

CLAYTON ALBUQUERQUE DE SOUSA

SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

RECIFE  
2010

CLAYTON ALBUQUERQUE DE SOUSA

SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

RECIFE  
2010

CLAYTON ALBUQUERQUE DE SOUSA

SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciência do Solo.

Dissertação aprovada em 26 de fevereiro de 2010 pela banca examinadora:

ORIENTADOR:

---

Mario de Andrade Lira Junior

EXAMINADORES:

---

Maria Betânia Galvão dos Santos Freire

---

Maria Luiza Ribeiro Bastos da Silva

---

Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra

A meus pais, Elias Juventino de Sousa e Maria Helena de Albuquerque de Sousa por nunca terem medido esforços para oferecer boa educação aos filhos

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade de uma realização profissional, apoio e instalações cedidas para a realização do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa concedida durante os dois anos do curso.

Ao meu orientador professor Mario de Andrade Lira Junior por todo o conhecimento, incentivo, paciência e amizade doada desde minha iniciação científica até agora.

Aos co-orientadores professores Fernando José Freire pelas inúmeras discussões sobre o trabalho e por financiar parte do material necessário a execução do mesmo e Júlia Kuklinsky Sobral pela concessão das bactérias utilizadas no mesmo.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pelo conhecimento repassado durante o curso.

A Dr. Márcia do Vale Barreto Figueiredo, que por diversas vezes recorri, sempre atenciosa e disposta a tirar minhas dúvidas, além de ceder as sementes de feijão caupi.

Aos professores Newton Pereira Stamford pela concessão do fosfato de rocha utilizado no trabalho.

A professora Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos por obter e trazer a estirpe de *Pseudomonas fluorescens* da Embrapa Agrobiologia no estado do Rio de Janeiro.

Ao Dr. Lindomário Barros de Oliveira, responsável técnico pelo Laboratório de Fertilizantes e Corretivos do Laboratório Nacional Agropecuário de Pernambuco pelas análises no fosfato de rocha.

A meus pais, Elias e Maria Helena por todo amor, conselho e apoio as minhas decisões durante minha existência.

A meus irmãos Sérgio e Alan pela parceria de sempre e minha irmã Gisele a quem tenho muito carinho.

A minha esposa Luciana por toda compreensão e ajuda. Sem você seria muito mais difícil a conclusão deste trabalho.

A meu filho Lucas que apesar da pouca idade não me deixava relaxar, fazendo sempre com que seguisse em frente em busca deste objetivo.

As amigas de sempre Alice e Virgínia pelos momentos de companheirismo e diversão desde a época da graduação até agora.

A equipe de pesquisa do prof. Mario, em especial a Alexandra, Alisson, Douglas e Ivanete pela colaboração dada em momentos críticos do trabalho além do convívio de todos os dias.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE APÊNDICES.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. Introdução.....	1
2. Material e métodos.....	5
2.1 Avaliação inicial de composições de meio sólido.....	6
2.1.1 Determinação da dosagem de fosfato de rocha no meio de cultura.	6
2.1.2 Solubilização de fosfato tricálcico e fosfato de rocha em meios de cultura sólido .....	7
2.1.3 Solubilização de fosfato bicálcico em meios de cultura sólidos.....	8
2.2 Solubilização de fosfato em meio de cultura líquido.....	9
2.3 Teste da eficiência de solubilização em planta.....	10
3. Resultados e discussão.....	11
3.1 Experimentos em meios sólidos.....	11
3.2 Experimento em meios líquidos.....	17
3.3 Experimento em casa de vegetação.....	25
4. Conclusões.....	27
5. Referências Bibliográficas.....	28
6. Apêndices.....	36

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Fósforo solubilizado no meio de cultura NBRIP (N) e VERMA (V) durante 17 dias de incubação com bactérias solubilizadoras de fosfato. Valor de cada ponto representa média de três repetições subtraindo-se a média do P solubilizado do tratamento sem inoculação... 18
- Figura 2: Evolução do pH do meio de cultura NBRIP (N) e VERMA (V) durante 17 dias de incubação com bactérias solubilizadoras de fosfato. Valor de cada ponto representa média de três repetições subtraindo-se a média da redução do pH no tratamento sem inoculação..... 23

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Código de identificação e parte da planta de onde foram isoladas as bactérias solubilizadoras de fosfato utilizadas.....	6
Tabela 2: Composição química dos meios Trypticaseína de Soja (TSA), NBRIP, VERMA; NBRIP e VERMA com Apatita de Irecê e NBRIP e VERMA com fosfato bicálcico (NBRIPr; VERMAr; NBRIP2 e VERMA2 respectivamente).....	8
Tabela 3: Índice de Solubilização (IS) com intervalo de confiança de 95% avaliado aos três e dezessete dias da inoculação de 20 isolados de bactérias solubilizadoras de fosfato em meios de cultura NBRIP e VERMA sólidos.....	12
Tabela 4: Classificação de vinte isolados de bactérias de acordo com a capacidade e velocidade de solubilização de fosfato em meios de cultura NBRIP e VERMA, avaliados aos 17 dias.....	15
Tabela 5: Índice de Solubilização (IS) de 20 isolados bacterianos inoculados em meios de cultura NBRIP e VERMA sólidos.....	16
Tabela 6: Massa seca da parte aérea (MSPA) e conteúdo de fósforo da parte aérea de plantas de feijão caupi conduzidas em casa de vegetação sob duas fontes de fósforo.....	26

## LISTA DE APÊNDICES

1. Demonstração de etapas de execução do experimento com meios TSA, NBRIP e VERMA sólidos.....	36
2. Demonstração de etapas de execução do experimento com meios NBRIP e VERMA líquidos.....	37
3. Vaso de Leonard confeccionado em garrafa tipo long-neck (1) e aspecto geral das plantas de feijão caupi inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato cultivadas nos Vasos de Leonard (2).....	38
4. Análise de variância dos experimentos com meios sólidos e líquidos, e em casa de vegetação.....	39

SOUSA, Clayton Albuquerque; Mestre em Agronomia/Ciência do Solo; Universidade Federal Rural de Pernambuco; Fevereiro de 2010; Solubilização de fósforo por bactérias endofíticas; Orientador: Mario de Andrade Lira Junior; Conselheiros: Fernando José Freire, Júlia Kuklinsky Sobral.

## RESUMO

Os microrganismos do solo influenciam diretamente a fertilidade e a produtividade vegetal. Dentre estes, os solubilizadores de fosfato inorgânico aumentam a disponibilidade do fósforo e podem aumentar a eficiência de fertilizantes fosfatados. Este trabalho visou selecionar bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico como potencial promotoras de crescimento vegetal. Na primeira etapa, isolados previamente obtidos, a partir de folhas e raízes de cana de açúcar cultivada no Estado de Pernambuco, foram testados em meios de cultura sólidos com diferentes fontes de fósforo. Na segunda etapa, três dos isolados mais solubilizadores, três considerados pouco solubilizadores, um isolado não solubilizador, e uma estirpe padrão *Pseudomonas fluorescens* (R-243) foram testados em dois meios de cultura líquidos para avaliar modificação do pH e solubilização de P ao longo do tempo. Os mesmos isolados, além da ausência de inoculação, foram testados em vasos de Leonard com fontes de fósforo de alta e baixa solubilidade, utilizando feijão caupi como planta indicadora. Na colheita, aos 44 dias após o plantio, foi avaliada a massa seca da parte aérea, o teor de fósforo solúvel no substrato e na parte aérea e o conteúdo de fósforo na parte aérea. A composição do meio, tanto sólido quanto líquido, influenciou na capacidade de solubilização de fosfato pelas bactérias endofíticas. Como isolados considerados pouco solubilizadores em meio sólido, baseado em avaliação semi-quantitativa, apresentaram alto potencial de solubilização no meio líquido, com base em determinação, podemos considerar que o meio líquido apresenta resultados mais confiáveis para a seleção de isolados. Esta solubilização não está diretamente relacionada apenas com a redução do pH, já que diferentes isolados, que baixaram o pH para o mesmo ponto, apresentaram diferentes solubilizações de P. Os isolados UAGC 17, 19 e 65 foram os solubilizadores mais fortes em meio de cultura, porém não demonstraram a mesma eficiência quando inoculados em feijão caupi.

SOUSA, Clayton Albuquerque; Mestre em Agronomia/Ciência do Solo; Universidade Federal Rural de Pernambuco; February / 2010; Solubilization of phosphorus by endofhytic bacteria; Advisers: Mario de Andrade Lira Junior, Fernando José Freire, Júlia Kuklinsky Sobral.

## ABSTRACT

Soil microorganisms directly affect fertility and plant yield. Among these, inorganic phosphate solubilizers enhance phosphorus availability, and may increase phosphorus fertilizers efficiency. This work aimed to select inorganic phosphorus solubilizing bacteria as potential plant growth promoters. On the first stage, previously obtained isolates, from leaves and roots of sugarcane cultivated in Pernambuco, were tested in solid culture media with different phosphorus sources. On the second stage, three of the most solubilizing isolates, three of the least solubilizing, one considered as non-solubilizer, and a reference strain of *Pseudomonas fluorescens* (R-243) were tested in two liquid culture media to evaluate pH change and P solubilization over time. These isolates, and absence of inoculation, were tested in Leonard jars high and low solubility phosphorus sources, using cowpea as an indicator plant. At harvest, 44 days after planting, shoot dry mass, soluble phosphorus content on the substrate and phosphorus content on the shoot, and total shoot phosphorus were evaluated. Media composition, both for solid and liquid media, affected phosphorus solubilization ability of the endophytic bacteria. As isolates considered as low solubilizers in solid media, based on a semi-quantitative evaluation, presented high solubilization potential in liquid media, based on a quantitative determination, this evaluation system may be considered as more reliable for isolate selection. This solubilization was not directly related only to pH lowering, since different strains which lowered the media pH to the same point, had different soluble phosphorus yields. Isolates UAGC 17, 19 and 65 were the strongest solubilizers in culture media, but did not show the same efficiency when inoculated in cowpea.

