 6.0 and 7.0, after a 10-day incubation, followed by the production of lactic/succinic and malic acids by the strain UFLA 03-08, 2-keto-gluconic, tartaric and propionic acid by the strain UFLA 03-10, and tartaric and propionic acids by the UFLA 03-106. Propionic acid was produced to the greatest degree by the latter two strains.

The strains UFLA 03-08, UFLA 03-09, UFLA 03-10 and UFLA 03-106 solubilized  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  at all three initial pH values studied. Brazilian soils usually exhibit acidic pH values, often varying between 5.0 and 6.5, and the practice of liming aims to reach pH 5.5-6.5. Therefore, these strains may increase and maintain the availability of phosphorus to plants across a wide variety of soil management the process of solubilization itself is not altered by the presence of these strains. Besides contributing to solubilization, the production of certain acids by these strains may also serve as a readily accessible source of carbon for these microorganisms (Jones, 1998).



## 5 Conclusions

The initial pH of the culture medium influences the production of organic acids by the strains UFLA 03-08, UFLA 03-09, UFLA 03-10 and UFLA 03-106 but they do not promote the solubilization of calcium phosphate.

Medium acidification is not the mechanism by which the strains UFLA 03-08, UFLA 03-10 and UFLA 03-106 solubilize calcium phosphate when the initial pH at médium is 5.0.

This study demonstrated that the strains UFLA 03-09 and UFLA 03-10 produced the same acids when the culture medium exhibited different initial pH values.

## References

- Berraquero FR, Baya AM, Cormenzana AR (1976) Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *Ars Pharmaceutica* 17:399-406
- Chaiharin M, Lumyong S (2009) Phosphate solubilization potential and stress tolerance of rhizobacteria from rice soil in Northern Thailand. *World J Microbiol Biotechnol* 25:305-314
- Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai WA, Young CC (2006) Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl Soil Ecol* 34:33-41
- Ferreira DF (2008) SISVAR: a program for statistical analysis and teaching. *Rev Symposium* 6:36-41
- Fred EB, Waksman SA (1928) *Laboratory manual of general microbiology*. New York: McGraw-Hill Book
- Halder AK, Mishra AK, Bhattacharyya P, Chakrabartty PK (1990) Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *J Gen Appl Microbiol* 36:81-92
- Hari Prasad P, Niranjana SR (2009) Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. *Plant Soil* 316:13-24

Illmer P, Schinner F (1992) Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 24:389-395

Jha BK, Pragash MG, Cletus G, Raman G, Sakthivel N (2009) Simultaneous phosphate solubilization potential and antifungal activity of new fluorescent pseudomonad strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. plecoglossicida* and *P. mosselii*. *World J Microbiol Biotechnol* 25:573-581

Jones DL (1998) Organic acids in the rhizosphere: a critical review. *Plant Soil* 205:25-44

Marra LM, Oliveira SM, Soares CRFS, Moreira FMS (2011) Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. *Sci Agri* 68:603-609

Marra LM, Soares CRFS, Oliveira SM, Ferreira PAA, Soares BL, Carvalho RF, Lima JM, Moreira FMS (2012) Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils *Plant and Soil* XX:1-19

Murphy J, Riley JPA (1962) Modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta* 27:31-36

Narsian V, Thakkar J, Patel HH (1995) Mineral phosphate solubilization by *Aspergillus aculeatus*. *Indian J Exp Biol* 33:91-93

Nautiyal CS (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Letters* 170:265-270

Pikovskaya RI (1948) Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiologiya* 17:362-370.

Sperber JI (1958) Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. *Australian Journal Agricultural Research* 9:782-787

Sridevi M, Mallaiah KV, Yadav NCS (2007) Phosphate solubilization by *Rhizobium* isolates from *Crotalaria* species. *J Plant Sciences* 2:635-639

Sylvester-Bradley R, Asakawa N, Torraca SLA, Magalhães FMM, Oliveira LA, Pereira RM (1982) Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amaz* 12:15-22

Whitelaw MA (2000) Growth promotion of plant inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Adv Agron* 69:99-151

Xie J, Knight JD, Leggett ME (2009) Comparison of media used to evaluate *Rhizobium leguminosarum* bivar *viciae* for phosphatesolubilizing ability. *Can J Microbiol* 55:910-915

Yi Y, Huang W, Ge H (2008) Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. *World J Microbiol Biotechnol* 24:1059-1065

**ARTIGO 3**

**Bactérias solubilizadoras de fosfatos na contribuição do  
crescimento de leguminosas e gramíneas**

**Normas da revista Plant and Soil  
(versão preliminar)**

Leandro Marciano Marra - Silvia Maria de Oliveira - Cláudio Roberto Fonsêca  
Sousa Soares - José Maria de Lima - Fatima Maria de Souza Moreira<sup>(\*)</sup>

-----  
L. M. Marra: C. R. F. S. Soares: P. A. A. Ferreira: B. L. Soares: R. F. de Carvalho: J. M.  
de Lima: F. M. de Souza Moreira<sup>(\*)</sup>

Postgraduate program of Soil Science - Department of Soil Science, Federal University  
of Lavras, P.O. 3037, 37200-000 Lavras, MG, Brazil. e-mail: [fmoreira@dcs.ufla.br](mailto:fmoreira@dcs.ufla.br)

C. R. F. S. Soares. Federal University of Santa Catarina, CCB-MIP, Campus Trindade,  
P.O. 476, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil.

S. M. de Oliveira: F. M. de Souza Moreira. Postgraduate program of Agricultural  
Microbiology. Department of Biology, Federal University of Lavras, P.O. 3037, 37200-  
000 Lavras, MG, Brazil

**Resumo**

O fósforo é o nutriente que mais limita o crescimento das plantas e na maioria dos solos encontra-se em baixa disponibilidade, sendo necessária a aplicação de altas dosagens de adubos fosfatados para a obtenção de altas produtividades, tornando-se assim, um dos fatores mais limitantes à produtividade agrícola. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a contribuição no crescimento e nutrição fosfatada de leguminosas e gramíneas, em vaso de Leonard e vaso com solo, por bactérias solubilizadoras de fosfatos. Em condições estéreis, os tratamentos consistiram da inoculação das estirpes UFLA 03-08, UFLA 03-09, UFLA 03-10, UFLA 03-106 e UFLA 03-116, separadamente, em vasos Leonard contendo, na parte superior, 0,25 g de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  e quatro controles, sem inoculação, três com as seguintes concentrações de fósforo solúvel: 0,775; 7,75 e 15,0 mg de fósforo  $\text{L}^{-1}$  e um, sem inoculação mas com 0,25 g de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Já nas condições não estéreis, os tratamentos consistiram da inoculação das mesmas estirpes, separadamente, em vasos com solo ( $2 \text{ dm}^3$ ) contendo 6,0 g de fosfato natural de Araxá; um controle com o fosfato natural de Araxá sem inoculação; dois controles contendo 150,0 e 300,0 mg vaso<sup>-1</sup> de fósforo solúvel aplicado na forma do adubo super triplo sem inoculação e um controle sem a adição de fósforo solúvel, fosfato natural de Araxá e sem inoculação. Os resultados demonstram variação na contribuição do crescimento das plantas via solubilização de fosfato quando analisadas em condições estéreis e não estéreis, mas ficou evidente a contribuição de microrganismos na promoção do crescimento de leguminosas e gramíneas por meio da melhoria da nutrição fosfatada, nitrogenada e, em alguns casos, melhora da nutrição de diversos macros e micronutrientes. Assim, o uso destas bactérias é indicado para futuros experimentos em condições de campo.

**Palavras chaves:** *Zea mays*, *Phaseolus vulgaris*, *Brachiaria decumbens*, *Vigna unguiculata*, leguminosas, gramíneas, fósforo, fosfatos

**Abstract**

Phosphorus is the biggest limiting nutrient plant growth and in the most soils is low available, needing the application of high phosphate fertilizers dosage to achieve high yields, thus making it one of the most limiting agricultural productivity. The objectives of this study was to evaluate the contribution to the growth and phosphorus nutrition of legumes and grasses, in Leonard pot and pot with soil, using phosphate solubilizing by bacteria. In sterile conditions, the treatments consisted of inoculation with strains UFLA 03-08, UFLA03-09, UFLA 03-10, UFLA 03-106 and UFLA 03-116, separately, in pots containing Leonard, at the top, 0.25 g  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  and four controls, without inoculation, three concentrations following of soluble phosphorus: 0.775, 7.75 and 15.0 mg  $\text{L}^{-1}$  and one, without inoculation but with 0,25 g of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Already non-sterile conditions, the treatments consisted of strains inoculation, separately, in pots with soil ( $2 \text{ dm}^{-3}$ ) containing 6.0 g of natural phosphate Araxá; a control with natural phosphate Araxá without inoculation; two controls containing 150.0 and 300.0 mg  $\text{pot}^{-1}$  of soluble phosphorus applied as the fertilizer triple super without inoculation and a control without the soluble phosphorus addition, natural phosphate Araxá and without inoculation. The results show variation in the growth contribution of plants through phosphate solubilization when analyzed in sterile and non-sterile conditions, but it was evident the contribution of microorganisms to promote the legumes growth and grasses through improved phosphorus nutrition, nitrogen, and some cases, improve the nutrition of various macro and micronutrients. Thus, the bacteria using is indicated for future experiments in field conditions.

**Keywords:** *Zea mays*. *Phaseolus vulgaris*. *Brachiaria decumbens*. *Vigna unguiculata*. Legumes. Grasses. Phosphorus. Phosphates.

## 1 Introdução

As bactérias que apresentam um efeito benéfico no crescimento das plantas são classificadas como bactérias promotoras de crescimento de plantas. Essa promoção do crescimento pode ser realizada por diferentes processos, sendo um deles a solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis, contribuindo com a nutrição fosfatada das plantas.

A utilização de microrganismos solubilizadores de fosfatos para aumentar a disponibilidade de fósforo para as plantas e aumentar seu crescimento tem sido relatada em diferentes culturas e regiões: Chabot et al., (1993) atribuíram uma promoção de crescimento de milho inoculado com *Pseudomonas* e *Enterobacter* spp. à habilidade dessas bactérias em solubilizar fosfatos e produzir sideróforos e auxinas. Eles demonstraram que o uso desses microrganismos aumenta a eficiência na utilização de fósforo e a produtividade das culturas; Chabot et al., (1993, 1996) demonstraram que a inoculação de *Rhizobium* promove a solubilização de fosfatos do solo aumentando a produção de espécies como o milho (*Zea mays*) e a alface (*Lactuca sativa*); Peix et al. (2001) também demonstraram que isolados de *Mesorhizobium mediterraneum* promoveram o crescimento, aumentando a produção de matéria seca, a absorção de N, P, K, Mg e Ca em espécies leguminosas como o grão-de-bico (*Cicer arietinum*) e não leguminosas como a cevada (*Hordeum vulgare*). Em ambos os estudos, os isolados foram eficientes na promoção de crescimento por meio da solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis, ainda que bactérias desse grupo sejam estudadas como fixadoras simbióticas de nitrogênio em leguminosas.

Babana & Antoun (2006) avaliando o crescimento de plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.), em campo, inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfatos e fungos micorrízicos, verificaram que a inoculação promoveu um acúmulo maior de fósforo nos grãos e demonstraram que pela inoculação de

sementes com estes microrganismos, em condições de campo é possível obter rendimentos de trigo comparáveis aos produzidos por meio da utilização do adubo com fósforo solúvel.

Por outro lado, apesar do crescimento da soja ter sido estimulado por estirpe solubilizadora da bactéria *Burkholderia* sp., este não foi correlacionado com o índice de absorção de fósforo (Fernandez et al., 2007). De Freitas et al. (1997) observaram que *Bacillus* e *Xanthomonas* aumentaram a altura e biomassa de plantas de canola (*Brassica napus* L.), mas não aumentaram o teor de fósforo dos tecidos, enquanto Xie (2008) demonstrou que isolados de *Rhizobium leguminosarum* solubilizaram fosfato de cálcio *in vitro*, mas não promoveram o crescimento de plantas de canola nem contribuíram na absorção de fósforo em experimento com solo.

As plantas e os microrganismos absorvem fósforo da solução do solo, portanto, os processos químicos abióticos e bióticos que controlam as transformações e absorção desse elemento são importantes fatores do seu ciclo o que reflete na produtividade das culturas (Moreira & Siqueira, 2006).

Embora o mecanismo exato pelo qual bactérias solubilizadoras de fosfatos estimulam o crescimento de plantas ainda não esteja definido, isso não diminui o potencial de uso desses microrganismos como biofertilizantes. Assim, a seleção de estirpes eficientes na solubilização de fosfatos deve ser baseada na combinação de experimentos em casa de vegetação e em condições de campo, que permitirá gerar resultados mais consistentes com relação à melhoria do estado nutricional das plantas.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a contribuição de bactérias solubilizadoras de fosfatos no crescimento de leguminosas e gramíneas em vaso de Leonard (estéril) e em vaso com solo (não estéril) em casa de vegetação.



## 2 Material e Métodos

### 2.1 Estirpes

Foram testadas, separadamente, as estirpes UFLA 03-08 (*Rhizobium tropici*), UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp.), UFLA 03-10 (*Paenibacillus kribbensis*), UFLA 03-106 (*Paenibacillus kribbensis*) e UFLA 03-116 (*Paenibacillus* sp.) (Tabela 1). Todas foram isoladas de nódulos de feijão caupi, sendo que as estirpes UFLA 03-08 e UFLA 03-09 foram eficientes na fixação biológica de nitrogênio em simbiose com caupi e também na solubilização de  $\text{CaHPO}_4$  em meio de cultura GELP (Sylvester-bradley, et al., 1982), já a estirpe UFLA 03-106 foi eficiente na solubilização de  $\text{CaHPO}_4$  e  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  também em meio GELP, e as estirpes UFLA 03-10 e UFLA 03-116, sendo a primeira nodulífera e eficiente na fixação biológica de nitrogênio em simbiose com caupi e a segunda não nodulífera em feijão caupi, mas solubiliza  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  em meio GELP (Marra et al., 2012).