## 1. Introdução

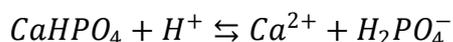
O fósforo exerce papel importante no metabolismo vegetal, participando da fotossíntese, respiração, armazenamento e transferência de energia, transferência de genes e reprodução (Stauffer & Sulewski, 2004), além de ser o macronutriente mais limitante para o crescimento e a produção agrícola em condições brasileiras (Raij, 1991).

Solos altamente intemperizados são predominantes nas regiões tropicais, como é o caso do Brasil, e são caracterizados pela baixa disponibilidade de nutrientes às lavouras, com destaque para a limitação de P. Os solos agrícolas, de modo geral, apresentam teores totais de fósforo variando de 200 a 3.000 mg dm<sup>-3</sup>, porém, menos de 0,1 % dessas reservas encontra-se disponível às plantas (Nahas, 1999).

A dinâmica do P em solos é complexa, devido ao fenômeno de fixação de P, isto é, à transformação de P-lábil em P não-lábil. Este mecanismo é explicado pela grande afinidade que o fósforo tem com Ca, Fe e Al. Os solos brasileiros são ricos no mineral caulinita, que juntamente com os óxidos hidratados de ferro e alumínio, perfaz a maior parte da composição mineralógica ou química da fração argila do solo. Esta é a fração mais ativa e onde ocorrem as reações de P com estes elementos, existindo no solo uma grande variedade de compostos de P com Ca, Fe e Al, muitos de caráter transitório, outros de caráter mais estáveis (Raij, 2004). Em solos alcalinos, ocorre a formação de compostos de cálcio cada vez mais insolúveis partindo do fosfato bicálcico (CaHPO<sub>4</sub>), primeiro mineral formado pela reação do P com o Cálcio (Raij, 2004).

Para disponibilização do P precipitado junto ao Ca, plantas e microrganismos solubilizadores de fosfato inorgânico acidificam naturalmente o solo rizosférico por meio da liberação de H<sup>+</sup> e ácidos orgânicos (Novais & Smyth, 1999; Rodríguez & Fraga, 1999). Estes últimos atuam como doadores de prótons e agentes quelantes dos íons Ca, favorecendo a solubilização do fosfato inorgânico do solo (Rodríguez & Fraga, 1999).

A solubilização de P presente no fosfato bicálcico pela redução do pH acontece de acordo com a reação descrita por Dorozhkin (2002):



O mesmo autor descreveu que o metabolismo microbiano fornece íons  $H^+$  necessários para catalisar a solubilização, e a velocidade de excreção de  $H^+$  é maior que o seu consumo pela reação, fazendo com que haja redução do pH. Após atingir o equilíbrio, o pH se eleva de maneira mais ou menos acentuada, dependendo de quanto o metabolismo é retardado em relação ao consumo de  $H^+$ , e isto varia para cada isolado testado. Com isto, verifica-se o aumento do P solubilizado no meio até atingir níveis que podem favorecer uma reprecipitação, visto que a reação descrita pode acontecer nos dois sentidos, mediada pela concentração dos compostos na solução (Delvasto *et al.*, 2006). Isto pode acontecer mais facilmente ainda se tratando de fosfato bicálcico, que é o primeiro composto insolúvel formado pela precipitação do íon fosfato junto a cálcio.

Este mecanismo explica parte do P solubilizado em função do pH e embora os mecanismos que envolvam a solubilização de P por microrganismos ainda não estejam completamente elucidados, é geralmente aceito que, além da excreção de  $H^+$ , a produção de ácidos orgânicos, ligantes orgânicos e substâncias poliméricas extracelulares são mecanismos que estão envolvidos na dissolução de P por microrganismos (Illmer & Schinner, 1995; Welch *et al.*, 2002; Yi *et al.*, 2008), e podem apresentar eficiência variada de acordo com a composição do meio (Nautiyal, 1999; Silva Filho & Vidor, 2001). Estes autores procuraram detalhar estes mecanismos que Siqueira e Franco (1988) já haviam condensado como sendo resultantes de:

- Formação de dióxido de carbono ( $CO_2$ ), resultante da mineralização do C orgânico. O  $CO_2$  produzido transforma-se em ácido carbônico ( $H_2CO_3$ ), que solubiliza fosfatos de cálcio e magnésio, enquanto outros compostos formam complexos com os metais, liberando o fosfato;
- Redução enzimática de elementos metálicos, como  $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$ . O  $Fe^{2+}$  por ser mais solúvel e facilmente absorvido tanto pelas raízes quanto pelos microrganismos, ao ser removido da molécula libera o P de fosfatos de ferro;
- Produção de ácido sulfídrico ( $H_2S$ ) em condições redutoras, favorecendo a solubilização de fosfatos de ferro, como em solos inundados;

- Produção por microrganismos quimioautotróficos de ácidos inorgânicos com ação solubilizadora, como os ácidos sulfúrico e nítrico, que dissolvem várias formas de P no solo;
- Outros mecanismos, como a presença de transportadores de alta afinidade capazes de absorver P em concentrações muito baixas e a absorção/remoção de cátions favorecendo o deslocamento do equilíbrio químico no sentido da dissolução do P.

Os microrganismos solubilizadores de fosfato inorgânico (MSFI) constituem cerca de 5 a 10% da microbiota total dos solos e a diversidade e as populações dos MSFI são consideravelmente superiores na rizosfera (Nahas *et al.*, 1994; Nautiyal, 1999). As associações com microrganismos solubilizadores de P estão entre os fatores que influenciam no potencial das espécies ou cultivares em absorver P do solo (Siqueira *et al.*, 2004).

Em se tratando da aplicação dos MSFI, Richardson (2001) aponta duas estratégias: o manejo da população indígena do solo para otimizar sua capacidade de mobilizar o P não disponível e o desenvolvimento de inoculantes microbianos específicos.

A produção de inoculantes contendo bactérias fixadoras de nitrogênio já é prática de rotina em laboratórios de microbiologia do solo, e as bactérias em geral, são um grupo de microrganismos que estão também entre os principais responsáveis pelo mecanismo de solubilização de fosfatos (Gull *et al.*, 2004). Os gêneros bacterianos com o maior potencial para utilização como inoculantes para as culturas são *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aereobacter* e *Flavobacterium* (Rodríguez & Fraga, 1999).

Em virtude desta grande variedade de organismos, a utilização de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico (BSFI) depende do conhecimento de suas características, entre as quais, a capacidade de solubilização, que varia com o microrganismo e as condições do ambiente (Silva Filho & Vidor, 2000).

Trabalhos relacionados à mobilização de fosfatos insolúveis por MSFI em ambientes agressivos como solos alcalinos, desertos e manguezais, foram conduzidos por alguns grupos de pesquisa (Goldstein *et al.*, 1999; Johri *et al.*, 1999; Vázquez *et al.*, 2000; Puente *et al.*, 2004; Son *et al.*, 2006). No entanto,

poucos estudos para conhecimento sobre este tema têm sido realizados em solos ácidos e deficientes em P.

Nestes estudos, os ensaios preliminares para seleção de BSFI são conduzidos em condições de laboratório, pela seleção dos microorganismos capazes de produzir um halo claro em placas de petri contendo meio de cultura sólido com fonte de fósforo com baixa solubilidade, e aparência leitosa. Este halo é formado devido à produção de ácidos orgânicos no meio circundante (Katznelson *et. al.*, 1962). Os principais ácidos produzidos são o glucônico e ceto-glucônico (Rodríguez & Fraga, 1999; Deubel *et. al.*, 2000) e o tipo e a concentração dos ácidos orgânicos produzidos pelos microorganismos são influenciados pela composição e concentração de substratos no meio de crescimento (Whitelaw, 2000; Pradhan & Sukla, 2005; Nahas, 2007). No entanto, a confiabilidade desta técnica é questionada porque muitos isolados que não produzem qualquer halo claro visível em placas de petri, podem solubilizar várias formas insolúveis de fosfatos inorgânicos em meio líquido (Louw & Webley, 1959; Gupta *et. al.*, 1994).

Diante disto, a proposta do trabalho foi selecionar um meio de cultura e um método de avaliação da solubilização de fosfato inorgânico por isolados bacterianos obtidos à partir de solos ácidos, e comparar isolados selecionados em resposta ao crescimento vegetal.

## **2. Material e métodos**

O trabalho foi realizado com uma coleção de 20 isolados previamente selecionados como solubilizadores de fosfato inorgânico (Tabela 1) na Unidade Acadêmica de Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco, a partir de uma coleção de 240 isolados bacterianos provenientes de plantas de cana de açúcar cultivadas na Estação Experimental de Cana de Açúcar no município de Carpina-PE (Silva *et al.*, 2009; Barbosa *et al.*, 2009).