Tabela 1 Solubilização em meio líquido GELP, nodulação em feijão caupi e identificação das estirpes

Estirpes	Solubilização em meio GELP líquido			Identificação	Nodulação em caupi
	$\text{CaHPO}_4$	$\text{AlH}_6\text{P}_3\text{O}_{12}$	$\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		
UFLA 03-08	+	-	-	<i>Rhizobium tropici</i>	+
UFLA 03-09	+	-	-	<i>Acinetobacter</i> sp.	+
UFLA 03-10	-	-	+	<i>Paenibacillus kribbensis</i>	+
UFLA 03-106	+	-	+	<i>Paenibacillus kribbensis</i>	-
UFLA 03-116	-	-	+	<i>Paenibacillus</i> sp.	-

## 2.2 Culturas

As culturas estudadas nos experimentos em vaso de Leonard e em vaso com solo foram o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) cultivar BRS-MG Talismã, o feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cultivar BR-17 Gurguéia, o milho (*Zea mays*), BR-206 híbrido duplo precoce, e braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf.), formando cada espécie um experimento separado

## 2.3 Contribuição de bactérias solubilizadoras de fosfato no crescimento de leguminosas e gramíneas em vaso de Leonard

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação do Laboratório de Microbiologia do Solo no Departamento de Ciência do Solo na Universidade Federal de Lavras, entre os meses de agosto a dezembro de 2010, empregando vasos de Leonard (Vincent, 1970) (Figura 1). Os tratamentos consistiram da inoculação das cinco estirpes, separadamente, em vasos contendo, na parte superior, 0,25 g de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (Sigma) o que equivale a 50 mg de fósforo  $\text{L}^{-1}$ , e quatro controles, sem inoculação, sendo três com as seguintes concentrações de fósforo solúvel: 0,775 (solução de Hoagland & Arnon dita sem fósforo solúvel); 7,75 (solução de Hoagland & Arnon dita completa) e 15,0 mg de fósforo  $\text{L}^{-1}$  (solução de Hoagland & Arnon com o dobro de fósforo solúvel em relação à completa) e um sem inoculação mas com 0,25 g de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (Sigma). Os experimentos foram arranjados em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições.

A parte superior do vaso de Leonard continha 500  $\text{cm}^3$  da mistura de areia e vermiculita na proporção 1:2 (v/v) e a inferior continha 800 mL de solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) com as seguintes composições por litro de solução: i) para os tratamentos inoculados, o tratamento com 0,775

mg de fósforo solúvel  $L^{-1}$  e o tratamento com 0,25 g de  $Ca_3(PO_4)_2$ :  $NH_4H_2PO_4$  11,5 mg;  $KNO_3$  606,7 mg;  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  944,6 mg;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  493,8 mg;  $NH_4NO_3$  80,0 mg;  $H_2BO_3$  2,86 mg;  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  1,81 mg;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0,22 mg;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0,08 mg;  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$  0,023 mg; Fe-EDTA 1 mL por L solução $^{-1}$ ; ii) para o tratamento com 7,75 mg de fósforo solúvel  $L^{-1}$ :  $NH_4H_2PO_4$  114,0 mg;  $KNO_3$  606,7 mg;  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  944,6 mg;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  493,8 mg;  $H_2BO_3$  2,86 mg;  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  1,81 mg;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0,22 mg;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0,08 mg;  $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$  0,023 mg e Fe-EDTA 1 mL; iii) para o tratamento com 15,0 mg de fósforo solúvel  $L^{-1}$  o reagente  $NH_4H_2PO_4$  foi adicionado em dobro, sendo que os demais seguiram a mesma concentração. Todas as soluções utilizadas foram diluídas quatro vezes apresentando pH na faixa entre 6,5 e 6,7. Após o preparo dos vasos e das soluções nutritivas, estes foram autoclavados por uma hora, à pressão de  $1,5 \text{ kg cm}^{-2}$  a  $127^\circ\text{C}$ .



Figura 1 Vista parcial do experimento em vaso de Leonard

As sementes de feijão comum, feijão caupi e milho foram desinfestadas na superfície com etanol 96% por 30 segundos e hipoclorito de sódio a 2% por 2 minutos. Em seguida estas foram lavadas seis vezes com água destilada esterilizada. Posteriormente, foram colocadas em placas de Petri de 150 mm x 15 mm com algodão e papel filtro umedecidos (autoclavados) por 12 horas em câmara de crescimento a 28 °C. As sementes de braquiária foram previamente imersas em ácido sulfúrico concentrado por 1 minuto e em seguida foram lavadas com água corrente por 12 horas. Posteriormente, elas foram lavadas seis vezes com água destilada esterilizada. Foram semeadas 4 sementes por vaso para o feijão comum, feijão caupi e milho, para a braquiária foram semeadas 12 sementes; em todas as culturas estas estavam pré-germinadas visando o imediato contato das raízes das plantas com as estirpes. 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. Os tratamentos com braquiária foram desbastados a partir do décimo dia após a germinação, deixando-se 8 plantas por vaso. Para as demais plantas o desbaste ocorreu no sexto dia após a germinação, deixando-se somente duas plantas por vaso.

As estirpes foram previamente crescidas em meio 79 (Fred & Waksman, 1928) líquido, num período de três dias sob agitação de 100 rpm a 28 °C. Em seguida inoculou-se um mililitro do meio contendo cerca de  $1 \times 10^8$  células bacterianas  $\text{mL}^{-1}$  em cada semente. Os controles não receberam inoculação.

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 temperatura máxima obtida foi 42 °C e a mínima 13 °C.

O tratamento com braquiária foi conduzido para obtenção de 3 cortes. O feijão comum e milho foram colhidos aos 40 dias após o plantio, o feijão caupi e o primeiro corte da braquiária aos 45 dias após o plantio, já o segundo corte da braquiária ocorreu aos 75 dias após o plantio e o terceiro corte aos 105 dias após o plantio.

## **2.4 Contribuição de bactérias solubilizadoras de fosfato no crescimento de leguminosas e gramíneas em vaso com Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico**

### **2.4.1 Contagem de microrganismos solubilizadores de fosfato no solo**

Uma amostra simples do solo, após aplicação da calagem, foi coletada de diferentes vasos para formar uma amostra composta usada para se estimar o número de microrganismos solubilizadores presente no solo. Foram realizadas dez diluições seriadas da amostra em solução salina (8,5 g L<sup>-1</sup> de NaCl) até a diluição 10<sup>-10</sup>. O espalhamento foi realizado com 100 µL da suspensão das diluições em placas contendo o meio de cultura NBRIP (Nautiyal, 1999). A contagem foi realizada periodicamente até o oitavo dia após inoculação.

### **2.4.2 Condução dos experimentos**

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação do Laboratório de Microbiologia do Solo no Departamento de Ciência do Solo na Universidade Federal de Lavras, entre os meses de abril a julho de 2011 em vasos plásticos com capacidade de 2 dm<sup>3</sup> (Figura 2). O solo utilizado foi um

Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico textura média (Embrapa, 2006), coletado no município de Itumirim-MG em uma área com plantio de braquiária. A coleta foi na camada arável (0 a 20 cm). O solo foi seco ao ar, destorroado, homogeneizado e passado em peneira de 4 mm de abertura. Na tabela 2 encontram-se as características químicas e físicas deste solo.



Figura 2 Vista parcial do experimento em vaso com solo

Tabela 2 Características químicas e físicas do solo estudado

Propriedade	Valor	Classe de interpretação <sup>(1)</sup>
pH (H <sub>2</sub> O)	4,6	Baixo
P <sup>(2)</sup> (mg dm <sup>-3</sup> )	1,2	Muito baixo
K (mg dm <sup>-3</sup> )	19,0	Baixo
Ca (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,1	Muito baixo
Mg (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,1	Muito baixo
Al (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,3	Baixo

...continua...

Tabela 2, Cont.

Al + H (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	2,3	Baixo
SB <sup>(3)</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,2	Muito baixo
(t) <sup>(4)</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,5	Muito baixo
(T) <sup>(5)</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	2,6	Baixo
V <sup>(6)</sup> (%)	9,7	Muito baixo
m <sup>(7)</sup> (%)	54,7	Alta
MO <sup>(8)</sup> (g/kg)	0,6	Muito baixo
P <sub>rem</sub> <sup>(9)</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	39,8	-
Zn (mg dm <sup>-3</sup> )	1,6	Bom
Fe (mg dm <sup>-3</sup> )	17,0	Baixo
Mn (mg dm <sup>-3</sup> )	0,4	Muito baixo
Cu (mg dm <sup>-3</sup> )	0,5	Baixo
B (mg dm <sup>-3</sup> )	0,1	Muito baixo
S (mg dm <sup>-3</sup> )	20,8	Muito bom
Areia (%)	69	-
Silte (%)	4	-
Argila (%)	27	-

<sup>(1)</sup>Ribeiro et al. (1999). <sup>(2)</sup>Método Mehlich-1. <sup>(3)</sup>Soma de bases trocáveis. <sup>(4)</sup>CTC efetiva. <sup>(5)</sup> CTC a pH 7,0. <sup>(6)</sup>Índice de saturação de bases. <sup>(7)</sup>Índice de saturação de alumínio. <sup>(8)</sup>MO = 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. <sup>(9)</sup>Fósforo remanescente.

Foi realizada a calagem, quarenta dias antes do plantio, segundo o método de saturação por bases, de modo a elevar a saturação para 60%, para todas as culturas. 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 aos 24 e 40 DAE.

Os tratamentos consistiram da inoculação das cinco estirpes em vasos com solo (2 dm<sup>-3</sup>) contendo 6,0 g de fosfato natural de Araxá (Apatita – 23% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) o que equivale a 300,0 mg de fósforo vaso<sup>-1</sup>, conforme recomendação que leva em consideração o teor de argila presente no solo (Lopes, 1983; Lopes &

Guilherme, 1994); um controle com o fosfato natural de Araxá (6,0 g vaso<sup>-1</sup>), sem inoculação; dois controles contendo 150,0 (recomendação feita para experimentos em vaso, Malavolta et al., (1997)) e 300,0 mg vaso<sup>-1</sup> de fósforo solúvel aplicado na forma do adubo super triplo (esta última dosagem foi para igualar ao fosfato aplicado via fosfato natural de Araxá); e um controle sem a adição de fósforo solúvel, sem adição de fosfato natural de Araxá e sem inoculação. O fosfato natural de Araxá e o adubo super simples foram aplicados 2 dias antes do plantio. Os experimentos foram arranjados em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições.

As sementes de feijão comum, feijão caupi e milho foram desinfestadas superficialmente com etanol 96% por 30 segundos e hipoclorito de sódio a 2% por 2 minutos. Em seguida estas foram lavadas seis vezes com água destilada esterilizada. Posteriormente, foram colocadas em placas de Petri de 150 mm x 15 mm com algodão e papel filtro umedecidos (autoclavados) por 12 horas em câmara de crescimento a 28 °C. As sementes de braquiária foram previamente imersas em ácido sulfúrico concentrado por 1 minuto e em seguida foram lavadas com água corrente por 12 horas. Posteriormente, foram lavadas seis vezes com água destilada esterilizada. Foram semeadas 4 sementes por vaso, para o feijão comum, feijão caupi e milho, e para a braquiária, foram 16 sementes; em todas as culturas estas estavam pré-germinadas visando o imediato contato das raízes das plantas com as estirpes. Após a semeadura, os vasos foram irrigados com água destilada. Os tratamentos com braquiária foram desbastados a partir do décimo dia após a germinação, deixando-se 8 plantas por vaso. Para as demais plantas o desbaste ocorreu no sexto dia após a germinação, deixando-se somente duas plantas por vaso.

As estirpes foram previamente crescidas em meio 79 (Fred & Waksman, 1928) líquido, num período de três dias sob agitação de 100 rpm a 28 °C. Em



seguida inoculou-se dois mililitro do meio contendo cerca de  $1 \times 10^8$  células bacterianas  $\text{mL}^{-1}$  em cada semente. Os controles não receberam inoculação.

A irrigação dos vasos, com água destilada, foi realizada à medida que se constatava, visualmente, a necessidade do fornecimento de água. A temperatura média da casa de vegetação foi avaliada semanalmente, identificando-se a média das mínimas de  $13\text{ }^\circ\text{C}$  e a média das máximas de  $34\text{ }^\circ\text{C}$ . A temperatura máxima observada foi  $39\text{ }^\circ\text{C}$  e a mínima  $12\text{ }^\circ\text{C}$ .

O feijão comum e o feijão caupi foram colhidos no início do florescimento com 50 DAE, o tratamento com milho passou por um corte (uma planta  $\text{vaso}^{-1}$ ) aos 30 DAE e outro aos 45 DAE (uma planta  $\text{vaso}^{-1}$ ), já na braquiária foram feitos 3 cortes. O primeiro corte da braquiária ocorreu aos 30 DAE, o segundo corte ocorreu aos 60 DAE e o terceiro corte aos 90 DAE.

## **2.5 Variáveis analisadas**

Para todos os tratamentos, tanto em vaso de Leonard quanto em vaso com solo, foram avaliados a matéria seca da parte aérea (MSPA), a matéria seca de raiz (MSR), o conteúdo dos macronutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre) e micronutrientes (cobre, ferro, manganês e zinco) na parte aérea (Sarruge & Haag, 1979; Malavolta et al., 1997).

Os resultados do experimento foram submetidos à análise de variância, empregando-se o programa de análise estatística Sisvar 5.3 (Ferreira 2008). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

## **3 Resultados**

### **3.1 Leguminosas em vaso de Leonard**

As estirpes UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp.), UFLA 03-10 (*Paenibacillus kribbensis*), UFLA 03-106 (*Paenibacillus kribbensis*) e UFLA 03-116 (*Paenibacillus* sp.) contribuíram para o aumento da matéria seca da parte aérea (MSPA) do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), sendo maior que os tratamentos com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (insolúvel) e com 0,775 mg de fósforo  $\text{L}^{-1}$  (solúvel), sendo o efeito das estirpes UFLA 03-10 e UFLA 03-106 MSPA maior, inclusive, do que o tratamento com 15,0 mg de fósforo  $\text{L}^{-1}$  (solúvel). O mesmo não foi observado para a estirpe UFLA 03-08 (*Rhizobium tropici*). Já o tratamento com 7,75 mg de fósforo  $\text{L}^{-1}$  (solúvel) proporcionou o maior crescimento de MSPA em relação aos demais (Figura 3).

A produção de matéria seca da parte aérea refletiu no comportamento dos tratamentos em relação ao acúmulo de fósforo na parte aérea, tendo sido o tratamento com 7,75 mg de fósforo  $\text{L}^{-1}$  (solúvel) superior aos demais, seguido dos tratamentos com as estirpes UFLA 03-10, UFLA 03-106 e UFLA 03-116, que foram maiores que os tratamentos com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (insolúvel) e com 0,775 mg de fósforo  $\text{L}^{-1}$  (solúvel), exceto para a estirpe UFLA 03-09 (Tabela 3).