Tabela 1: Código de identificação e parte da planta de onde foram isoladas as bactérias solubilizadoras de fosfato utilizadas

Isolado	Origem na planta	Isolado	Origem na planta
UAGC 5	Folha	UAGC 26	Folha
UAGC 7	Folha	UAGC 29	Raiz
UAGC 8	Folha	UAGC 46	Raiz
UAGC 9	Folha	UAGC 47	Raiz
UAGC 15	Folha	UAGC 51	Raiz
UAGC 16	Folha	UAGC 55	Raiz
UAGC 17	Folha	UAGC 57	Raiz
UAGC 18	Folha	UAGC 62	Raiz
UAGC 19	Folha	UAGC 65	Raiz
UAGC 23	Folha	UAGC 70	Raiz

O trabalho foi desenvolvido em diversas etapas:

1. Avaliação inicial de diferentes composições do meio sólido contendo fosfato de rocha, tricálcico ou bicálcico;
2. Seleção semi-quantitativa de isolados com base no meio sólido;
3. Avaliação quantitativa da capacidade solubilizadora dos isolados selecionados em meio líquido;
4. Avaliação dos isolados em planta.

## 2.1 Avaliação inicial de composições de meio sólido

### 2.1.1 Determinação da dosagem de fosfato de rocha no meio de cultura

O teor de fósforo em Apatita de Irecê moída foi determinado no Laboratório de Análise de Fertilizantes e Corretivos do Ministério da Agricultura, pelos métodos do fósforo total, fósforo em citrato neutro de amônio, fósforo em ácido cítrico e fósforo solúvel em água, obtendo-se respectivamente teores de 26,05; 1,20; 4,85 e 0,60% de  $P_2O_5$ .

O meio de cultura sólido Trypticaseína de Soja (TSA) (Tabela 2; RELARE, 2007) foi preparado de quatro formas diferentes: 1) de acordo com a metodologia padrão, que utiliza o fosfato bicálcico ( $CaHPO_4$ ); e três formas modificadas, utilizando doses de fosfato de rocha calculadas de acordo com os métodos do fósforo total, em citrato neutro de amônio e em ácido cítrico,

visando manter a mesma quantidade de P presente no fosfato bicálcico do meio padrão.

Os meios de cultura foram autoclavados, distribuídos em placas de Petri de 10 cm de diâmetro, que foram reservadas até solidificação do meio.

Os vinte isolados bacterianos foram multiplicados em 50 mL de meio TS, em erlenmeyers de 125 mL mantidos sob agitador rotativo durante 72h. Após isto, usando o método da gota (“drop plate”) cada placa foi inoculada individualmente com 7 µL de inóculo de cada isolado (Alikhani *et al.*, 2006), envolvida por filme plástico de PVC e mantida em estufa de crescimento bacteriológico regulada à temperatura de 28° C (ANEXO 1).

Como não foi verificada solubilização visível do fosfato de rocha neste meio, foi realizado outro experimento com fosfato tricálcico ou fosfato de rocha como fontes de P insolúveis e meios de cultura com outra composição.

### **2.1.2 Solubilização de fosfato tricálcico e fosfato de rocha em meios de cultura sólido**

Foram utilizados quatro meios de cultura sólidos: 1) Meio para solubilização de fosfato, denominado aqui de meio VERMA (Goldstein, 1986, citado por Verma *et al.*, 2001),; 2) Meio NBRIP – National Botanical Research Institute’s Phosphates (Nautiyal, 1999), ambos com o fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) como fonte de fósforo; 3) meio Verma modificado e 4) Meio NBRIP modificado. Para os últimos meios a modificação foi uso da Apatita de Irecê como fonte de P, com sua dose calculada com base no método do P total (Tabela 2).

Tabela 2: Composição química dos meios Tripticaseína de Soja (TSA), NBRIP, VERMA; NBRIP e VERMA com Apatita de Irecê e NBRIP e VERMA com fosfato bicálcico (NBRIPr; VERMAr; NBRIP2 e VERMA2 respectivamente)

Componente (g.L <sup>-1</sup> )	Meio						
	TSA	VERMA	NBRIP	VERMAr	NBRIPr	VERMA2	NBRIP2
Ágar	15	15	15	15	15	15	15
Triptona	15	-	-	-	-	-	-
Peptona de soja	5	-	-	-	-	-	-
Glicose	-	10	10	10	10	10	10
CaHPO <sub>4</sub>	4	-	-	-	-	8,95	8,95
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	-	5	5	-	-	-	-
Apatita de Irecê	-	-	-	9,8	9,8	-	-
NaCl	5	1	-	1	-	1	-
NH <sub>4</sub> Cl	-	1	-	1	-	1	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	1	0,25	1	0,25	1	0,25
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	-	5	-	5	-	5
KCl	-	-	0,2	-	0,2	-	0,2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	0,1	-	0,1	-	0,1
pH	7,0	7,2	7,0	7,2	7,0	7,2	7,0

O procedimento foi igual ao da fase anterior, e também não foi verificada solubilização dos fosfatos nos meios utilizados. Em um terceiro experimento, foi testada a solubilização de fosfato bicálcico pelos isolados.

### 2.1.3 Solubilização de fosfato bicálcico em meios de cultura sólidos

Foram utilizados três meios de cultura sólidos. 1) O meio de cultura TSA; e dois meios modificados: 2) Meio VERMA e 3) Meio NBRIP, ambos modificados pela substituição do fosfato tricálcico (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), por fosfato bicálcico (CaHPO<sub>4</sub>). Os procedimentos foram idênticos aos anteriores.

As determinações do diâmetro da colônia e da zona clara (halo) circundando o crescimento bacteriano foram feitas com paquímetro aos 3 e 17 dias após a inoculação (DAI) e os Índices de Solubilização (IS) para cada

bactéria foram obtidos através da fórmula proposta por Berraquero *et al.* (1976):

$$IS = \frac{\phi \text{ halo de solubilização (mm)}}{\phi \text{ colônia (mm)}}$$

Foi realizada uma análise descritiva para as médias e intervalos de confiança dos Índices de Solubilização (IS) aos 3 e 17 dias após a inoculação, utilizando o programa Excel para a classificação dos isolados como de baixa ( $IS < 2$ ), média ( $2 \leq IS \leq 4$ ) e alta ( $IS > 4$ ) capacidade de solubilização (Berraquero *et al.*, 1976). Foram também classificados como precoces, quando o início da solubilização se deu até o terceiro dia; tardios, com início da solubilização a partir do terceiro dia; e não solubilizadores, aqueles que não apresentaram solubilização visível até o 18º dia de avaliação (Berraquero *et al.*, 1976), dia seguinte à última avaliação do IS.

Os dados do IS aos 17 dias após inoculação foram submetidos a ANOVA e teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade através do programa SAS, considerando o delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 20x3 (vinte isolados x três meios) com três repetições. Não houve ocorrência de solubilização de fosfato bicálcico no meio de cultura TSA e foi realizada outra análise estatística, excluindo-se os dados obtidos no meio TSA. O experimento foi repetido para confirmação dos resultados. Os dados do experimento 1 foram transformados por  $1/\sqrt{(x+1)}$  e do experimento 2 transformados por  $(x+1)^{-3,3}$ , conforme indicado pelo Guided Data Analysis Procedure do SAS (Sas Institute Inc, 1999).

## 2.2 Solubilização de fosfato em meio de cultura líquido

Para esta etapa foram selecionados sete isolados bacterianos da etapa anterior, sendo os três isolados que apresentaram os maiores resultados absolutos para o IS nos meios NBRIP e VERMA (UAGC 17, 19 e 65), três considerados pouco solubilizadores (UAGC 5, 16 e 26 – resultados do IS entre 1,1 e 1,5), um isolado considerado não solubilizador (UAGC 47 – que apresentou IS apenas no meio NBRIP), além da estirpe padrão *Pseudomonas fluorescens* (R-243) obtida da coleção pertencente a Embrapa Agrobiologia, com os isolados sendo multiplicados em meio líquido Trypticaseína de Soja, em agitador rotativo a 120 rpm por 72h.

Foram utilizados os meios de cultura NBRIP e VERMA modificados, conforme etapa anterior, sem a adição de ágar. Um volume de 30 mL dos meios de cultura foi distribuído em frascos de penicilina com capacidade de 50 mL e autoclavados.

Os meios foram inoculados com 300 µL de suspensão bacteriana ( $5 \times 10^8$  ufc mL<sup>-1</sup>) e incubados em agitador rotativo (120 rpm) à 28° C. Aos 2, 4, 6, 8, 12 e 17 dias de incubação, três frascos de cada combinação isolado e meio foram retirados do agitador.

Foi retirada uma alíquota de 10 mL do meio de cada frasco, utilizando uma seringa com agulha. O meio líquido foi separado das células bacterianas através de filtro de seringa com membrana 0.22 µm (modelo 99722 Techno Plast Products AG) (ANEXO 2). O filtrado foi usado para determinação do pH e do P solúvel liberado na solução, de acordo com o método do fósforo solúvel em água (Embrapa, 1999).

Foram utilizados frascos controle não inoculados, que tiveram o pH e conteúdo de P solúvel em água determinados logo após autoclavagem e a cada intervalo posterior. Valores obtidos com os controles não inoculados foram subtraídos dos respectivos tratamentos inoculados.

O experimento foi conduzido no delineamento em blocos casualizados em arranjo fatorial 8x2x6 (sete isolados selecionados ou *Pseudomonas fluorescens* x dois meios x seis datas de avaliação), com três repetições. Quando o tempo de incubação foi significativo, foi analisado por regressão.

### **2.3 Teste da eficiência de solubilização em planta**

Os mesmos sete isolados selecionados, além da estirpe padrão e da ausência de inoculação, foram testados em casa de vegetação do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

O experimento foi conduzido em vasos de Leonard (ANEXO 3) com vermiculita de textura média, utilizando o caupi (*Vigna unguiculata*) como espécie indicadora, e solução nutritiva de Hoagland sem P (Hoagland & Arnon, 1950).

O substrato recebeu uma dose de fósforo calculada para os 0,25 dm<sup>3</sup> do vaso, com base na Recomendação de Adubação para o Estado de Pernambuco (2008), usando fosfato de potássio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - fonte solúvel) ou fosfato bicálcico (CaHPO<sub>4</sub> - fonte não solúvel).

O fósforo foi pesado e misturado para cada frasco individualmente, pela mistura em 80 mL de água, e adicionada ao substrato para homogeneização.

Sementes de feijão caupi variedade IPA-206 desinfestadas, cedidas pelo Laboratório de Microbiologia do Solo do Instituto Agrônomo de Pernambuco-IPA passaram 24h imersas em água destilada autoclavada e foram semeadas em bandeja plástica com areia lavada autoclavada por dois dias.

Os sete isolados e a estirpe padrão foram multiplicados em erlenmeyers contendo 50 mL de meio TS mantidos em agitador rotativo (120 rpm) com uma população final estimada em  $5 \times 10^8$  ufc mL<sup>-1</sup>.

No transplante, cada vaso de Leonard recebeu uma plântula cuja radícula foi imersa em meio de cultura com a suspensão bacteriana. A inoculação foi reforçada pela aplicação de 1 mL do mesmo inoculante na região ao redor do colo da raiz.

O volume inicial de 200 mL de solução nutritiva de Hoagland sem P foi completado a cada quatro dias.

A coleta das plantas se deu aos 44 dias após o transplante para avaliação da matéria seca da parte aérea, teor de fósforo na parte aérea através da digestão nitro-perclórica seguida de colorimetria com amarelo de vanadato (Embrapa, 1999) e conteúdo de fósforo na parte aérea. O fósforo solubilizado no substrato foi determinado pelo método do fósforo solúvel em água (Embrapa, 1999).

A análise estatística foi conduzida através de um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 x 9 (duas fontes de fósforo x 7 isolados ou estirpe padrão *Pseudomonas fluorescens* (R-243) ou ausência de inoculação), com três repetições.

### **3. Resultados e discussão**

#### **3.1 Experimentos em meios sólidos**

Houve crescimento das colônias de todos os isolados inoculados em todos os meios de cultura sólidos, mas nos meios de cultura com Apatita de Irecê ou com o fosfato tricálcico não houve solubilização aparente do fosfato.

Para os meios com rocha moída, o tamanho da colônia bacteriana aparentemente foi cada vez menor, com o aumento da quantidade de rocha

moída. Este resultado foi decorrente apenas de uma análise visual, já que a intenção foi medir o halo de solubilização, que não foi identificado.

Para os meios com fosfato bicálcico, a maioria dos isolados tiveram comportamento semelhante nos dois experimentos para um mesmo meio, demonstrando consistência nos resultados obtidos, principalmente no meio NBRIP (Tabela 3). Como por exemplo, os isolados UAGC 7, 17 e 46, que obtiveram IS avaliado aos 17 dias no meio NBRIP respectivamente de 1,10; 2,96 e 1,53 no 1º experimento, e IS de 1,36, 3,02 e 1,40 no 2º experimento.

Tabela 3: Índice de Solubilização (IS) com intervalo de confiança de 95% avaliado aos três e dezessete dias da inoculação de 20 isolados de bactérias solubilizadoras de fosfato em meios de cultura NBRIP e VERMA sólidos.

Isolado	Experimento 1				Experimento 2			
	Meio NBRIP		Meio VERMA		Meio NBRIP		Meio VERMA	
	3 dias	17 dias	3 dias	17 dias	3 dias	17 dias	3 dias	17 dias
	-----IS-----							
UAGC5	0,37±0,37	1,00±0,00	0,00±0,00	0,67±0,33	1,11±0,01	1,03±0,01	1,08±0,04	1,10±0,02
UAGC7	1,25±0,06	1,10±0,10	1,24±0,01	1,73±0,41	1,18±0,08	1,36±0,15	1,28±0,06	1,17±0,04
UAGC8	1,22±0,02	2,22±0,96	0,38±0,38	1,06±0,06	1,18±0,06	1,42±0,07	1,16±0,03	1,21±0,07
UAGC9	1,18±0,02	1,00±0,00	1,18±0,01	1,00±0,00	1,21±0,03	1,53±0,11	1,00±0,00	1,00±0,00
UAGC15	1,73±0,44	1,95±0,18	1,76±0,48	2,37±0,56	1,35±0,07	2,07±0,22	1,52±0,08	2,61±0,11
UAGC16	1,15±0,02	1,39±0,07	0,00±0,00	0,00±0,00	1,17±0,04	1,21±0,13	0,00±0,00	0,00±0,00
UAGC17	1,81±0,42	2,96±0,72	1,83±0,18	2,44±0,44	1,49±0,15	3,02±0,54	1,49±0,14	2,06±0,17
UAGC18	1,24±0,11	1,77±0,08	0,70±0,36	1,55±0,07	1,57±0,07	2,66±0,19	1,18±0,03	2,19±0,10
UAGC19	2,34±0,05	4,06±0,06	1,75±0,14	2,76±0,29	1,43±0,12	3,01±0,28	1,51±0,17	2,43±0,46
UAGC23	1,17±0,04	1,25±0,15	0,00±0,00	1,00±0,00	1,15±0,02	1,24±0,03	1,00±0,00	1,08±0,02
UAGC26	1,23±0,04	1,05±0,05	0,00±0,00	0,00±0,00	1,21±0,04	1,14±0,03	0,00±0,00	1,21±0,10
UAGC29	0,00±0,00	1,00±0,00	0,00±0,00	1,00±0,00	1,17±0,05	1,04±0,02	0,00±0,00	0,00±0,00
UAGC46	1,25±0,06	1,53±0,19	1,34±0,08	1,09±0,05	1,36±0,08	1,40±0,05	1,24±0,02	1,28±0,01
UAGC47	1,16±0,06	1,31±0,05	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
UAGC51	1,46±0,10	1,77±0,06	1,33±0,09	1,53±0,02	1,81±0,28	2,60±0,23	1,17±0,02	1,40±0,18
UAGC55	1,45±0,10	2,87±0,10	1,11±0,02	1,00±0,00	1,38±0,11	3,25±0,01	1,24±0,06	1,10±0,01
UAGC57	1,36±0,15	2,52±0,08	1,24±0,08	1,08±0,08	1,61±0,08	3,20±0,22	1,19±0,05	1,00±0,00
UAGC62	1,15±0,03	1,21*	1,10±0,04	0,00±0,00	1,48±0,01	1,20±0,01	1,14±0,02	1,13±0,03
UAGC65	1,91±0,03	3,68±0,01	1,47±0,03	2,25±0,07	1,96±0,28	4,51±0,20	1,58±0,13	2,08±0,05
UAGC70	1,23±0,01	1,19±0,03	0,00±0,00	1,41±0,08	1,14±0,01	1,11±0,02	0,00±0,00	1,42±0,03

\* Aos 17 dias, não foi possível calcular o intervalo de confiança por só haver uma repetição

Sharan *et al.* (2008) verificaram que a utilização de fosfato bicálcico possibilitou maiores resultados do que os fosfatos tricálcico ou de rocha em estudo de solubilização de fosfato por estirpes mutantes de *Xanthomonas campestris*. Isto pode ser de grande importância na seleção inicial de estirpes com potencial de solubilização.

De forma geral, o meio NBRIP proporcionou maiores IS's que o meio VERMA nos dois experimentos, e nas duas datas de avaliação aos 3 e 17 dias após inoculação (Tabela 3), bem como um maior número de isolados com média capacidade de solubilização, e um isolado com alta capacidade de solubilização (Tabela 4). Isto pode ser observado tomando-se, por exemplo, o isolado UAGC 65, que no primeiro experimento obteve nos meios NBRIP e VERMA um IS de 3,68 e 2,25, respectivamente com 17 dias após inoculação. No segundo experimento esses valores do IS foram de 4,51 e 2,08, respectivamente, e diferem entre si com base no intervalo de confiança de cada IS.

Este resultado confirma que a capacidade de solubilização de fosfato por bactérias pode ser influenciada pela composição do meio (Nautiyal *et al.*, 2000; Silva Filho & Vidor, 2001; Dave & Patel, 2003; Ahuja *et al.*, 2007).