Para os demais macro e micronutrientes o tratamento com a estirpe UFLA 03-116 foi maior que o tratamento com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (insolúvel), sendo maior, inclusive, que os tratamentos com 7,75 e 15,0 mg de fósforo  $\text{L}^{-1}$  (solúvel) para potássio, magnésio e zinco. Os tratamentos com as estirpes apresentaram um maior acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas, em relação ao tratamento com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (insolúvel) e com 0,775 mg de fósforo  $\text{L}^{-1}$  (solúvel). Destacaram-se as estirpes UFLA 03-10 e UFLA 03-116, as quais não diferiram dos tratamentos com 7,75 e 15,0 mg de fósforo  $\text{L}^{-1}$  (solúvel). Para todos os nutrientes, os tratamentos com a estirpe UFLA 03-09, com a estirpe UFLA 03-10, ou com a estirpe UFLA 03-106 foram maiores que o tratamento com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (insolúvel) (Tabela 3).

Para a matéria seca da raiz (MSR) as estirpes UFLA 03-09 e UFLA 03-116 não diferiram dos tratamentos com 7,75 e 15,0 mg de fósforo L<sup>-1</sup> (solúvel) e foram maiores que os demais tratamentos. Além disso, a estirpe UFLA 03-106 apresentou MSR maior que os tratamentos com Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (insolúvel) e com 0,775 mg de fósforo L<sup>-1</sup> (solúvel) (Figura 3).

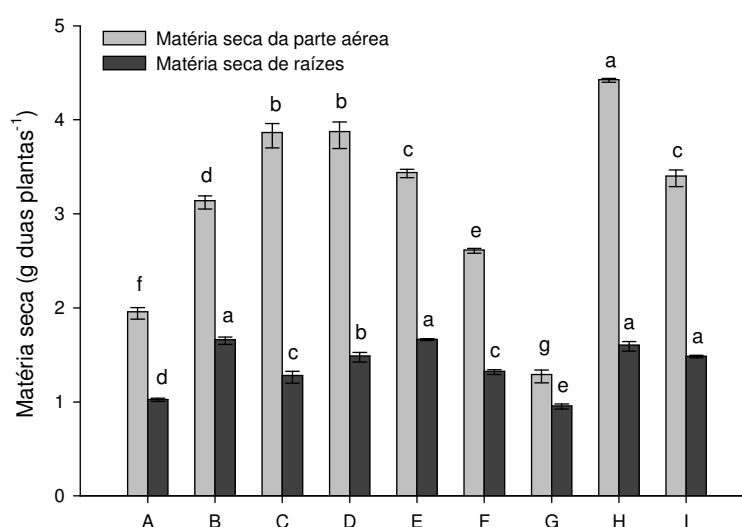


Figura 3 Matéria seca da parte aérea e matéria seca de raiz na cultura do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), sob diferentes condições de fornecimento de fósforo cultivado em vaso de Leonard. Barras de erro representam o erro padrão da média, n=3. Tratamentos: A= UFLA 03-08 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; B= UFLA 03-09 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; C= UFLA 03-10 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; D= UFLA 03-106 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; E= UFLA 03-116 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; F= sem inoculação + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; G= sem inoculação + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,00 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; H= sem inoculação + 7,75 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,00 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; I= sem inoculação + 15,0 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,00 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>

As estirpes estudadas não contribuíram para o crescimento da matéria seca da parte aérea do feijão caupi (*Vigna unguiculata*), apresentando valores iguais ou inferiores ao tratamento com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (insolúvel). Já o tratamento com  $7,75 \text{ mg de fósforo L}^{-1}$  (solúvel) apresentou o maior crescimento de MSPA em relação aos demais (Figura 4).

Para esta cultura, a produção de matéria seca também refletiu o comportamento dos tratamentos em relação ao acúmulo de fósforo na parte aérea, exceto a estirpe UFLA 03-08 (*Rhizobium tropici*), que apesar de ter a MSPA igual ao tratamento com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (insolúvel) apresentou um conteúdo de fósforo na parte aérea maior; isso também foi observado para o acúmulo de potássio, enxofre, cálcio, magnésio, cobre, ferro e manganês (Tabela 3). Da mesma forma que aconteceu para a cultura do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), os tratamentos com as estirpes também apresentaram um maior acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas em relação ao tratamento com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (insolúvel) e com  $0,775 \text{ mg de fósforo L}^{-1}$  (solúvel), sendo destaque as estirpes UFLA 03-08 e UFLA 03-10 (Tabela 3).

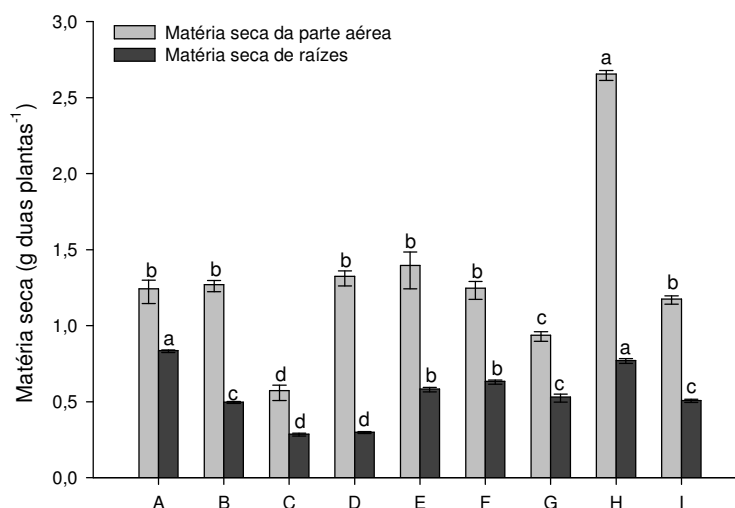


Figura 4 Matéria seca da parte aérea e matéria seca de raiz na cultura do feijão caupi (*Vigna unguiculata*), sob diferentes condições de fornecimento de fósforo cultivado em vaso de Leonard. Barras de erro representam o erro padrão da média, n=3. Tratamentos: A= UFLA 03-08 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; B= UFLA 03-09 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; C= UFLA 03-10 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; D= UFLA 03-106 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; E= UFLA 03-116 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; F= sem inoculação + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; G= sem inoculação + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,00 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; H= sem inoculação + 7,75 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,00 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; I= sem inoculação + 15,0 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,00 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>

### 3.2 Gramíneas em vaso de Leonard

As estirpes UFLA 03-08 (*Rhizobium tropici*), UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp.), UFLA 03-10 (*Paenibacillus kribbensis*) e UFLA 03-106 (*Paenibacillus kribbensis*) contribuíram para o crescimento e aumento da matéria seca da parte aérea do milho (*Zea mays*) sendo maior que a estirpe

UFLA 03-116 e os tratamentos com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (insolúvel) e com 0,775 mg de fósforo  $\text{L}^{-1}$  (solúvel). Já os tratamentos com 7,75 e 15,0 mg de fósforo  $\text{L}^{-1}$  (solúvel) proporcionaram maior produção de MSPA em relação aos demais (Figura 5).

Para a matéria seca da raiz, as estirpes UFLA 03-08, UFLA 03-09 e UFLA 03-106 não diferiram dos tratamentos com 7,75 e 15,0 mg de fósforo  $\text{L}^{-1}$  (solúvel) e proporcionaram maiores produções de MSR que os demais tratamentos. Além disso, a estirpe UFLA 03-10 apresentou MSR maior que a estirpe UFLA 03-116 (*Paenibacillus* sp.) e que os tratamentos com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (insolúvel) e com 0,775 mg de fósforo  $\text{L}^{-1}$  (solúvel) (Figura 5).

A produção de matéria seca da parte aérea e a produção de matéria seca de raiz teve um comportamento semelhante ao de acúmulo de fósforo na parte aérea, pois, para as três variáveis os tratamentos com 7,75 e 15,0 mg de fósforo  $\text{L}^{-1}$  (solúvel), as estirpes UFLA 03-08, UFLA 03-09, UFLA 03-10 e UFLA 03-106 foram superiores aos tratamentos com a estirpe UFLA 03-116, com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (insolúvel) e com 0,775 mg de fósforo  $\text{L}^{-1}$  (solúvel) (Tabela 4).

Da mesma forma que aconteceu para as culturas do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e do feijão caupi (*Vigna unguiculata*), os tratamentos com as estirpes também proporcionaram maior acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas de milho em relação ao tratamento com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (insolúvel) e com 0,775 mg de fósforo  $\text{L}^{-1}$  (solúvel), sendo que a estirpe UFLA 03-09 não diferiu do tratamento com 7,75 mg de fósforo  $\text{L}^{-1}$  (Tabela 4).

Para os demais macro e micronutrientes, exceto o enxofre, o tratamento com a estirpe UFLA 03-09 promoveu maior acúmulo na parte aérea do que o tratamento com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (insolúvel), não diferindo ou sendo maior que o tratamento com 7,75 e 15,0 mg de fósforo  $\text{L}^{-1}$  (solúvel) para cálcio e magnésio (Tabela 4).

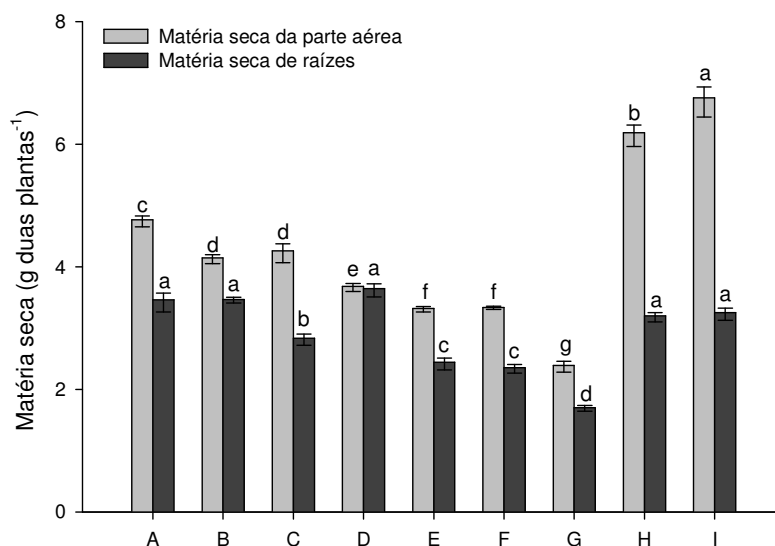


Figura 5 Matéria seca da parte aérea e matéria seca de raiz na cultura do milho (*Zea mays*), sob diferentes condições de fornecimento de fósforo cultivado em vaso de Leonard. Barras de erro representam o erro padrão da média,  $n=3$ . Tratamentos: A= UFLA 03-08 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; B= UFLA 03-09 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; C= UFLA 03-10 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; D= UFLA 03-106 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; E= UFLA 03-116 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; F= sem inoculação + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; G= sem inoculação + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,00 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; H= sem inoculação + 7,75 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,00 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; I= sem inoculação + 15,0 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,00 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>

As estirpes UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp.) e UFLA 03-106 (*Paenibacillus kribbensis*) contribuíram para o aumento da matéria seca da parte aérea da braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf), com 45 dias após a emergência (DAE), não diferindo dos tratamentos com 7,75 e 15,0 mg de fósforo L<sup>-1</sup> (solúvel) e sendo maior que os demais tratamentos. Após o primeiro

corde, aos 75 DAE os tratamentos com as estirpes UFLA 03-09 e UFLA 03-106 apresentaram MSPA inferior aos tratamentos com 7,75 e 15,0 mg de fósforo L<sup>-1</sup> (solúvel), mas continuaram sendo maiores que os demais tratamentos. Já aos 105 DAE os tratamentos com as estirpes UFLA 03-08 (*Rhizobium tropici*), UFLA 03-09, UFLA 03-10 (*Paenibacillus kribbensis*) e UFLA 03-106 apresentaram MSPA inferior ao tratamento com 7,75 mg de fósforo L<sup>-1</sup> (solúvel), mas foram maiores que a estirpe UFLA 03-116 (*Paenibacillus* sp.) e que os tratamentos com Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (insolúvel) e com 0,775 mg de fósforo L<sup>-1</sup> (solúvel) (Figura 6).

O acúmulo de fósforo e de nitrogênio na parte aérea acompanhou o observado para MSPA para o primeiro corte (45 DAE), onde os tratamentos com 7,75 e 15,0 mg de fósforo L<sup>-1</sup> (solúvel) foram superiores aos demais seguidos dos tratamentos com as estirpes UFLA 03-09 e UFLA 03-106 que foram maiores que os demais tratamentos (Tabela 5). Para o segundo corte (75 DAE) o tratamento com Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (insolúvel), apesar de apresentar MSPA igual aos tratamentos com estirpes, foi inferior no acúmulo de fósforo e nitrogênio em relação às estirpes UFLA 03-08, UFLA 03-09, UFLA 03-106 e UFLA 03-116. Já para o terceiro corte (105 DAE), os resultados da MSPA apresentaram o mesmo comportamento em relação ao acúmulo de fósforo e nitrogênio na parte aérea, sendo maior no tratamento com 7,75 mg de fósforo L<sup>-1</sup> (solúvel), seguidos dos tratamentos com as estirpes UFLA 03-08, UFLA 03-09, UFLA 03-10 e UFLA 03-106 e com 15,0 mg de fósforo L<sup>-1</sup>, que, por sua vez, foram maiores que os tratamentos com a estirpe UFLA 03-116 e com Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (insolúvel) e por fim o tratamento com 0,775 mg de fósforo L<sup>-1</sup> (solúvel) (Tabela 5).

Para a matéria seca da raiz, 105 DAE, os tratamentos com as estirpes UFLA 03-09 e UFLA 03-106 foram maiores que as demais estirpes e que os tratamentos com Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (insolúvel) e com 0,775 mg de fósforo L<sup>-1</sup> (solúvel) (Figura 7).



Da mesma forma que aconteceu para as culturas do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), do feijão caupi (*Vigna unguiculata*) e do milho (*Zea mays*) os tratamentos com as estirpes também apresentaram um maior acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas de braquiária, aos 45, 75 e 105 DAE, em relação ao tratamento com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (insolúvel) e com 0,775 mg de fósforo  $\text{L}^{-1}$  (solúvel) (Tabela 5).

Para o primeiro corte, 45 DAE, no caso dos demais macro e micronutrientes, exceto o potássio, os tratamentos com as estirpes UFLA 03-09 e UFLA 03-106 promoveram maior acúmulo na parte aérea do que o tratamento com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (insolúvel) e que os tratamentos com as demais estirpes, não diferindo ou sendo maior que o tratamento com 7,75 e 15,0 mg de fósforo  $\text{L}^{-1}$  (solúvel) para enxofre, cálcio, magnésio, cobre, ferro, manganês e zinco (Tabela 5).

Para o segundo corte, 75 DAE, no caso dos demais macro e micronutrientes, exceto o manganês, os tratamentos com as estirpes UFLA 03-09 e UFLA 03-106 propiciaram maior acúmulo na parte aérea que o tratamento com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (insolúvel) (Tabela 5).