O melhor potencial do meio NBRIP para demonstrar a solubilização de fosfato em comparação a outros meios foi observada por Nautiyal (1999), trabalhando com várias estirpes eficientes. O autor verificou um melhor efeito sinérgico sobre a atividade de solubilização de fosfato com  $MgCl_2$  adicionado na presença de  $MgSO_4$ . Estes dois compostos fazem parte do meio NBRIP, enquanto o meio VERMA só contém  $MgSO_4$ . Além disto, a capacidade de solubilização melhorou quando a fonte de N utilizada foi  $(NH_4)_2SO_4$ , presente no meio NBRIP, no lugar do  $NH_4Cl$ , que é a fonte de N do meio VERMA. Outros autores também reconhecem que as fontes de carbono e nitrogênio, que participam ativamente da produção de ácidos orgânicos, influenciam fortemente a solubilização de fosfatos (Dave & Patel, 2003), além de que a produção de ácidos inorgânicos pelo mecanismo de troca de prótons na presença de íon amônio acelera a solubilização de P (Nautiyal *et al.*, 2000; Ahuja *et al.*, 2007).

Em analogia, o bom ambiente proporcionado pelo meio NBRIP foi demonstrado por Xie *et al.* (2006), testando 30 isolados bacterianos em três meios adicionados de fosfato bicálcico. Os autores observaram que o tamanho dos halos para um mesmo isolado nos meios não diferiu estatisticamente, porém o maior halo de solubilização entre todos foi obtido no meio NBRIP.

No primeiro experimento, os isolados UAGC's 16, 26, 47 e 62 não apresentaram solubilização no meio VERMA, e no segundo experimento, os isolados 16, 29 e 47 foram os que não apresentaram o halo de solubilização

(Tabela 3). Já no meio NBRIP, o isolado UAGC 47 foi o único que não apresentou halo de solubilização visível, apenas no segundo experimento (Tabela 3). Para estes isolados em que não foi verificada a solubilização do fosfato, esta divergência entre os dois experimentos para um mesmo meio de cultura pode ser consequência do método de avaliação. Os isolados não apresentaram halo de solubilização com diâmetro suficiente para surgir além do limite de crescimento da colônia, já que este deve ser medido pela parte superior do meio de cultura, e receberam valor zero para o IS, mas em alguns casos foi visível o clareamento do meio de cultura abaixo da colônia bacteriana, observado pela parte inferior da placa de petri. Isto indica que alguns isolados solubilizam fosfato, mas não com capacidade de produzir um halo maior que seu próprio crescimento, pois têm baixa capacidade de solubilização, característica comum da maioria dos isolados testados, que apresentaram IS inferior a 2 (Tabelas 3 e 4).

A maioria dos vinte isolados apresentou a mesma capacidade de solubilização nos dois experimentos quando avaliada no mesmo meio (Tabela 4). No meio NBRIP, foram encontrados resultados divergentes para os isolados UAGC's 8, 19 e 51. Já no meio VERMA, apenas o isolado UAGC 18 apresentou divergência, com baixa capacidade de solubilização no primeiro experimento, e média capacidade no segundo. Esta diferença na classificação pode ser considerada pouco expressiva, visto que o valor do IS de cada isolado, e seu respectivo intervalo de confiança, ficou próximo do valor que limita as faixas de classificação quanto a capacidade de solubilização.

Tabela 4: Classificação de vinte isolados de bactérias de acordo com a capacidade (CAP) e velocidade (VEL) de solubilização de fosfato em meios de cultura NBRIP e VERMA, avaliados aos 17 dias

Isolado	Experimento 1				Experimento 2			
	Meio NBRIP		Meio VERMA		Meio NBRIP		Meio VERMA	
	CAP	VEL	CAP	VEL	CAP	VEL	CAP	VEL
UAGC5	Baixa	Precoce	Baixa	Tardia	Baixa	Precoce	Baixa	Precoce
UAGC7	Baixa	Precoce	Baixa	Precoce	Baixa	Precoce	Baixa	Precoce
UAGC8	Média	Precoce	Baixa	Precoce	Baixa	Precoce	Baixa	Precoce
UAGC9	Baixa	Precoce	Baixa	Precoce	Baixa	Precoce	Baixa	Precoce
UAGC15	Baixa	Precoce	Média	Precoce	Média	Precoce	Média	Precoce
UAGC16	Baixa	Precoce	Baixa	NS	Baixa	Precoce	Baixa	NS
UAGC17	Média	Precoce	Média	Precoce	Média	Precoce	Média	Precoce
UAGC18	Baixa	Precoce	Baixa	Precoce	Baixa	Precoce	Média	Precoce
UAGC19	Alta	Precoce	Média	Precoce	Média	Precoce	Média	Precoce
UAGC23	Baixa	Precoce	Baixa	Tardia	Baixa	Precoce	Baixa	Precoce
UAGC26	Baixa	Tardia	Baixa	NS	Baixa	Precoce	Baixa	Tardia
UAGC29	Baixa	Precoce	Baixa	Tardia	Baixa	Precoce	Baixa	NS
UAGC46	Baixa	Precoce	Baixa	Precoce	Baixa	Precoce	Baixa	Precoce
UAGC47	Baixa	Precoce	Baixa	NS	Baixa	NS	Baixa	NS
UAGC51	Baixa	Precoce	Baixa	Precoce	Média	Precoce	Baixa	Precoce
UAGC55	Média	Precoce	Baixa	Precoce	Média	Precoce	Baixa	Precoce
UAGC57	Média	Precoce	Baixa	Precoce	Média	Precoce	Baixa	Precoce
UAGC62	Baixa	Precoce	Baixa	Precoce	Baixa	Precoce	Baixa	Precoce
UAGC65	Média	Precoce	Média	Precoce	Média	Precoce	Média	Precoce
UAGC70	Baixa	Precoce	Baixa	Tardia	Baixa	Precoce	Baixa	Tardia

NS = halo de solubilização não visualizado

Também foi observado que a maioria dos isolados apresentou o halo de solubilização precocemente (Tabela 4), característica comum verificada por outros trabalhos (Silva Filho & Vidor, 2000; Pérez *et al.*, 2007; Narsian *et al.*, 2008)

Houve interação entre os isolados e meios de cultura na avaliação do IS aos 17 dias após a inoculação (Tabela 5 e ANEXO 4).

No primeiro experimento com meio NBRIP, 9 isolados não apresentaram diferença entre si e apresentaram os maiores valores do IS (UAGC's 8, 15, 17, 18, 19, 51, 55, 57 e 65), enquanto no segundo experimento o isolado UAGC 8 ficou fora deste grupo (Tabela 5). Já no meio VERMA, o primeiro experimento teve como maiores resultados para o IS os isolados UAGC's 7, 15, 17, 18, 19 e 65, enquanto no segundo os maiores IS foram encontrados para apenas 5 desses isolados (UAGC's 15, 17, 18, 19 e 65) (Tabela 5). Este resultado mostra a coerência no comportamento dos isolados no mesmo meio. O grupo de isolados que mais solubilizou fosfato bicálcico no primeiro experimento foi

praticamente o mesmo no experimento 2, e os isolados UAGC's 15, 17, 18, 19, e 65 estiveram entre os maiores solubilizadores nos dois experimentos nos dois meios.

Tabela 5: Índice de Solubilização (IS) de 20 isolados bacterianos inoculados em meios de cultura NBRIP e VERMA sólidos

Isolado	Experimento 1		Experimento 2	
	Meio NBRIP	Meio VERMA	Meio NBRIP	Meio VERMA
	-----IS-----			
UAGC5	1,00 eA	0,67 eA	1,03 fA	1,10 cdeA
UAGC7	1,10 deA	1,73 abcdeA	1,36 cdeA	1,17 cdeA
UAGC8	2,22 abcdeA	1,06 cdeA	1,42 bcdA	1,21 cdeA
UAGC9	1,00 eA	1,00 deA	1,53 bcA	1,00 eB
UAGC15	1,95 abcdeA	2,37 abcA	2,07 abA	2,61 aA
UAGC16	1,39 bcdeA	0,00 fB	1,21 cdefA	0,00 fB
UAGC17	2,96 abA	2,44 abA	3,02 aA	2,06 abA
UAGC18	1,77 abcdeA	1,55 abcdA	2,66 aA	2,19 aA
UAGC19	4,06 aA	2,76 aA	3,01 aA	2,43 aA
UAGC23	1,25 cdeA	1,00 deA	1,24 cdefA	1,08 deA
UAGC26	1,05 deA	0,00 fB	1,14 defA	1,21 cdeA
UAGC29	1,00 eA	1,00 deA	1,04 efA	0,00 fB
UAGC46	1,53 bcdeA	1,09 bcdeA	1,40 bcdA	1,28 cdA
UAGC47	1,31 bcdeA	0,00 fB	0,00 gA	0,00 fA
UAGC51	1,77 abcdeA	1,53 abcdA	2,60 aA	1,40 cdB
UAGC55	2,87 abcA	1,00 deA	3,25 aA	1,10 cdeB
UAGC57	2,52 abcdA	1,08 bcdeA	3,20 aA	1,00 eB
UAGC62	1,21 cdeA	0,00 fB	1,20 cdefA	1,13 cdeA
UAGC65	3,68 aA	2,25 abcA	4,51 aA	2,08 abA
UAGC70	1,19 cdeA	1,41 abcdA	1,11 defA	1,42 bcA
CV (%)	6,7		6,8	

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, na coluna compara isolados e na linha os meios. Experimentos 1 e 2 analisados separadamente

É importante notar que um número maior de isolados obteve maiores IS's no meio NBRIP que no meio VERMA, e que, os isolados que obtiveram os maiores IS's no meio VERMA, estão contidos no grupo do meio NBRIP, a exceção do isolado UAGC 7 do primeiro experimento. Isto indica que, em meio NBRIP sólido, alguns isolados, como por exemplo, os UAGC's 55 e 57, apresentaram uma capacidade de solubilização semelhante dentro do grupo dos maiores solubilizadores, e que no meio VERMA, estes isolados tiveram um desempenho inferior ao dos maiores solubilizadores. Isto confirma que o meio de cultura pode favorecer a atividade solubilizadora de alguns isolados.

De forma geral, a diferença para o IS entre os meios tornou-se mais evidente para os isolados pouco solubilizadores (Tabela 5). Isto indica que a diferença de composição do meio de cultura afeta mais negativamente o comportamento dos isolados que não são bons solubilizadores, chegando a inibir completamente a atividade de solubilização, como aconteceu com os isolados UAG's 16 e 29, por exemplo. Diante disto, pode-se observar que, independente do isolado ou do experimento, o meio de cultura que proporcionou maiores resultados absolutos do IS foi o NBRIP. Segundo Silva Filho & Vidor (2001), o meio de cultura pode favorecer a visualização da solubilização por alguns motivos, entre eles: restringindo o crescimento da colônia bacteriana, favorecendo a visualização do halo claro ao redor desta, ou estimulando uma maior produção ou liberação de metabólitos solubilizantes pelos isolados.

Para participar do experimento em meio líquido foram selecionados como maiores solubilizadores os isolados UAGC's, 17, 19 e 65; como pouco solubilizadores os isolados UAGC's 5, 16 e 26 e como não solubilizador o isolado UAGC 47 (que no 1º experimento não apresentou solubilização no meio VERMA, e no 2º experimento, não apresentou solubilização nos dois meios). Esta escolha teve a finalidade de formar três grupos distintos de capacidade solubilizadora para a verificação dos seus comportamentos em meio líquido.

### **3.2 Experimento em meios líquidos**

O P solubilizado e o pH sofreram efeito da interação tríplice entre os isolados, o meio de cultura e a época de avaliação (Figura 1 e ANEXO 4).

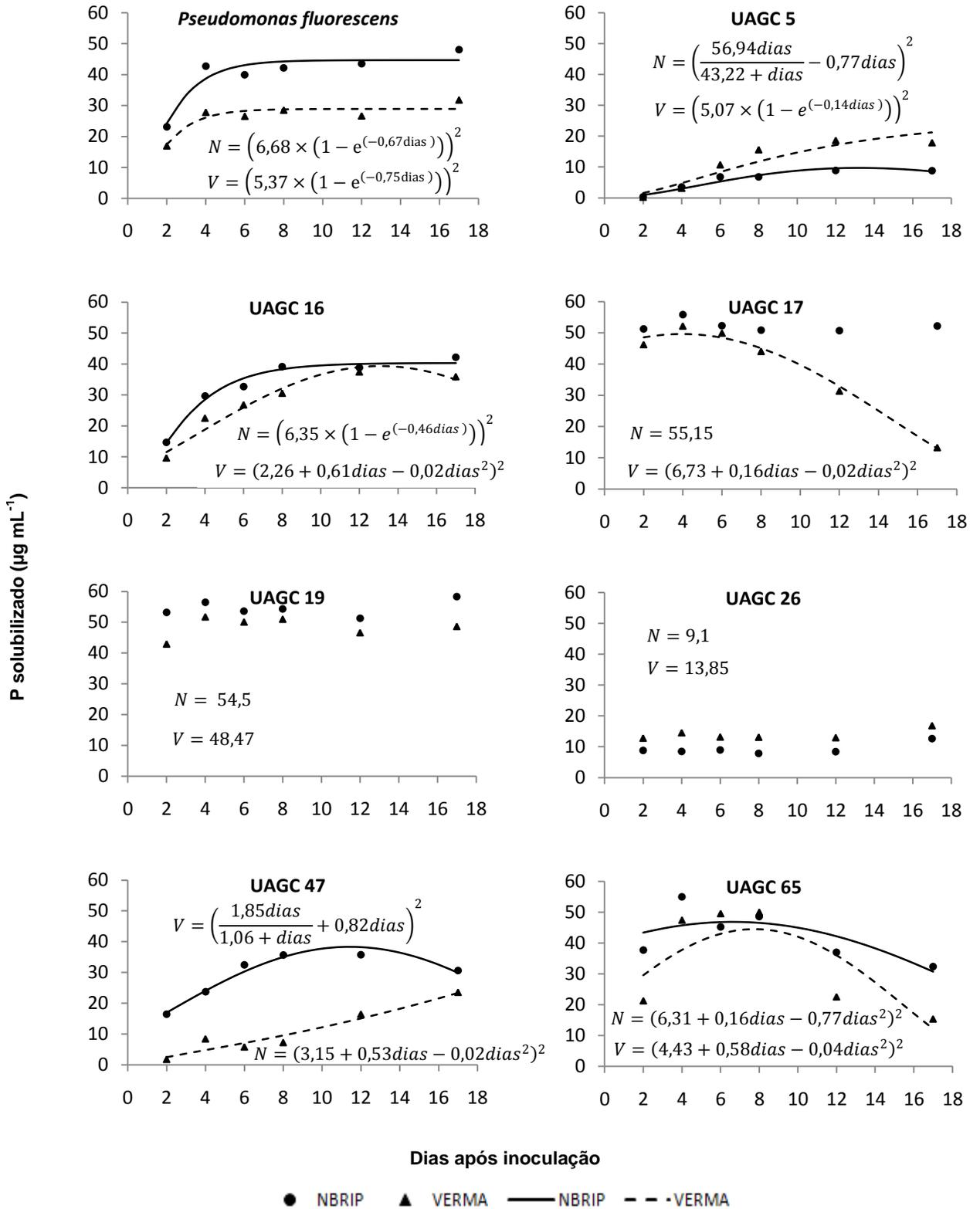


Figura 1: Fósforo solubilizado no meio de cultura NBRIP (N) e VERMA (V) durante 17 dias de incubação com bactérias solubilizadoras de fósforo. Valor de cada ponto representa média de três repetições subtraindo-se a média do P solubilizado do tratamento sem inoculação.

No meio NBRIP, a solubilização do P pelos isolados UAGC 17, 19 e 26 se manteve constante no período avaliado. Os outros isolados testados e a estirpe padrão demonstraram diferentes comportamentos na solubilização do fosfato bicálcico ao longo do período de avaliação (Figura 1).

Os isolados UAGC 17 e 19 solubilizaram no meio NBRIP, quantidades médias de 52 e 54,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de P, respectivamente, superiores, inclusive, aos da estirpe padrão, que teve uma solubilização menor no início do período de avaliação, mas crescente até estabilizar em 44  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de P ao redor do oitavo dia após a inoculação no meio NBRIP (Figura 1). A ausência de regressão significativa para os isolados UAGC's 17 e 19 no meio NBRIP significa que o meio inoculado com estes isolados, apresentou as referidas quantidades de fósforo solúvel já no 2º dia após inoculação, e manteve esse comportamento até o 17º DAI, o que neste caso é um ponto positivo. No meio VERMA estes dois isolados demonstraram comportamento diferentes, com o UAG 17 apresentando regressão significativa, enquanto o UAG 19 não. O meio de cultura possivelmente influenciou este resultado, e para o isolado UAG 17, o meio VERMA não proporcionou a mesma condição para este isolado manter níveis constantes de P solubilizado durante o período avaliado, já que, ao redor do 8º dia após inoculação, o teor de P solubilizado neste meio já foi menor do que o P solubilizado no meio NBRIP. Solubilizar grandes quantidades em pouco tempo no meio NBRIP, além de manter a capacidade de solubilização constante no período avaliado, demonstra uma característica diferenciada destes isolados em comparação a outros que, ou tiveram regressões significativas, ou tiveram regressão não significativa, mas com baixas quantidades de P solubilizado, a exemplo do isolado UAGC 26. Este isolado promoveu uma solubilização média baixa que se mostrou constante, de apenas 9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de P. Caso semelhante aconteceu com o isolado UAGC 5, com baixa solubilização e pouco crescente ao longo do tempo.

No meio VERMA, o P solubilizado pelos isolados UAGC 19 e 26 não variou do 2º dia até o 17º dia após a inoculação. Apesar de terem o mesmo comportamento constante, estes isolados se diferenciaram na quantidade de P solubilizado com uma média de 48,5 e 13,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de P, respectivamente (Figura 1). Inclusive o isolado UAGC 19 superou a estirpe padrão na quantidade de P solubilizado, pois este foi estabilizado em torno de 28  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de P ao 6º dia após inoculação.

Além do isolado UAGC 19, citado acima, os isolados UAGC's 16, 17 e 65 solubilizaram mais P que a estirpe padrão quando inoculados no meio VERMA, porém a máxima quantidade de P no meio de cultura foi encontrada em períodos diferentes, respectivamente aos 13, 4 e 8 dias após inoculação (Figura 1). O comportamento quadrático do P solubilizado por estes isolados demonstra alta capacidade solubilizadora em curto prazo, principalmente para os isolados UAGC 17 e 65, mas com perda desta capacidade em prazos distintos. A redução do P solubilizado pode ser decorrente do maior consumo de P pelas bactérias, que possivelmente atingiu a população máxima suportada no meio de cultura, incorporando à biomassa microbiana boa parte do P que foi solubilizado, associado a mecanismos de re-precipitação do P solubilizado. Esta hipótese foi sugerida por Illmer & Schinner (1995) concluindo que monitorar as alterações mineralógicas sofridas por substratos contendo P insolúvel ao longo do processo de solubilização pode ser útil para entender essas oscilações de P em solução. Posteriormente, Welch *et al.* (2002) verificaram que a concentração de P no meio de cultura próximo ao limite de saturação pode causar processos de re-precipitação.