Já no terceiro corte, aos 105 DAE, os tratamentos com as estirpes UFLA 03-09 e UFLA 03-106 propiciaram maior acúmulo na parte aérea que o tratamento com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (insolúvel) e o tratamento com a estirpe UFLA 03-116 para todos os nutrientes analisados (Tabela 5).

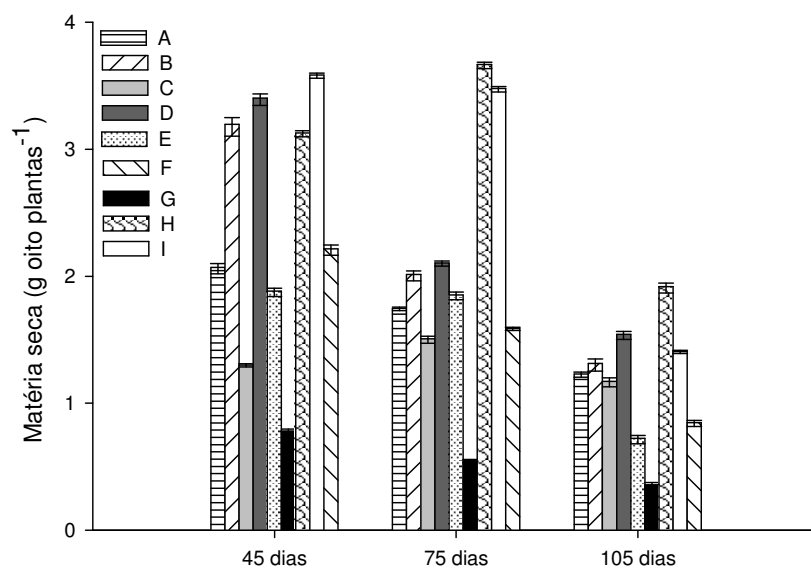


Figura 6 Matéria seca da parte aérea de braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf), sob diferentes condições de fornecimento de fósforo, aos 45, 75 e 105 dias após a emergência, cultivada em vaso de Leonard. Barras de erro representam o erro padrão da média, n=3. Tratamentos: A= UFLA 03-08 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; B= UFLA 03-09 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; C= UFLA 03-10 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; D= UFLA 03-106 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; E= UFLA 03-116 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; F= sem inoculação + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; G= sem inoculação + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,00 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; H= sem inoculação + 7,75 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,00 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; I= sem inoculação + 15,0 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,00 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>

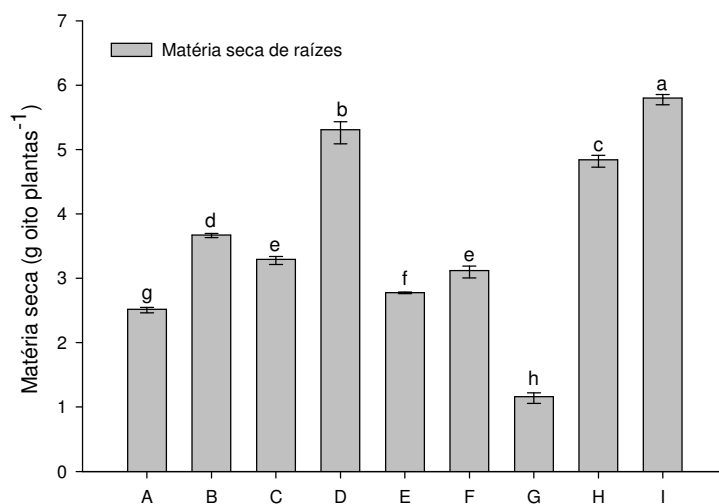


Figura 7 Matéria seca de raiz na cultura da braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf), sob diferentes condições de fornecimento de fósforo, aos 105 dias após a emergência, cultivada em vaso de Leonard. Barras de erro representam o erro padrão da média, n=3. Tratamentos: A= UFLA 03-08 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; B= UFLA 03-09 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; C= UFLA 03-10 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; D= UFLA 03-106 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; E= UFLA 03-116 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; F= sem inoculação + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; G= sem inoculação + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,00 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; H= sem inoculação + 7,75 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,00 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; I= sem inoculação + 15,0 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,00 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>

Tabela 3 Conteúdo de macro e micronutrientes na parte aérea de plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e feijão caupi (*Vigna unguiculata*), sob diferentes condições de fornecimento de fósforo cultivadas em vaso de Leonard

Tratamentos <sup>2</sup>	N	K	P	S	Ca	Mg	Cu	Fe	Mn	Zn
	----- mg vaso <sup>-1</sup> -----					----- µg vaso <sup>-1</sup> -----				
Feijão comum ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )										
A	69,24e <sup>1</sup>	161,95f	4,72d	6,12d	32,63e	4,55e	16,93e	210,88f	145,35e	79,68f
B	111,14c	251,44e	6,99c	11,51b	52,45c	19,70c	26,10d	544,42c	249,71d	153,69d
C	161,98a	277,05d	9,57b	12,69b	74,95a	35,88a	34,52b	451,17d	423,64a	239,85b
D	95,77d	419,19b	8,63b	7,91d	67,38b	27,29b	28,15c	373,81e	255,51d	221,14c
E	122,89b	537,86a	10,69b	17,14a	70,32a	19,09c	41,78a	666,94b	363,95b	325,73a
F	27,20f	265,94d	7,13c	9,21c	46,02d	12,78d	25,22d	461,44d	263,58d	158,05d
G	8,26g	178,59f	2,56e	6,44d	23,81f	1,42f	12,45f	165,64g	132,94e	70,94f
H	155,36a	377,31c	18,59a	17,93a	73,75a	12,87d	42,23a	818,43a	377,29b	224,71c
I	123,17b	347,06c	20,78a	17,78a	56,20c	4,72e	29,46c	634,76b	328,52c	117,18e
% CV	15,33	17,54	11,35	16,53	17,01	18,13	20,12	22,04	21,77	20,91
Feijão caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> )										
A	43,73d	106,25c	3,45c	8,63c	33,62c	12,28c	6,83c	128,87c	217,97b	28,90c
B	30,24e	70,40f	2,77d	7,47d	21,50e	8,42d	4,93d	104,93e	155,61e	7,750c
C	49,19c	70,57f	2,16d	7,21d	26,31d	9,13d	5,66d	118,83d	169,60d	27,69c
D	14,52f	34,77g	1,43e	3,68e	10,7757f	5,97e	2,99e	50,30g	97,37g	11,84d
E	35,83e	86,43e	2,63d	6,28d	29,54d	8,38d	5,72d	134,82c	146,69e	34,33c
F	5,04g	92,69d	2,38d	5,14e	27,72d	6,94e	5,29d	106,84e	159,40e	30,90c
G	7,56g	25,74h	1,69e	4,51e	22,38e	6,47e	4,66d	99,83f	126,91f	30,89c

...continua...

Tabela 3, Cont.

H	58,00b	143,12b	10,54b	14,63b	55,71b	22,79b	10,32b	266,61b	259,20a	60,76b
I	76,99a	362,14a	23,67a	21,08a	69,30a	27,79a	13,69a	330,63a	202,50c	81,91a
% CV	14,46	18,00	15,68	17,24	16,23	18,86	15,04	23,59	24,58	22,47

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%. <sup>2</sup>A= UFLA 03-08 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; B= UFLA 03-09 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; C= UFLA 03-10 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; D= UFLA 03-106 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; E= UFLA 03-116 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; F= sem inoculação + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; G= sem inoculação + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,00 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; H= sem inoculação + 7,75 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,00 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; I= sem inoculação + 15,0 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,00 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>

Tabela 4 Conteúdo de macro e micronutrientes na parte aérea de plantas de milho (*Zea mays*), sob diferentes condições de fornecimento de fósforo cultivadas em vaso de Leonard

Tratamentos <sup>2</sup>	N	K	P	S	Ca	Mg	Cu	Fe	Mn	Zn
	----- mg vaso <sup>-1</sup> -----						----- µg vaso <sup>-1</sup> -----			
Milho ( <i>Zea mays</i> )										
A	106,91c <sup>1</sup>	183,37d	9,34c	2,60d	30,64b	13,99b	25,81d	282,31e	312,16b	72,14d
B	143,41b	288,46c	10,05c	2,57d	44,68a	17,78a	28,22c	332,13c	274,48c	100,53b
C	111,54c	193,41d	9,85c	2,25d	32,83b	15,00b	25,03d	297,35d	360,64a	104,25b
D	100,30c	164,64e	8,67d	3,83c	28,00c	13,81b	20,7755e	281,29e	233,39d	82,41c
E	80,73d	161,61e	6,96e	3,84c	25,57c	11,77c	22,75e	234,98f	242,25d	68,58e
F	7,17e	157,22e	4,23f	2,70d	22,52d	10,72c	22,62e	227,59g	207,27e	64,84e
G	3,43e	115,97f	4,55f	1,92d	26,96d	12,24c	17,93f	214,48h	223,82e	59,25f
H	148,51b	314,17b	20,76b	5,22b	30,7750b	15,73b	40,64b	440,01b	239,24d	108,03a
I	166,80a	335,85a	36,77a	7,48a	45,31a	20,23a	44,69a	485,90a	277,73c	109,62a
% CV	14,23	18,78	12,36	17,44	16,06	17,9	15,11	16,65	18,02	18,31

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 %. <sup>2</sup>A= UFLA 03-08 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; B= UFLA 03-09 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; C= UFLA 03-10 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; D= UFLA 03-106 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; E= UFLA 03-116 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; F= sem inoculação + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; G= sem inoculação + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,00 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; H= sem inoculação + 7,75 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,00 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; I= sem inoculação + 15,0 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,00 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>

Tabela 5 Conteúdo de macro e micronutrientes na parte aérea de plantas de braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf), sob diferentes condições de fornecimento de fósforo, aos 45, 75 e 105 dias após a emergência, cultivada em vaso de Leonard

Tratamentos <sup>2</sup>	N	K	P	S	Ca	Mg	Cu	Fe	Mn	Zn
	mg vaso <sup>-1</sup>						µg vaso <sup>-1</sup>			
45 dias após a emergência										
A	49,50d <sup>1</sup>	85,23g	2,20e	2,97e	5,29e	5,18d	13,77d	106,29f	184,77e	32,99d
B	77,80c	148,36e	4,21c	9,11a	13,78a	13,63a	29,67a	208,56b	304,84a	57,86a
C	31,24e	72,89h	1,57f	2,30f	4,50f	4,41e	9,27f	65,60h	119,96f	20,57f
D	79,27c	175,93b	4,61c	8,79b	13,77a	13,67a	25,31b	223,84a	270,61c	50,7757b
E	55,29d	91,60f	2,80d	3,01e	6,40d	6,50c	13,88e	93,71g	173,01e	29,47e
F	19,02f	156,18d	2,27e	3,95d	8,27c	7,32c	15,49d	125,82e	209,17d	35,20d
G	5,87g	38,40i	0,57g	1,54g	3,55g	0,7759f	6,54g	54,72i	80,05g	23,78f
H	80,57b	163,64c	6,10b	3,72d	12,53b	11,31b	20,40c	139,63d	293,48b	51,97b
I	88,60a	215,51a	11,62a	6,43c	13,55a	12,83a	21,66c	156,39c	221,95d	43,05c
% CV	15,02	18,44	11,26	14,25	15,98	17,74	15,05	17,06	17,88	17,16
70 dias após a emergência										
A	26,21c	108,07e	2,70c	8,01c	7,34e	7,38d	11,74d	85,62f	116,27e	27,28d
B	28,84b	115,54d	2,81c	10,30a	9,74c	9,70c	12,24d	108,34c	152,36c	30,26c
C	22,06d	83,81g	2,30e	6,97e	6,60e	6,20e	10,53e	100,89d	105,08f	24,74e
D	30,88b	127,47c	3,26b	9,21b	10,47c	9,83c	13,74c	101,03d	144,29d	39,92b
E	25,88c	100,77e	3,00b	7,30d	8,32d	7,96d	12,18d	98,66e	121,54e	31,20c
F	9,07e	90,98f	2,56d	7,16d	8,09d	7,19d	9,98e	74,59g	145,24d	23,93e

...continua...

Tabela 5, Cont.

G	6,00f	33,59h	0,83f	0,7757f	3,01f	2,84f	5,47f	36,71h	36,85g	13,63f
H	48,57a	27,751a	10,37a	9,99a	16,77a	15,15a	20,35a	189,73a	254,55a	46,26a
I	48,54a	219,72b	11,77a	10,08a	14,48b	13,08b	18,98b	144,18b	244,53b	44,78a
% CV	14,40	19,52	13,67	15,29	15,10	17,14	16,48	18,71	17,19	16,86
105 dias após a emergência										
A	18,97b	65,38c	2,62b	5,44a	7,90b	4,49c	7,35a	56,72c	92,89d	30,56a
B	18,79b	62,77c	2,66b	3,82c	7,34b	4,24c	6,59b	54,91c	126,92c	22,78c
C	19,30b	55,95d	2,37b	2,73d	6,11c	4,02d	6,61b	51,34c	96,14d	21,15c
D	19,88b	76,43b	3,20b	4,94b	8,79a	4,88b	7,55a	81,24a	140,05b	25,56b
E	9,81c	36,38f	1,51c	2,23d	4,08d	2,50e	4,17c	29,07e	68,63e	11,30e
F	1,51d	46,85e	1,77c	3,78c	4,40d	2,86e	4,44c	36,46d	83,44d	15,55d
G	1,29d	21,11g	0,75d	1,80e	2,13e	1,77f	3,30d	22,05f	35,25f	10,27e
H	26,03a	99,98a	4,87a	3,92c	9,52a	5,49a	7,90a	65,11b	151,02a	28,44a
I	19,58b	62,57c	4,11a	4,42b	6,40c	4,05d	6,60b	71,48b	147,36a	24,66b
% CV	11,25	14,57	12,58	16,05	15,43	16,80	17,02	17,99	16,00	17,49

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 %. <sup>2</sup>A= UFLA 03-08 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; B= UFLA 03-09 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; C= UFLA 03-10 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; D= UFLA 03-106 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; E= UFLA 03-116 + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; F= sem inoculação + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,25 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; G= sem inoculação + 0,775 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,00 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; H= sem inoculação + 7,75 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,00 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; I= sem inoculação + 15,0 mg P L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,00 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>



### 3.3 Contagem de microrganismos solubilizadores de fosfato no solo

Não foram detectados microrganismos solubilizadores de fosfato de cálcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) no solo utilizado. A figura 8 demonstra haver o desenvolvimento de alguns microrganismos, mas nenhum apresentou o halo transparente, característico da solubilização.