O P solubilizado pelo isolado UAGC 16 no meio NBRIP seguiu o comportamento da estirpe padrão, mas com valores absolutos menores, crescente até o nono dia, quando estabilizou em torno de  $39 \mu\text{g mL}^{-1}$  de P até o último dia de avaliação (Figura 1).

Para o P solubilizado pelos isolados UAGC 47 e 65 no meio NBRIP, este atingiu o máximo, respectivamente, aos 11 e 7 dias após inoculação,  $38$  e  $46 \mu\text{g mL}^{-1}$  de P, mas demonstraram um comportamento diferente dos demais isolados, pois a quantidade de P solubilizado decaiu após este período (Figura 1).

Os isolados UAGC 5 e 47 não foram bons solubilizadores no meio VERMA até o 17º dia de avaliação, mas demonstraram uma tendência de aumento no P solubilizado, que pode se estender além do período avaliado, visto que no 17º dia após inoculação, já haviam superado outros isolados que foram melhores nos períodos iniciais (Figura 1). Um ponto interessante é que o isolado UAGC 5, ao final dos 17 dias, solubilizou mais fósforo no meio VERMA, fato oposto ao que aconteceu com o restante dos isolados, que sempre obtiveram maiores teores de fósforo solubilizado no meio NBRIP. Este isolado provavelmente encontrou melhores condições para expressar sua capacidade solubilizadora

no meio VERMA, que deve ter uma composição mais adequada para o desenvolvimento deste isolado.

Os resultados indicam que alguns isolados, com pouca capacidade de solubilização em meio sólido, como os isolados UAGC's 16 e 47, demonstraram mais capacidade de solubilizar fósforo quando inoculados em meio líquido. O estado físico do meio de cultura e a agitação podem ser fatores que influenciaram esses resultados, já que foram estas as principais alterações na metodologia do experimento em meio sólido para o experimento em meio líquido até a fase de avaliação. Na fase de avaliação, um fator determinante foi o próprio método utilizado, já que no meio sólido, a medição do diâmetro do halo de solubilização não permite quantificar o que foi solubilizado, enquanto em meio líquido, a determinação do teor de P solúvel no meio é uma medida que demonstra mais fielmente a capacidade solubilizadora do isolado (Gupta et al., 1994; Nautiyal, 1999; Alikhany et al., 2006) .

Comparando-se os resultados obtidos nos meio líquido (método quantitativo) e sólido (semi-quantitativo), observa-se subestimativa da solubilização real por este último em alguns casos. Por exemplo, o isolado UAGC 16 foi selecionado como pouco solubilizador, inclusive sem ter apresentado halo de solubilização no meio VERMA sólido nos dois experimentos, mas quando foi avaliado no meio NBRIP líquido, teve o comportamento semelhante ao apresentado pela estirpe padrão. Da mesma forma, o isolado UAGC 47 que foi selecionado como não solubilizador nos meios sólidos, demonstrou resultados em meio líquido maiores que dois outros isolados que haviam obtido maiores resultados na avaliação dos IS nos meios sólidos. Resultados semelhantes foram encontrados por Nautiyal, (1999) e Alikhany *et al.*, (2006). Os autores observaram que isolados com pouca capacidade de solubilização em meio sólido, obtiveram capacidades maiores de solubilizar fósforo quando inoculados em meio líquido. Uma das explicações é que, segundo Delvasto *et al.* (2006), o coeficiente de difusão em meio sólido dos ácidos produzidos pelas bactérias é diferente de acordo com o ácido produzido e com meio de cultura, assim, em meio líquido este problema não existe, fazendo com que as medições sejam mais exatas. Como consequência, outros isolados que, pelos resultados demonstrados no experimento em meio sólido não foram selecionados para esta etapa, possivelmente apresentam potencial semelhante ou até melhor que os utilizados, não podem ser

completamente descartados e merecem ser avaliados em meio líquido posteriormente.

Além dos resultados mais favoráveis do NBRIP, para os isolados com aumento e depois queda do P solubilizado, isto ocorreu de forma menos brusca e mais tardiamente neste meio, além de que, no período de avaliação, dois isolados (UAGC 17 e 19) tiveram comportamento constante com alto P solubilizado, enquanto no meio VERMA isto ocorreu apenas com um isolado (UAGC 19). Soma-se a isto o fato que, além da estirpe padrão, o isolado UAGC 16 conseguiu manter estável a quantidade de P solubilizado após o período inicial de aumento (Figura 1). Todos estes resultados indicam que o meio NBRIP proporciona uma melhor condição para a solubilização inicial e a estabilidade desta solubilização, o que pode resultar em uma maior permanência de P solubilizado em níveis mais elevados.

A inoculação promoveu forte decréscimo no pH já aos 2 dias após inoculação, visto que o pH no início do experimento era de 7,0 no meio NBRIP e 7,2 no meio VERMA. Embora a magnitude da acidificação promovida por cada isolado tenha sido distinta entre os dois meios, o comportamento geral foi semelhante em cada isolado (Figura 2).

Os isolados UAGC 17, 19, 65 e a estirpe padrão promoveram maior acidificação aos 2 dias após inoculação (Figura 2), com tendência de redução da acidificação nas datas seguintes nos dois meios, com exceção da estirpe padrão no meio NBRIP, que manteve o pH em 4,0 até o 17<sup>o</sup> dia após inoculação. Estes isolados foram os que mais solubilizaram o P nos meios de cultura, demonstrando que, para alguns isolados, a acidificação do meio pode ser a etapa inicial de todo o processo de solubilização e que, com o passar do tempo, este processo pode ser maximizado, minimizado ou permanecer estável, de acordo com outras características intrínsecas ao metabolismo de cada microrganismo.

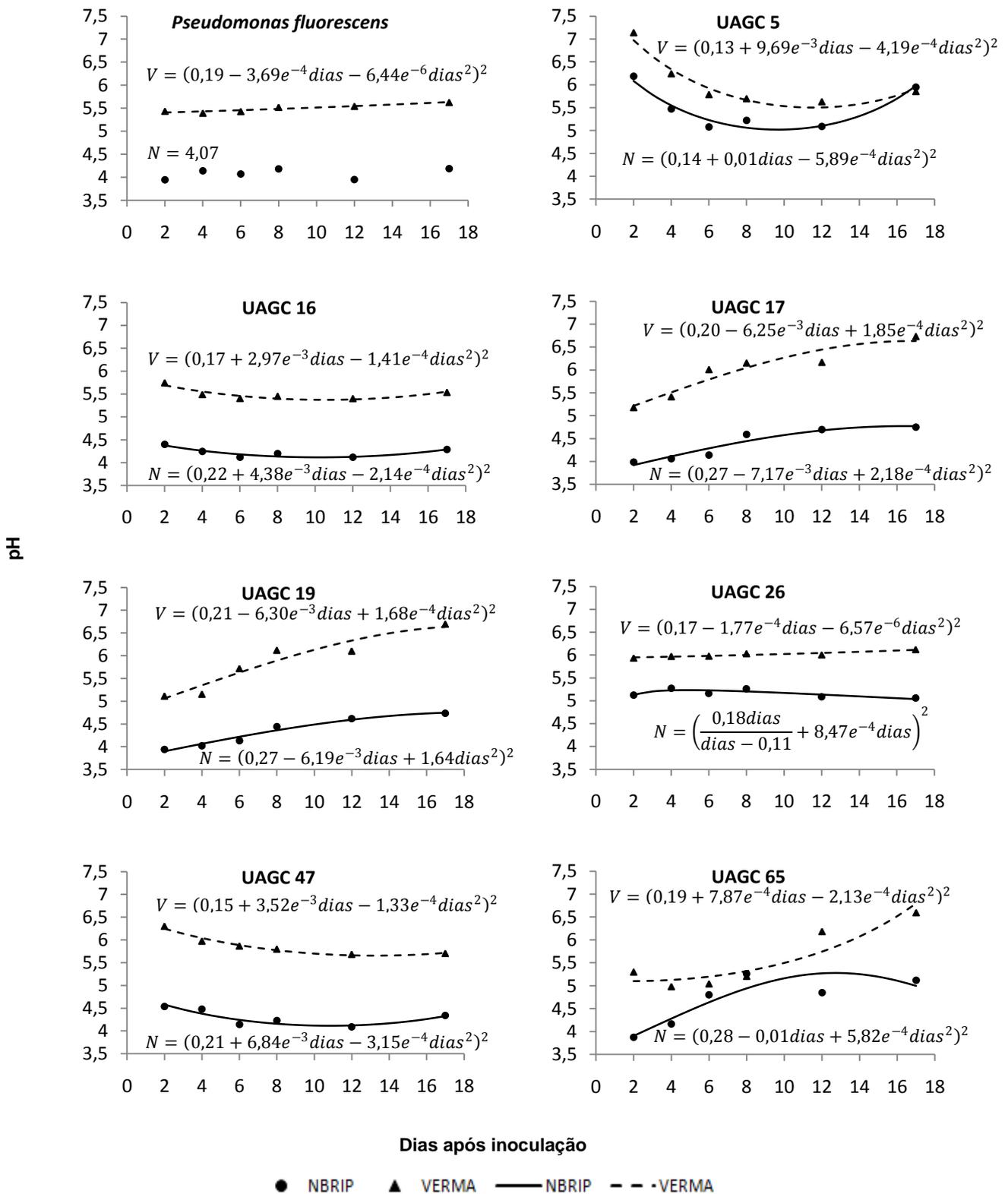


Figura 2: Evolução do pH do meio de cultura NBRIP (N) e VERMA (V) durante 17 dias de incubação com bactérias solubilizadoras de fosfato. Valor de cada ponto representa média de três repetições subtraindo-se a média da redução do pH no tratamento sem inoculação

No meio NBRIP, os isolados UAGC 16 e 47 acidificaram os meios a níveis semelhantes aos dos isolados citados acima, mas apenas aos 11 dias após a inoculação, quando se observou também a máxima solubilização de P destes isolados neste meio (Figura 2). Este fato demonstra um processo mais lento de acidificação e de solubilização do P, mas que pode atingir níveis semelhantes ao demonstrado pela estirpe padrão.