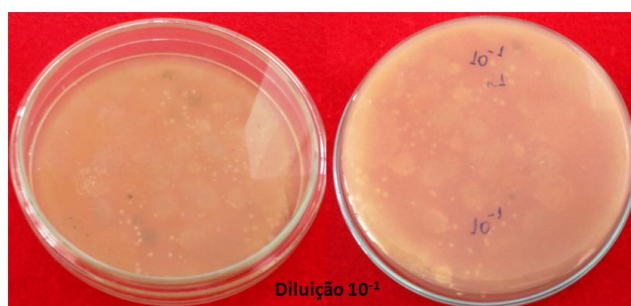


Figura 8 Placas de Petri com meio NBRIP inoculadas com a diluição  $10^{-1}$  da suspensão com o solo

### 3.4 Leguminosas em vaso com solo

As estirpes estudadas não contribuíram para o crescimento da matéria seca da parte aérea do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), não apresentando diferença ou sendo inferior ao tratamento com fosfato de Araxá. Os tratamentos com 150,0 e 300,0 mg de fósforo  $\text{L}^{-1}$  apresentaram o maior crescimento de MSPA em relação aos demais (Figura 9).

A inoculação das estirpes também não contribuíram para o incremento de fósforo na parte aérea, sendo que o tratamento com fosfato de Araxá proporcionou maior acúmulo de fósforo na parte aérea relativamente às estirpes (Tabela 6). Para os demais macro e micronutrientes o tratamento com fosfato de Araxá só não foi superior à estirpe UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp.), para o

incremento de magnésio na parte aérea e à estirpe UFLA 03-08 (*Rhizobium tropici*), para o incremento de cobre e a todas as estirpes quanto ao acúmulo de nitrogênio. O tratamento com 300,0 mg de fósforo L<sup>-1</sup> promoveu o maior incremento de fósforo na parte aérea, seguido do tratamento com 150,0 mg de fósforo L<sup>-1</sup> (Tabela 6).

Para a matéria seca da raiz (MSR) nenhuma das estirpes diferiu dos tratamentos com 150,0 e 300,0 mg de fósforo L<sup>-1</sup>, nem do tratamento com fosfato de Araxá (Figura 9).

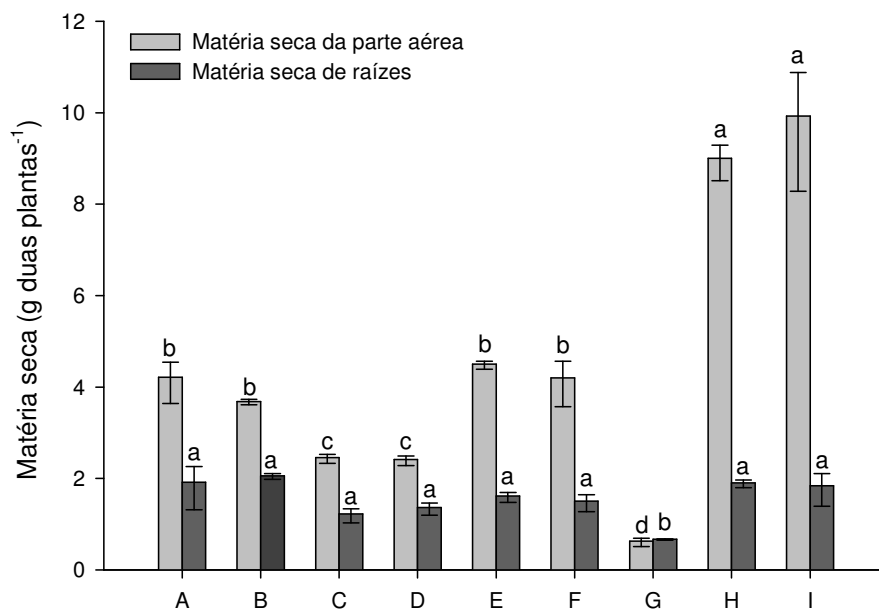


Figura 9 Matéria seca da parte aérea e matéria seca de raiz na cultura do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), sob diferentes condições de fornecimento de fósforo cultivado em vaso com solo. Barras de erro representam o erro padrão da média, n=3. Tratamentos: A= UFLA 03-08 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; B= UFLA 03-09 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; C= UFLA 03-10 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; D= UFLA 03-106 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; E= UFLA 03-116 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; F= sem inoculação + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; G= sem inoculação + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 0,0 g Fosf. Araxá; H= sem inoculação + 150,0 mg P L<sup>-1</sup> (adubo super triplo) + 0,0 g Fosf. Araxá; I= sem inoculação + 300,0 mg P L<sup>-1</sup> (adubo super triplo) + 0,0g Fosf. Araxá

As estirpes UFLA 03-08 (*Rhizobium tropici*), UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp.), UFLA 03-10 (*Paenibacillus kribbensis*), UFLA 03-106 (*Paenibacillus kribbensis*) e UFLA 03-116 (*Paenibacillus* sp.) contribuíram para o crescimento da matéria seca da parte aérea do feijão caupi (*Vigna unguiculata*)

sendo maior do que os tratamentos com fosfato de Araxá e com 1,2 mg de fósforo L<sup>-1</sup>. Já os tratamentos com 150,0 e 300,0 mg de fósforo L<sup>-1</sup> apresentaram o maior crescimento de MSPA em relação aos demais (Figura 10).

Para a matéria seca da raiz as estirpes UFLA 03-08, UFLA 03-09, UFLA 03-10 e UFLA 03-106 não diferiram do tratamento com 150,0 mg de fósforo L<sup>-1</sup> e foram maiores que os demais tratamentos. Além disso, a estirpe UFLA 03-116 apresentou MSR igual ao tratamento com 300,0 mg de fósforo L<sup>-1</sup> e maior que os tratamentos com fosfato de Araxá e com 1,2 mg de fósforo L<sup>-1</sup> (Figura 10).

Todas as estirpes inoculadas contribuíram para o incremento de fósforo na parte aérea, em relação aos tratamentos com fosfato de Araxá e com 1,2 mg de fósforo L<sup>-1</sup>, apresentando a estirpe UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp.) o melhor desempenho dentre elas (Tabela 6). Para os demais macro e micronutrientes, exceto manganês, os tratamentos com as estirpes proporcionaram maior acúmulo na parte aérea do que o tratamento com Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (insolúvel) e o tratamento com 1,2 mg de fósforo L<sup>-1</sup> (Tabela 6). O tratamento com 300,0 mg de fósforo L<sup>-1</sup> apresentou o maior incremento de fósforo na parte aérea, seguido do tratamento com 150,0 mg de fósforo L<sup>-1</sup> (Tabela 6).

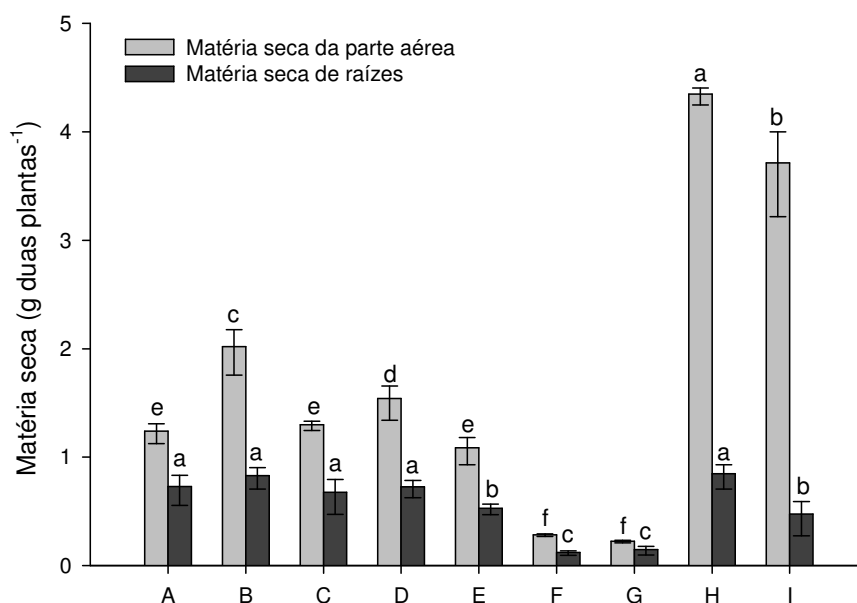


Figura 10 Matéria seca da parte aérea e matéria seca de raiz na cultura do feijão caupi (*Vigna unguiculata*), sob diferentes condições de fornecimento de fósforo cultivado em vaso com solo. Barras de erro representam o erro padrão da média,  $n=3$ . Tratamentos: A= UFLA 03-08 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; B= UFLA 03-09 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; C= UFLA 03-10 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; D= UFLA 03-106 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; E= UFLA 03-116 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; F= sem inoculação + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; G= sem inoculação + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 0,0 g Fosf. Araxá; H= sem inoculação + 150,0 mg P L<sup>-1</sup> (adubo super triplo) + 0,0 g Fosf. Araxá; I= sem inoculação + 300,0 mg P L<sup>-1</sup> (adubo super triplo) + 0,0g Fosf. Araxá

### 3.5 Gramíneas em vaso com solo

Após trinta dias de crescimento, nenhuma estirpe destacou-se com relação ao crescimento da parte aérea das plantas de milho (*Zea mays*) em

relação ao tratamento com fosfato de Araxá (Figura 11). Entretanto neste mesmo período já foi possível observar um maior acúmulo de fósforo, nitrogênio, potássio e manganês na parte aérea das plantas inoculadas com as estirpes UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp.), UFLA 03-10 (*Paenibacillus kribbensis*), UFLA 03-106 (*Paenibacillus kribbensis*) e UFLA 03-116 (*Paenibacillus* sp.), em relação ao tratamento com fosfato de Araxá, apresentando a estirpe UFLA 03-116 maior acúmulo em relação às demais (Tabela 7).

Após o primeiro corte e aos 45 dias após a emergência (DAE) os tratamentos com as estirpes UFLA 03-08 (*Rhizobium tropici*), UFLA 03-10 e UFLA 03-116 continuaram apresentando menor MSPA que os tratamentos com 150,0 e 300,0 mg de fósforo L<sup>-1</sup>, mas apresentaram maior MSPA do que os tratamentos com as estirpes UFLA 03-09 e UFLA 03-106, e os tratamentos com fosfato de Araxá e com 1,2 mg de fósforo L<sup>-1</sup> (Figura 11). Com esta idade, apenas as plantas do tratamento com a estirpe UFLA 03-116 continuaram a apresentar maior acúmulo de fósforo na parte aérea, em relação às plantas do tratamento com fosfato de Araxá. Além disso, vale destacar que a estirpe UFLA 03-116 também contribuiu com maior acúmulo de nitrogênio, potássio, cálcio, magnésio, cobre, ferro, manganês e zinco do que o tratamento com fosfato de Araxá (Tabela 7).

Para a matéria seca da raiz, o tratamento com a estirpe UFLA 03-10 não diferiu do tratamento com 150,0 mg de fósforo L<sup>-1</sup> e foi maior que os demais tratamentos, exceto para o tratamento com 300,0 mg de fósforo L<sup>-1</sup> (Figura 11).

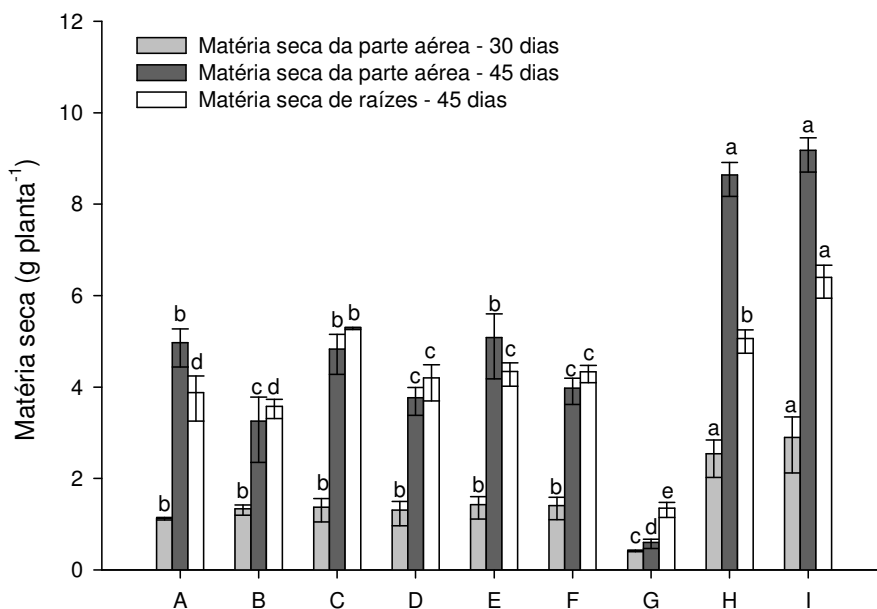


Figura 11 Matéria seca da parte aérea e matéria seca de raiz na cultura do milho (*Zea mays*), sob diferentes condições de fornecimento de fósforo, aos 30 e 45 dias após a emergência, cultivado em vaso com solo. Barras de erro representam o erro padrão da média,  $n=3$ . Tratamentos: A= UFLA 03-08 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; B= UFLA 03-09 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; C= UFLA 03-10 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; D= UFLA 03-106 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; E= UFLA 03-116 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; F= sem inoculação + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; G= sem inoculação + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 0,0 g Fosf. Araxá; H= sem inoculação + 150,0 mg P L<sup>-1</sup> (adubo super triplo) + 0,0 g Fosf. Araxá; I= sem inoculação + 300,0 mg P L<sup>-1</sup> (adubo super triplo) + 0,0g Fosf. Araxá

O tratamento com 1,2 mg de fósforo L<sup>-1</sup> permitiu apenas o primeiro corte (30 DAE), pois as plantas não brotaram após o mesmo. As estirpes estudadas não contribuiram no aumento da matéria seca da parte aérea da

braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf), com 30 dias após a emergência (DAE), não diferindo do tratamento com fosfato de Araxá (Figura 12).

Após o primeiro corte e com 60 DAE, os tratamentos com as estirpes UFLA 03-09, UFLA 03-10 e UFLA 03-106 apresentaram MSPA maior do que os tratamentos com as demais estirpes, o tratamento com fosfato de Araxá e o tratamento com 1,2 mg de fósforo L<sup>-1</sup>. Os tratamentos com 150,0 e 300,0 mg de fósforo L<sup>-1</sup> proporcionaram maior crescimento de MSPA em relação aos demais aos 30 e 60 DAE (Figura 12). Já aos 90 DAE, a estirpe UFLA 03-10 não apresentou diferença de MSPA em relação ao tratamento com 150,0 mg de fósforo L<sup>-1</sup>, seguida da estirpe UFLA 03-09 que superou os demais tratamentos (Figura 12).

Apesar de não ter havido diferença entre os tratamentos com as estirpes e o tratamento com fosfato de Araxá em relação à produção de matéria seca de parte aérea, as estirpes UFLA 03-116, UFLA 03-10 e UFLA 03-106 apresentaram maior acúmulo de fósforo na parte aérea no primeiro corte (30 DAE) e o tratamento com a estirpe UFLA 03-09 apresentou maior acúmulo de nitrogênio, potássio, cálcio, magnésio e ferro que o tratamento com fosfato de Araxá (Tabela 8). Para o segundo corte (60 DAE) o tratamento com a estirpe UFLA 03-106 continuou sendo superior no acúmulo de fósforo que os tratamentos com as demais estirpes, que o tratamento com fosfato de Araxá e que o tratamento com 1,2 mg de fósforo L<sup>-1</sup>. Vale destacar que o tratamento com a estirpe UFLA 03-10 e UFLA 03-106 também apresentaram maior acúmulo de potássio, enxofre, cálcio, magnésio, cobre, ferro, manganês e zinco em comparação ao tratamento com fosfato de Araxá (Tabela 8). Já para o terceiro corte (90 DAE) os tratamentos com as estirpes UFLA 03-10 e UFLA 03-116, que foram maiores no acúmulo de fósforo no primeiro corte (30 DAE), voltaram a serem maiores, em relação aos demais tratamentos, exceto para os tratamentos com 150,0 e 300,0 mg de fósforo L<sup>-1</sup> os quais apresentaram maior acúmulo de



fósforo na parte aérea em relação aos demais tratamentos em todos os três cortes (30, 60 e 90 DAE) (Tabela 8). Vale destacar que o tratamento com a estirpe UFLA 03-10 apresentou, aos 90 DAE, maior acúmulo de todos os macros e micronutrientes analisados em comparação com o tratamento com fosfato de Araxá (Tabela 8). Para a matéria seca da raiz, 90 DAE, as estirpes UFLA 03-09 e UFLA 03-10 não diferiram do tratamento com 150,0 mg de fósforo L<sup>-1</sup> e foram maiores que os tratamentos com as demais estirpes e que os tratamentos com fosfato de Araxá e com 1,2 mg de fósforo L<sup>-1</sup> (Figura 13).

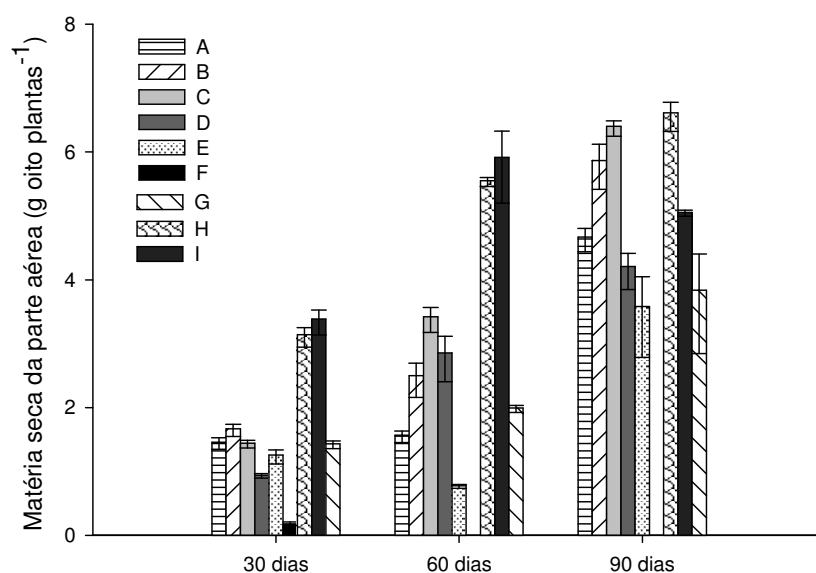


Figura 12 Matéria seca da parte aérea na cultura da braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf), sob diferentes condições de fornecimento de fósforo, aos 30, 60 e 90 dias após a emergência cultivada em vaso com solo. Barras de erro representam o erro padrão da média, n=3. Tratamentos: A= UFLA 03-08 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; B= UFLA 03-09 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; C= UFLA 03-10 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; D= UFLA 03-106 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; E= UFLA 03-116 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g

Fosf. Araxá; F= sem inoculação + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; G= sem inoculação + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 0,0 g Fosf. Araxá; H= sem inoculação + 150,0 mg P L<sup>-1</sup> (adubo super triplo) + 0,0 g Fosf. Araxá; I= sem inoculação + 300,0 mg P L<sup>-1</sup> (adubo super triplo) + 0,0g Fosf. Araxá

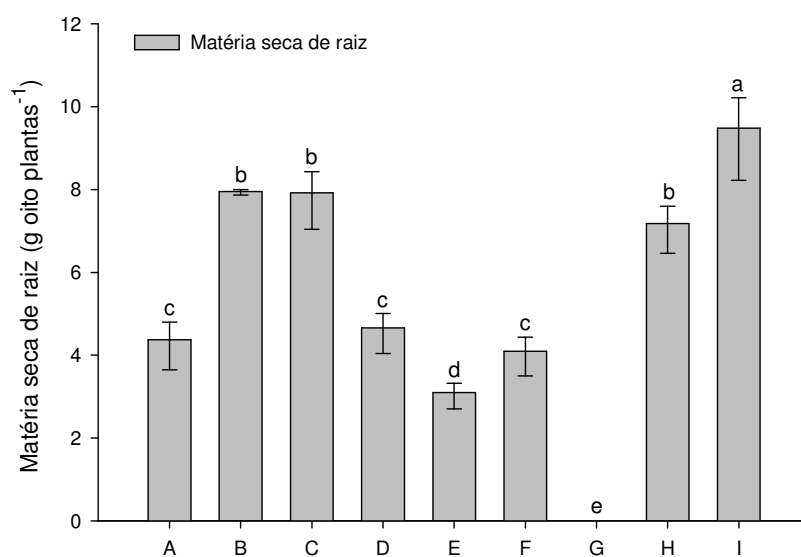


Figura 13 Matéria seca de raiz na cultura da braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf), sob diferentes condições de fornecimento de fósforo, aos 90 dias após a emergência cultivada em vaso com solo. Barras de erro representam o erro padrão da média, n=3. Tratamentos: A= UFLA 03-08 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; B= UFLA 03-09 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; C= UFLA 03-10 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; D= UFLA 03-106 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; E= UFLA 03-116 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; F= sem inoculação + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosf. Araxá; G= sem inoculação + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 0,0 g Fosf. Araxá; H= sem inoculação + 150,0 mg P L<sup>-1</sup> (adubo super triplo) + 0,0 g Fosf. Araxá; I= sem inoculação + 300,0 mg P L<sup>-1</sup> (adubo super triplo) + 0,0g Fosf. Araxá

Tabela 6 Conteúdo de macro e micronutrientes na parte aérea de plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e feijão caupi (*Vigna unguiculata*), sob diferentes condições de fornecimento de fósforo cultivadas em vaso com solo

Tratamentos <sup>2</sup>	N	K	P	S	Ca	Mg	Fe	Zn	Cu	Mn
	mg vaso <sup>-1</sup>					µg vaso <sup>-1</sup>				
<i>Feijão comum (Phaseolus vulgaris)</i>										
A	121,02f	30,26	17,42e	10,7756d	47,68c	23,40d	1137,38d	154,13d	60,95c	15,39d
B	156,32e	28,26c	18,09e	10,92d	44,91c	27,30c	1374,97c	147,56d	22,69e	18,40c
C	206,28c	31,40b	17,76e	8,23e	26,50e	14,12e	614,77e	110,91e	15,62f	10,95e
D	189,57d	32,55b	12,83f	6,65e	24,48e	12,79e	673,61e	88,17f	10,7753f	8,30f
E	210,36c	25,32d	25,93d	11,65d	38,22d	21,73d	1138,18d	164,33c	24,68d	17,16c
F	50,80g	30,09b	31,21c	11,10d	46,83c	22,86d	1379,52c	161,38c	28,91d	20,70b
G	21,44h	12,70e	2,16g	2,73f	7,39f	4,23f	125,55f	25,17g	7,03g	2,82g
H	245,23a	55,91a	115,45b	49,64b	117,95b	45,00b	8288,58a	298,55b	67,17b	48,71a
I	216,90b	54,76a	121,28a	65,68a	136,09a	54,75a	2223,60b	359,04a	84,07a	49,47a
% CV	14,40	16,22	18,71	14,68	16,07	17,11	17,88	14,21	15,19	18,74
<i>Feijão caupi (Vigna unguiculata)</i>										
A	79,83c <sup>1</sup>	17,81c	4,44e	7,59c	27,30d	16,68c	397,10c	55,06d	8,46d	27,756c
B	80,27c	16,87c	8,03c	5,35e	31,99c	19,39b	458,75b	63,95c	10,80c	14,77g
C	88,15b	17,94c	3,36f	1,81f	18,13f	9,32e	132,38f	28,82f	5,67e	5,68h
D	79,03c	16,15c	5,89d	4,54e	28,39d	15,95c	313,23e	58,24d	9,22d	9,96h
E	70,28d	14,13d	3,26f	6,36d	20,46e	12,04d	355,86d	41,46e	6,43e	165,74d
F	10,74e	2,88e	1,57g	0,73g	4,10g	1,71f	50,48g	7,82g	1,27f	37,72f
G	11,08e	2,22e	0,33h	1,18f	0,85h	1,03f	17,71h	7,87g	1,97f	43,30e

...continua...

Tabela 6, Cont.

H	100,46a	24,94b	31,80b	12,46b	45,10b	15,08c	1300,25b	79,53b	14,60b	520,23b
I	99,33a	48,37a	46,65a	35,20a	69,62a	37,14a	1480,67a	142,10a	26,39a	745,91a
% CV	15,11	16,89	20,12	15,56	17,95	18,09	19,83	18,17	16,57	18,86

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 %. <sup>2</sup>A= UFLA 03-08 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosfato natural de Araxá; B= UFLA 03-09 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosfato natural de Araxá; C= UFLA 03-10 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosfato natural de Araxá; D= UFLA 03-106 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosfato natural de Araxá; E= UFLA 03-116 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosfato natural de Araxá; F= sem inoculação + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosfato natural de Araxá; G= sem inoculação + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 0,0 g Fosfato natural de Araxá; H= sem inoculação + 150,0 mg P L<sup>-1</sup> (adubo super triplo) + 0,0 g Fosfato natural de Araxá; I= sem inoculação + 300,0 mg P L<sup>-1</sup> (adubo super triplo) + 0,0g Fosfato natural de Araxá

Tabela 7 Conteúdo de macro e micronutrientes na parte aérea de plantas de milho (*Zea mays*), sob diferentes condições de fornecimento de fósforo, aos 30 e 45 dias após a emergência cultivadas em vaso com solo

Tratamentos <sup>2</sup>	N	K	P	S	Ca	Mg	Fe	Zn	Cu	Mn
	----- mg plant <sup>-1</sup> -----						----- µg plant <sup>-1</sup> -----			
30 dias após a emergência										
A	236,02c <sup>1</sup>	15,23d	4,70e	1,56c	6,93e	6,83c	92,85e	54,21f	10,00b	51,73c
B	235,69c	14,91e	8,87d	0,35d	10,32d	7,81b	95,84e	59,81e	10,40b	137,18b
C	225,87d	17,13c	9,63d	0,58d	9,49d	6,93c	88,67f	51,38f	10,60b	130,46c
D	240,12c	16,81c	9,14d	0,39d	8,18d	6,49c	83,44f	59,34e	10,09b	139,69b
E	245,45b	18,98b	12,45c	0,17d	8,90d	7,26b	98,43d	67,52d	10,96b	165,30a
F	25,64f	11,41f	4,83e	3,32b	12,74c	7,45b	104,84c	76,59c	11,11b	7,79e
G	18,09g	4,89g	0,69f	1,02c	3,96f	4,69d	38,14g	20,90g	3,79c	1,61f
H	310,28a	21,36a	30,53b	9,27a	20,73b	14,05a	217,06a	85,04a	24,17a	10,69d
I	312,00a	22,57a	45,43a	9,33a	22,89a	15,98a	204,62b	80,74b	26,50a	11,09d
% CV	13,68	13,46	11,12	15,12	16,65	17,45	18,27	21,10	20,59	19,15
45 dias após a emergência										
A	317,24c	32,15b	11,93e	11,21c	24,63e	16,41e	707,94c	317,01a	29,85d	26,45b
B	320,14c	33,26b	10,66e	4,94e	20,64f	16,71e	441,91f	196,85e	24,92e	16,99e
C	310,88c	30,17c	13,57d	8,65d	29,46c	18,02d	838,99b	272,24c	31,90c	23,48c
D	314,21c	29,55c	11,09e	4,66e	22,97f	14,14f	486,80f	209,93e	25,35e	17,17e
E	246,55d	27,60d	21,69b	7,92d	27,33d	19,35c	679,46d	301,33b	33,75b	26,22b
F	43,53e	22,81e	16,60c	10,27c	24,00e	15,92e	604,90e	244,07d	30,57d	20,54d
G	30,98f	8,45f	0,97f	1,19f	5,74g	4,90g	143,89g	26,38f	4,19f	2,69f

...continua...

Tabela 7, Cont.

H	400,80a	39,50a	61,52a	24,88b	34,99b	35,94b	1014,44a	319,95a	51,89a	35,69a
I	375,20b	39,99a	60,25a	29,34a	47,96a	40,53a	1066,32a	272,32c	51,04a	38,30a
% CV	15,59	14,28	10,18	12,58	18,48	16,47	20,84	21,50	18,39	18,72

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5 %. <sup>2</sup>A= UFLA 03-08 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosfato natural de Araxá; B= UFLA 03-09 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosfato natural de Araxá; C= UFLA 03-10 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosfato natural de Araxá; D= UFLA 03-106 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosfato natural de Araxá; E= UFLA 03-116 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosfato natural de Araxá; F= sem inoculação + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosfato natural de Araxá; G= sem inoculação + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 0,0 g Fosfato natural de Araxá; H= sem inoculação + 150,0 mg P L<sup>-1</sup> (adubo super triplo) + 0,0 g Fosfato natural de Araxá; I= sem inoculação + 300,0 mg P L<sup>-1</sup> (adubo super triplo) + 0,0g Fosfato natural de Araxá

Tabela 8 Conteúdo de macro e micronutrientes na parte aérea de plantas de braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf), sob diferentes condições de fornecimento de fósforo, aos 30, 60 e 90 dias após a emergência cultivadas em vaso com solo

Tratamentos <sup>2</sup>	N	K	P	S	Ca	Mg	Cu	Fe	Mn	Zn
	----- mg vaso <sup>-1</sup> -----						----- µg vaso <sup>-1</sup> -----			
30 dias após a emergência										
A	40,51c <sup>1</sup>	17,58b	5,50d	4,25c	4,21c	5,29b	15,99c	109,21d	9,05d	76,17d
B	60,50b	18,23b	5,72d	4,34c	6,03b	6,95a	16,75c	122,42c	9,53c	69,87e
C	29,04e	17,96b	6,88c	4,18c	4,43c	5,03b	14,84d	91,66f	8,70d	76,41d
D	59,07b	17,68b	6,46c	3,84d	4,22c	5,22b	14,73d	94,94f	7,39d	68,91e
E	34,38d	16,12c	9,14b	4,24c	4,13c	4,66c	14,87d	101,32e	7,83d	71,12e
F	15,22f	15,24c	6,09d	4,47c	4,38c	5,74b	16,20c	106,68d	9,61c	82,86c
G	4,49g	14,05d	0,26e	0,10e	0,73d	0,86d	2,28e	14,51g	1,17e	6,61f
H	65,07a	29,80a	29,26a	9,49b	11,56a	16,52a	38,24b	234,11b	19,93b	166,22b
I	66,06a	30,67a	28,93a	14,64a	13,79a	16,94a	57,56a	670,19a	30,94a	269,12a
% CV	16,08	15,63	14,51	16,32	15,55	16,34	18,09	18,15	20,26	19,98
60 dias após a emergência										
A	77,52d	17,03e	9,93e	17,08f	3,98e	5,51e	17,42e	122,58e	447,41g	131,15f
B	82,15c	24,38d	12,69e	20,79e	5,61d	7,49d	20,05d	161,57d	501,31f	132,00f
C	80,11c	36,98c	17,81d	32,41c	8,99c	11,99c	31,73c	320,13c	852,63c	265,61c
D	79,81c	39,77c	20,19c	42,86a	8,12c	12,30c	32,42c	325,87c	757,54d	219,43d
E	70,12e	16,65e	10,77e	11,59g	2,93e	4,02f	12,28f	89,80f	280,12h	94,62g
F	15,26f	24,22d	15,16d	7,80h	5,28d	8,20d	22,06d	178,20d	581,69e	148,04e

...continua...

Tabela 8, Cont.

G	09,56g	0,00f	0,00f	0,00i	0,00f	0,00g	0,00g	0,00g	0,00i	0,00h
H	100,08a	59,29b	46,33a	25,49d	14,58b	21,10b	51,02b	377,82b	1052,18b	274,35b
I	92,26b	66,35a	43,24b	36,93b	16,96a	24,31a	57,14a	491,65a	1302,83a	337,92a
% CV	16,84	18,46	10,23	14,51	12,23	14,86	15,40	15,84	16,03	17,12
90 dias após a emergência										
A	121,00c	48,90e	29,66c	3,91b	16,54c	20,67d	56,64b	450,7752d	1154,75c	358,89b
B	115,26d	56,71c	30,64c	3,53b	15,07c	21,35d	45,11c	709,89b	1035,06e	320,48c
C	124,48c	62,41a	35,63b	3,76b	19,83b	26,12c	66,55a	949,23a	1201,53b	399,82a
D	112,20d	53,64d	14,20d	2,29c	9,66d	12,62e	24,64f	302,44g	543,95g	152,79f
E	111,24d	43,86f	33,74b	1,41d	10,40d	13,37e	33,85e	297,18g	684,76f	234,82c
F	30,25e	50,14e	30,60c	2,26c	15,57c	20,59d	46,51c	474,86c	1090,00d	348,65b
G	18,65f	0,00g	0,00e	0,00e	0,00e	0,00f	0,00g	0,00h	0,00h	0,00g
H	158,06a	59,09b	45,18a	12,57a	20,47b	38,28b	41,44d	387,76e	1259,47a	299,16d
I	140,10b	49,28e	46,36a	11,85a	27,31a	41,90a	35,55e	359,66f	1174,53c	177,97e
% CV	17,25	20,23	15,60	15,84	14,77	16,13	18,18	17,52	17,89	20,15

<sup>1</sup>Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%. <sup>2</sup>A= UFLA 03-08 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosfato natural de Araxá; B= UFLA 03-09 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosfato natural de Araxá; C= UFLA 03-10 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosfato natural de Araxá; D= UFLA 03-106 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosfato natural de Araxá; E= UFLA 03-116 + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosfato natural de Araxá; F= sem inoculação + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 6,0 g Fosfato natural de Araxá; G= sem inoculação + 1,2 mg P L<sup>-1</sup> (Mehlich-1) + 0,0 g Fosfato natural de Araxá; H= sem inoculação + 150,0 mg P L<sup>-1</sup> (adubo super triplo) + 0,0 g Fosfato natural de Araxá; I= sem inoculação + 300,0 mg P L<sup>-1</sup> (adubo super triplo) + 0,0g Fosfato natural de Araxá



## 4 Discussão

A agricultura em solos tropicais exige a aplicação de maiores doses de adubos fosfatos, pois estes solos, devido às características químicas e mineralógicas, atuam como dreno de fósforo, competindo assim, com as plantas por este nutriente. O uso de microrganismos solubilizadores de fosfatos para disponibilizar fósforo para as plantas é uma alternativa que pode ser utilizada, com o objetivo de diminuir a dosagem de fósforo recomendada para as culturas (Hameeda et al., 2008; Linu et al., 2009). No presente trabalho reportou-se a capacidade de cinco estirpes bacterianas contribuírem no crescimento de leguminosas e gramíneas, através da solubilização de fosfato, em vaso de Leonard e em vaso com solo.

### 4.1 Leguminosas em vaso de Leonard

#### 4.1.1 Feijão comum

Os resultados demonstraram que as estirpes UFLA 03-10, UFLA 03-106 e UFLA 03-116 (*Paenibacillus* sp.) contribuíram para aumentar a produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), o que relacionou com o conteúdo de fósforo absorvido pela planta. É destaque o tratamento inoculado com a estirpe UFLA 03-116 que também proporcionou maior absorção de nitrogênio, potássio, enxofre, cálcio, magnésio, cobre, ferro, manganês e zinco do que o tratamento com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (insolúvel). Estudo realizado com plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas com *Enterobacter aerogenes* também produziram maior quantidade de MSPA e MSR, e absorveram maior quantidade de fósforo e nitrogênio, quando comparado com

plantas não inoculadas na presença de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (insolúvel) (Collavino et al., 2010).

O tratamento com a estirpe UFLA 03-09 apresentou resultados positivos na solubilização de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  *in vitro* e também proporcionou maior produção de MSPA e MSR, mas não obteve efeito positivo na absorção de fósforo, evidenciando que outros mecanismos de promoção do crescimento estão envolvidos, como foi observado por de Freitas et al., (1997) e Antoun et al. (1998), além de ser corroborado pelos resultados obtidos quanto a maior absorção de nitrogênio nos tratamentos com inoculação. Collavino et al., (2010), trabalhando com a inoculação de *Burkholderia* spp., não observaram efeito positivo no crescimento do feijão comum, apesar de ter havido solubilização no ensaio *in vitro*. Efeito contrário foi observado no tratamento inoculado com a estirpe UFLA 03-116, que não foi capaz de solubilizar  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  *in vitro*, mas contribuiu com a maior absorção de macro e micronutrientes, maior produção de MSPA e MSR em feijão comum.

#### 4.1.2 Feijão caupi

Nenhuma estirpe contribuiu para o aumento na produção da MSPA do feijão caupi (*Vigna unguiculata*), mas o tratamento com a estirpe UFLA 03-08 apresentou maior conteúdo de todos os macro e micronutrientes analisados, exceto zinco, em relação ao tratamento com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (insolúvel). Tudo isso pode ter relação com a matéria seca da raiz, pois o tratamento com esta estirpe, juntamente com o tratamento com 7,75 mg de fósforo  $\text{L}^{-1}$  (solúvel) apresentaram os maiores valores de matéria seca de raiz (Figura 2). Estudos realizados com a inoculação de *Gluconacetobacter* sp., *Burkholderia* sp. e *Pseudomonas striata* em feijão caupi apresentaram efeito positivo na promoção do crescimento da parte aérea, em relação aos tratamentos com fosfato sem inoculação e com

superfosfato sem inoculação, mas este efeito não apareceu quando as estirpes foram inoculadas com e sem fosfato, além disso os tratamentos inoculados também apresentaram maior absorção de nitrogênio em relação aos tratamentos sem inoculação (Linu et al., 2009).

## 4.2 Gramíneas em vaso de Leonard

### 4.2.1 Milho

Para o milho, os resultados de MSPA, MSR e acúmulo de fósforo mostraram bem a capacidade de solubilização das estirpes *in vitro*, uma vez que aquelas que solubilizaram  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  em placa de Petri contribuíram para a absorção de fósforo pelas plantas e também para a maior produção de matéria seca da parte aérea e raízes. Destaca-se o tratamento inoculado com a estirpe UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp.) que também proporcionou maior absorção de nitrogênio, potássio, cálcio, magnésio, cobre, ferro, manganês e zinco em relação ao tratamento com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (insolúvel). Estudos realizados com plantas de *Zea mays* inoculadas com *Enterobacter agglomerans* e com fosfato de rocha, em condições estéreis, não mostraram efeito em seu crescimento (Laheurte & Berthelin, 1988). Oliveira (2011) também não observou diferença no crescimento em plantas de milho, cultivadas em vaso de Leonard, inoculadas com *Burkholderia* sp., *Burkholderia fungorum* e *Rhizobium* sp. Da mesma forma, a inoculação com os fungos *Haematonectria ipomoeae*, *Pochonia clamydosporea* var. *catenulata* e o isolado *Acremonium polychromum*, em vaso de Leonard, com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , não contribuiu com o crescimento das plantas de milho (Gomezjurado, 2011).

Estudos com milho, em solo inoculado com *Serratia marcescens* e *Pseudomonas* sp., *Bacillus coagulans*, *Enterobacter asburiae* também não

contribuíram para a promoção do crescimento das plantas em relação ao tratamento sem inoculação, com fosfato de rocha; por outro lado em condições de campo, 96 DAE, foi observado contribuição na produção da parte aérea, na produção de grãos e no acúmulo de fósforo e nitrogênio na parte aérea (Hameeda et al., 2008).

Outro resultado importante a ser discutido foi o maior conteúdo de nitrogênio apresentado pelos tratamentos inoculados, além da leguminosa, em uma espécie de gramínea, evidenciando que estas estirpes contribuem com a nutrição das plantas através de outros mecanismos de promoção do crescimento (Patten & Glick, 1996; Kuklinsky-Sobral et al., 2004; Oliveira, 2011).

#### **4.2.2 Braquiária**

Para a cultura da braquiária, as estirpes UFLA 03-09 e UFLA 03-106 demonstraram contribuir na produção de MSPA e de MSR. Contribuição que está relacionada à solubilização de fosfato pois as mesmas contribuíram com o acúmulo de fósforo nas plantas. Não foi possível encontrar trabalhos onde se avaliou a inoculação de microrganismos solubilizadores em plantas de braquiária, mas em estudo com plantas de trigo e milho, em condições de solo, inoculados com *Penicillium oxalicum* mais o fosfato de rocha observou-se grande contribuição da inoculação na MSPA, MSR, na produção e no acúmulo de fósforo na parte aérea e nos grãos (Singh & Reddy, 2011).

Como aconteceu para o milho, o acúmulo de fósforo nos tratamentos inoculados mostra a capacidade de solubilização das estirpes in vitro, 105 DAE, uma vez que todas que solubilizaram  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  em placa de Petri conseguiram contribuir na absorção de fósforo pelas plantas. Mais uma vez foi destaque a estirpe UFLA 03-09 (*Acinetobacter* sp.) que juntamente com a estirpe UFLA 03-106 proporcionaram maior absorção de nitrogênio, potássio, enxofre, cálcio,

magnésio, cobre, ferro, manganês e zinco em relação ao tratamento com  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (insolúvel), aos 105 DAE. Gulati et al (2009) demonstraram a contribuição de *Acinetobacter rhizosphaerae* na promoção do crescimento de leguminosas como o grão de bico, ervilha e o amendoim, além de gramíneas como a cevada e o milho por diferentes mecanismos, sendo que análises da solubilização de fosfatos não foram realizadas.

Novamente, o maior conteúdo de nitrogênio apresentado pelos tratamentos inoculados deve ser destacado, pois isto ocorreu em leguminosas e em gramínea e foi observado em todas as diferentes idades de corte da braquiária, evidenciando que estas estirpes contribuem com a nutrição nitrogenada das plantas.

### **4.3 Microrganismos solubilizadores de fosfato no solo**

A ausência de microrganismos solubilizadores de fosfato de cálcio, avaliado em placas de Petri, com meio NBRIP contribui no processo de seleção de estirpes para a produção de inoculantes, uma vez que o efeito observado na contribuição da nutrição fosfatada na cultura pode ter relação direta com a capacidade de solubilização das estirpes, sofrendo pouca ou nenhuma interferência da população nativa de solubilizadores.

### **4.4 Leguminosas em vaso com solo**

#### **4.4.1 Feijão comum**

Nas condições do experimento, nenhuma estirpe, nem mesmo as estirpes UFLA 03-09, UFLA 03-10, UFLA 03-106 e UFLA 03-116, que contribuíram no experimento em vaso de Leonard, contribuíram na promoção do crescimento e

nutrição das plantas. Oliveira (2011) trabalhando com a inoculação de *Burkholderia* sp., *Burkholderia fungorum* e *Rhizobium* sp., em feijão comum, em vaso de Leonard e posteriormente em vaso com solo observou-se o mesmo comportamento. É comum identificar microrganismos solubilizadores de fosfatos em condições de laboratório, o que nem sempre reflete em experimentos *in vivo* (Gyaneshwar et al., 2002; Collavino et al., 2010).

Por outro lado, em trabalho onde inoculou-se uma actinobactéria *Micromonospora endolithica* em *Phaseolus vulgaris* L., em solo, observou-se a contribuição na MSPA e no acúmulo de fósforo, nitrogênio, potássio, magnésio, enxofre e ferro (El-tarabily et al., 2008).

#### **4.4.2 Feijão caupi**

O comportamento dos tratamentos na cultura do feijão caupi (*Vigna unguiculata*) foi o contrário do observado no feijão comum, em relação aos resultados no experimento com vaso de Leonard e no experimento de vaso com solo, pois as estirpes UFLA 03-08, UFLA 03-09, UFLA 03-10, UFLA 03-106 e UFLA 03-116, que não contribuíram no crescimento em vaso de Leonard, o fizeram em vaso com solo. Hameeda et al., (2008), trabalhando com milho, observaram que em condições de casa de vegetação os microrganismos não promoveram efeito significativo no crescimento das plantas em relação ao tratamento com fosfato, mas em experimento de campo o resultado foi animador, obtendo MSPA, MSR e produção de grãos maiores com a inoculação de *Serratia marcescens* e *Pseudomonas* sp., *Bacillus coagulans*, *Enterobacter asburiae*.

É interessante ressaltar que o tratamento com a estirpe UFLA 03-116 apresentou resultados negativos na solubilização de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  *in vitro*, mas proporcionou maior produção de MSPA e maior absorção de fósforo

Gomezjurado (2011) observou o mesmo comportamento com isolados de fungos inoculados em feijão caupi.

#### **4.5 Gramíneas em vaso com solo**

##### **4.5.1 Milho**

Para o milho, os resultados com 30 DAE demonstram que nenhuma estirpe havia contribuído com o aumento da MSPA, mas as estirpes UFLA 03-09, UFLA 03-10, UFLA 03-106 e UFLA 03-116 já se destacavam apresentando maior acúmulo de fósforo em relação ao tratamento com fosfato de Araxá. Foi possível observar que aos 45 DAE as estirpes UFLA 03-08, UFLA 03-10 e UFLA 03-116 foram superiores ao tratamento com fosfato de Araxá em relação à MSPA, mas apenas a estirpe UFLA 03-116 foi maior no acúmulo de fósforo, mostrando assim, uma grande variação na promoção do crescimento de plantas em condições estéreis e não estéreis, pois esta estirpe não contribuiu com o crescimento e nutrição fosfatada do milho em vaso de Leonard. Já as demais estirpes destacaram no vaso de Leonard, o que não aconteceu no vaso com solo, e mais uma vez não representou bem a capacidade de solubilização das estirpes *in vitro*. A solubilização de fosfatos é um processo complexo que envolve tanto os microrganismos quanto as plantas e o solo. Compreender a relação entre a disponibilização de fósforo para as plantas, pela solubilização, em condições de solo, é necessário para seleção de estirpes eficientes.

Estudo realizado por Oliveira (2011) mostrou que em plantas de *Zea mays* a inoculação com *Burkholderia* sp. e *Burkholderia fungorum*, com fosfato de Araxá, em vaso com solo, contribuiu para o seu crescimento (Oliveira, 2011). O mesmo aconteceu quando inoculadas com *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, em condições de campo (Chabot et al., 1993; 1996). A inoculação de

*Pseudomonas* em plantas de milho, em vaso com solo, com fosfato de rocha, contribuíram para o crescimento e no acúmulo de fósforo, nitrogênio e potássio (Vyas & Gulati, 2009), o mesmo foi observado com inoculação de *Acinetobacter rhizopherae* (Gulati et al., 2010) e com inoculação de *Aspergillus tubingensis* e *A. niger* (Richa et al., 2007).

#### 4.5.2 Braquiária

O comportamento apresentado pela cultura da braquiária demonstrou que aos 30 DAE as estirpes UFLA 03-10, UFLA 03-106 e UFLA 03-116, apesar de não diferir do tratamento com fosfato de Araxá, já apresentavam maior acúmulo de fósforo, sendo um indicativo de contribuição na nutrição fosfatada. Entretanto, no segundo corte, 60 DAE, foi possível observar tratamentos inoculados com as estirpes UFLA 03-09, UFLA 03-10 e UFLA 03-106 apresentando maior quantidade de MSPA do que o tratamento com fosfato de Araxá, sendo que a estirpe UFLA 03-106 manteve um maior acúmulo de fósforo. Após noventa dias de cultivo, a estirpe UFLA 03-10 se destacou e apresentou MSPA equiparável ao tratamento com 150,0 mg de fósforo L<sup>-1</sup>, sendo ambos maiores que os demais tratamentos. Além disso, esta estirpe apresentou, juntamente com a estirpe UFLA 03-116, acúmulo de fósforo maior do que o tratamento com fosfato de Araxá, sendo um bom indicativo de que também responderá em experimento de campo. Em trabalho realizado com outras gramíneas, como o arroz (*Oryza sativa*), inoculado com *Pantoea agglomerans* mais o fosfato, foi possível observar uma contribuição da inoculação na produção de MSPA (Zeng et al., 2012). Em plantas de cevada (*Hordeum vulgare*) inoculadas com *Acinetobacter calcoaceticus*, a contribuição no crescimento foi além da maior produção de MSPA contribuindo também no maior acúmulo de fósforo e nitrogênio (Peix et al., 2009), em plantas de trigo



(*Triticum aestivum* ssp. vulgare cv. Bezostaja-I), inoculadas com *Acinetobacter* sp., também foi observado uma contribuição no aumento da MSPA e no acúmulo de fósforo aos 15 e 30 DAE (Ogut et al., 2010).

Os resultados deste experimento, em relação ao experimento em vaso de Leonard, diferem no que diz respeito à comparação dos tratamentos quanto ao acúmulo de fósforo, pois neste caso não representou a capacidade de solubilização das estirpes *in vitro*, uma vez que a estirpe UFLA 03-116 não solubilizou  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  em placa de Petri, mas contribuiu com a promoção do crescimento da braquiária. Isso deixa evidente que a metodologia utilizada para selecionar estirpes solubilizadoras de fosfato *in vitro* apresenta problemas, pois se a estirpe UFLA 03-116 fosse excluída já primeira etapa (pois não solubilizou  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  em placa de Petri) não se poderia observar seu potencial em experimentos *in vivo*, apontando para a necessidade de se promover melhoria na metodologia.

Novamente, o maior conteúdo de nitrogênio apresentado pelos tratamentos inoculados deve ser destacado, pois isto ocorreu em leguminosas e em gramínea, em vaso de Leonard e em vaso com solo. Além disso, o efeito foi observado em todas as diferentes idades de corte da braquiária, evidenciando que estas estirpes contribuem com a nutrição nitrogenada das plantas.

#### **4.6 Considerações finais**

A seleção de microrganismos solubilizadores de fosfatos capazes de contribuir com a promoção do crescimento de plantas e melhoria na nutrição fosfatada, para serem utilizados como produtos biotecnológicos, é um caminho a ser percorrido pela ciência. Além de diminuir a dosagem de fósforo, a prática do uso de microrganismos solubilizadores pode contribuir também na diminuição da aplicação de adubos nitrogenados, conforme foi possível observar nos

resultados deste trabalho. Entretanto, os métodos utilizados para seleção inicial destes microrganismos solubilizadores, *in vitro*, apresentam, por algum motivo, falhas, pois nestas condições microrganismos que não apresentam halo de solubilização em meio sólido ou não apresentam fósforo solúvel em meio líquido, quando inoculados em condições *in vivo* demonstraram contribuição na nutrição fosfatada e no crescimento das plantas; o contrário também é verdadeiro. Esses microrganismos apresentaram variação na contribuição do crescimento das plantas via solubilização de fosfato quando analisadas em condições estéreis e não estéreis, evidenciando que essa contribuição não depende apenas do microrganismo, mas de uma série de fatores que envolvem a planta utilizada e o ambiente edáfico presente. De qualquer forma, ficou clara a contribuição de microrganismos na promoção do crescimento de leguminosas e gramíneas por meio da melhoria da nutrição fosfatada. Os mecanismos de solubilização utilizados por estes microrganismos são diversos e precisam ser melhor elucidados, pois um microrganismo pode contribuir por diferentes formas no crescimento das plantas.

## 5 Conclusões

Estirpes de *Acinetobacter*, *Paenibacillus* e *Rhizobium* (UFLA 03-08, UFLA 03-09, UFLA 03-10, UFLA 03-106 e UFLA 03-116) contribuem para o crescimento e nutrição fosfatada e nitrogenada das culturas de feijão comum, feijão caupi, milho e braquiária, quando cultivada em vaso de Leonard;

Estirpes de *Acinetobacter*, *Paenibacillus* e *Rhizobium* (UFLA 03-08, UFLA 03-09, UFLA 03-10, UFLA 03-106 e UFLA 03-116) contribuem no crescimento e nutrição fosfatada e nitrogenada das culturas de feijão caupi, milho e braquiária quando cultivada em vaso com solo;

A cultura do feijão comum não foi favorecida no crescimento nem na nutrição fosfatada, quando inoculada com estirpes bacterianas, em vaso com solo;

A capacidade de solubilização de fosfatos analisada em condições de laboratório, *in vitro*, nem sempre corresponde com a capacidade de contribuição no crescimento e nutrição fosfatada analisada *in vivo*.

## Referências

Antoun H, Beauchamp CJ, Goussard N, Chabot R, Lalande R (1998) Potencial of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil* 204:57-67

Babana AH, Antoun H (2006) Effect of tilemsi phosphate rock-solubilizing microorganisms on phosphorus uptake and yield of field-grown wheat (*Triticum aestivum* L.) in Mali. *Plant and Soil* 287:51-58

Chabot R, Antoun H, Cecas P (1993) Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Can J Microbiol* 39:941-947

Chabot R, Antoun H, Kloepper JW, Beauchamp CJ (1996) Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*. *Applied Environment Microbiol* 62:2767-2772

Collavino MM, Sansberro PA, Mroginski LA, Aguilar OM (2010) Comparison of *in vitro* solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biol Fertil Soils* 46:727-738

De Freitas JR, Banerjee MR, Germida JJ (1997) Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol Fertil Soils* 24:358-364

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

El-Tarabily KA, Nassar AH, Sivasithamparam K (2008) Promotion of growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a calcareous soil by a phosphate-solubilizing, rhizosphere-competent isolate of *Micromonospora endolithica*. *Appl Soil Ecol* 39:161-171

Fernández LA, Zalba P, Gómez MA, Sagardoy MA (2007) Phosphate-solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. *Biol Fertil Soils* 43:805-809

Ferreira DF (2008) SISVAR: a program for statistical analysis and teaching. *Rev Symposium* 6: 36-41

Fred EB, Waksman SA (1928) *Laboratory manual of general microbiology*. New York: McGraw-Hill Book

Gomezjurado MEG (2011) Solubilização de fosfato por fungos do solo e eficiência de sua inoculação em caupi e milho. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Univeridade Federal de Lavras. Lavras

Gulati A, Vyas P, Rahi P, Kasana RC (2009) Plant Growth-Promoting and Rhizosphere-Competent *Acinetobacter rhizosphaerae* Strain BIHB 723 from the Cold Deserts of the Himalayas. *Curr Microbiol* 58:371-377

Gulati A, Sharma N, Vyas P, Sood S, Rahi P, Pathania V, Prasad R (2010) Organic acid production and plant growth promotion as a function of phosphate solubilization by *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 isolated from the cold deserts of the trans-Himalayas. *Arch Microbiol* 192:975-983

Gyaneshwar P, Kumar GN, Parekh LJ, Poole PS (2002) Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil* 245:83-93

Hameeda B, Harini G, Rupela OP, Wani SP, Reddy G (2008) Growth promotion of maize by phosphatesolubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiological Research* 163:234-242

Hoagland DR, Arnon DI (1950) *The water culture method for growing plants without soil*. Berkeley: California Agriculture Exp. Station

Kuklinsky-Sobral J, Araujo WL, Mendes R, Pizziranikleiner AA, Azevedo JL (2004) Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ Microbiol* 6:1244-1251

Laheurte F, Berthelin J (1988) Effect of a phosphate solubilizing bacteria on maize growth and root exudation over four levels of labile phosphorus. *Plant and Soil* 105:11-17

Linu MS, Stephen J, Jisha MS (2009) Phosphate solubilizing *Gluconacetobacter* sp., *Burkholderia* sp. and their potential interaction with cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *International J Agricultural Research* 4:79-87

Lopes AS (1983) Solos sob cerrado: características, propriedades e manejo. Piracicaba: Potafos

Lopes AS, Guilherme LRG (1994) Solos sob cerrado: manejo da fertilidade para a produção agropecuária. São Paulo: ANDA, (Boletim Técnico, 5)

Malavolta E, Vitti GC, Oliveira AS (1997) Avaliação do estado nutricional de plantas: Princípios e Aplicações. Potafos, Piracicaba

Marra LM, Soares CRFS, Oliveira SM, Ferreira PAA, Soares BL, Carvalho RF, Lima JM, Moreira FMS (2012) Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils Plant and Soil, XX:1-19

Moreira FMS, Siqueira JO (2006) Microbiologia e bioquímica do solo. 2ed. Lavras: UFLA

Ogut M, Er F, Kandemir N (2010) Phosphate solubilization potentials of soil *Acinetobacter* strains. Biol Fertil Soils 46:707-715

Oliveira SM (2011) Rizobactérias promovem o crescimento de feijoeiro comum e milho por diferentes processos. 103 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Lavras. Lavras

Patten CL, Glick BR (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Can J Microbiol 42:207-220

Peix A, Rivas R, Mateos PF, Molina-Martínez E, Barrueco-Rodríguez C, Velázquez E (2001) Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. Soil Biology Biochemistry 33:103-110

Peix A, Lang, E, Verbarg S, Spröer C, Rivas R, Santa-Regina I, Mateos PF, Martínez-Molina E, Rodríguez-Barrueco C, Velázquez E (2009) *Acinetobacter* strains IH9 and OC11, two rhizospheric phosphate solubilizing isolate able to promote plant growth, constitute a new genomovar of *Acinetobacter calcoaceticus*. Systematic Appl Microbiol 32:334-341

Ribeiro AC, Guimarães PTG, Alvarez VVH (1999) Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais, 5ª Aproximação. Viçosa: CFSEMG, 1999

Richa G, Khosla B, Reddy MS (2007) Improvement of maize plant growth by phosphate solubilizing fungi in rock phosphate amended soils. World J Agricultural Sciences 3:481-484

Sarruge JR, Haag HP (1979) Análises químicas em plantas. Piracicaba: ESALQ/USP

Singh H, Reddy MS (2011) Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. *European J Soil Biol* 47:30-34

Sylvester-Bradley R, Asakawa N, Torraca SLA, Magalhães FMM, Oliveira LA, Pereira RM (1982) Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amaz* 12:15-22

Vincent JMA (1970) *Manual for the Practical Study of root-nodule bacteria*. Oxford: Blackwell Scientific

Vyas P, Gulati A (2009) Organic acid production *in vitro* and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiol* 9:174-189

Xie J (2008) Screening for calcium phosphate solubilizing *Rhizobium leguminosarum*. Dissertation (Master of Science)–University of Saskatchewan, Saskatoon.

Zeng Q, Luo F, Zhang Z, Yan R, Zhu D (2012) Phosphate solubilizing rhizosphere bacterial T21 isolated from dongxian wild rice species promotes cultivated rice growth. *Applied Mechanics and Materials* 108:167-175