Estes mesmos isolados tiveram comportamentos diferentes no meio VERMA (Figura 2). O isolado UAGC 16 acidificou mais o meio que o UAGC 47 e mais precocemente (aos 11 e 13 dias respectivamente). Enquanto a maior solubilização de P coincidiu com a maior acidificação promovida pelo isolado UAGC 16, o mesmo não aconteceu para o UAGC 47, que apresentou maior quantidade de P solubilizado aos 17 dias após inoculação e com tendência de aumento. Este resultado demonstra que, provavelmente, existem outros fatores além da acidificação, associados ao processo de solubilização de fosfatos por bactérias (Siqueira & Franco, 1988; Silva Filho & Vidor, 2000). Paralelamente, os meios inoculados com o isolado UAGC 5 demonstraram a menor acidificação nos períodos iniciais e apresentaram a maior acidez em torno do 10<sup>o</sup> dia após inoculação. Nesta data, o nível de acidificação por este isolado no meio VERMA foi semelhante aos níveis encontrados para os acidificadores mais precoces (UAGC 17, 19, 65 e *Pseudomonas*), mas a quantidade de P solubilizado não, reforçando a idéia que não somente a acidificação do meio de cultura por bactérias governa a solubilização de fosfatos, mas diferentes isolados ou estirpes podem ter mecanismos que prevaleçam sobre outros no processo de solubilização.

Além disto, como um grupo de isolados tem maior capacidade de solubilizar o P, superando a estirpe padrão, outras características devem estar presentes para uma recomendação de bactérias para utilização como inoculantes. A exemplo da estirpe padrão, uma destas características é a manutenção do pH em níveis estáveis e que provavelmente manterá o P solubilizado também em níveis constantes ao longo do tempo. Trabalhos que avaliaram solubilização de fósforo por estirpes padrão demonstraram este comportamento constante dos níveis de pH (Illmer & Schinner, 1995; Alikhany *et al.*, 2006; Narsian *et al.*, 2008)

De forma geral, o meio NBRIP apresentou maior acidificação que o meio VERMA. Apesar de no início do experimento seu pH já ser 0,2 pontos menor

que o pH do VERMA, este fato pode ter influenciado pouco, visto que ao final do experimento, a diferença entre o pH dos dois meios inoculados com o mesmo isolado foi em alguns casos maior que 1 ponto. Um dos motivos para isto pode ser o mesmo já explorado na etapa de meio sólido, mais especificadamente, que a composição do meio influencia diretamente os mecanismos de solubilização, e que neste caso, o meio NBRIP possui compostos que potencializam a capacidade de acidificação dos isolados, ou seja, o meio NBRIP proporciona um ambiente mais estimulante aos mecanismos de acidificação.

Tanto no experimento em meios sólidos como no de meio líquido não foram encontradas relações diretas entre a origem dos isolados na planta (Tabela 1) e a capacidade de solubilização de fosfato, visto que, os três isolados que apresentaram maior solubilização do P (UAGC 17, 19 e 65) foram originários de partes distintas de cana de açúcar (folha e raiz), bem como os isolados que foram selecionados como menores ou não solubilizadores em meio sólido (UAGC 5, 16, 26 e 47) foram provenientes destes mesmos órgãos indiscriminadamente. Um aspecto importante a ser ressaltado, é que todos os isolados utilizados no presente trabalho são endofíticos, o que é uma prática incomum. Já foram observados vários trabalhos sobre solubilização de fósforo a partir de isolados obtidos de solos (Peix et al., 2001; Chung et al., 2005; Pérez et al., 2007; Linu et al., 2009), alguns com isolados de raiz (Puente et al., 2004; Sgroy et al., 2009) e raros ou inexistentes são trabalhos realizados com isolados a partir de folha de cana de açúcar. O presente estudo tem seu fundamento em fazer parte de um trabalho mais abrangente, para seleção de isolados que possam ser utilizados na produção de inoculantes para a cultura da cana de açúcar.

### **3.3 Experimento em casa de vegetação**

Não foram observados efeitos da inoculação dos isolados em plantas de feijão caupi no experimento em casa de vegetação. A massa seca da parte aérea (MSPA) e o conteúdo de P da parte aérea sofreram influência apenas das fontes de fósforo utilizadas, e não foram observadas diferenças para os teores de P no substrato e na parte aérea (Tabela 6).

Tabela 6: Massa seca da parte aérea (MSPA) e conteúdo de fósforo da parte aérea (P total) de plantas de feijão caupi conduzidas em casa de vegetação sob duas fontes de fósforo

Fonte de P	Teor de P no substrato (g kg <sup>-1</sup> )	MSPA (g planta <sup>-1</sup> )	Teor de P na planta (g kg <sup>-1</sup> )	Conteúdo de P (mg planta <sup>-1</sup> )
Fosfato de cálcio	1,10 a	1,743 b	0,121 a	20,9 b
Fosfato de potássio	1,09 a	2,521 a	0,131 a	33,0 a
CV (%)	26	23	10	11

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Dados de teor de P e conteúdo de P transformados por Log10

A maior massa seca da parte aérea e o maior conteúdo de P foram encontrados nas plantas que receberam fosfato de potássio como fonte de fósforo (Tabela 6), conforme esperado em função da alta solubilidade desta fonte. Nas plantas que receberam fosfato bi-cálcico e, portanto ficaram mais dependentes da atividade solubilizadora dos isolados, o desenvolvimento inicial pode ter sido prejudicado (observação feita apenas por uma análise visual no local do experimento) e veio refletir mais tarde em uma menor massa seca da parte aérea e conseqüentemente no conteúdo de P na parte aérea, já que a avaliação foi feita apenas no momento da colheita. Como o substrato utilizado foi vermiculita, as únicas fontes de P que existiram foram a semente, o P adicionado pelas fontes químicas e os próprios exudatos radiculares, que contém P na forma orgânica, mas que pode ser mineralizado.

Os dados da Tabela 6 mostram que ocorreu solubilização de fosfato bicálcico no substrato, e que ao final do experimento, este se encontrava em teores com níveis semelhantes ao fosfato de potássio (1,10 e 1,09 g kg<sup>-1</sup> respectivamente). Além disso, o teor de P no tecido vegetal foi semelhante também entre as duas fontes de P aplicadas. Este fato pode indicar que o tempo de duração do experimento possivelmente foi curto e que experimentos com prazo de duração mais longos permitam a observação dos resultados da inoculação na planta.

Alguma solubilização do fosfato de cálcio pode acontecer mesmo com a ausência da atividade biológica, o que já foi observado anteriormente no experimento em meio líquido, e que caracterizaria o fosfato de cálcio como de baixa solubilidade, e não completamente insolúvel. Esta pequena solubilização foi suficiente para suprir a necessidade mínima para o desenvolvimento do feijão caupi, visto que é uma cultura rústica e reconhecidamente tolerante a baixos níveis de fertilidade. O fato que reforça esta hipótese é que inclusive as plantas não inoculadas que receberam fosfato de cálcio sobreviveram até o final do experimento.

Paralelamente, outro fator pode ter contribuído para não serem verificadas diferenças entre os tratamentos de inoculação. O fato das plantas serem conduzidas em Vasos de Leonard contendo vermiculita como substrato, pode não ter sido um sistema adequado para a observação do efeito da solubilização. Nas condições do experimento, não foi possível verificar se este efeito pode ter sido causado pela própria composição ou granulometria da vermiculita, causando um efeito inibitório químico ou até físico no contato fonte de P-isolado; pela temperatura elevada do vaso de Leonard, que foi perceptível através de contato manual, apesar de não ser aferida; ou por algum outro fator externo a estes percebidos durante a condução do experimento. Mais testes precisam ser realizados com estes isolados em outras condições experimentais para que seja esclarecido qual fator pode ter influenciado no comportamento negativo dos isolados neste experimento em casa de vegetação.

#### **4. Conclusões**

A composição do meio influenciou na capacidade de solubilização de fosfato pelas bactérias endofíticas.

A avaliação em meio líquido foi o método mais confiável para indicar o potencial de solubilização de fosfato bicálcico por bactérias.

A solubilização do fosfato bicálcico não está diretamente relacionada apenas com a redução do pH.

Os isolados UAGC 17, 19 e 65 devem ser melhor estudados já que foram os maiores solubilizadores em meio de cultura.

Isolados solubilizadores de fósforo em meio de cultura não demonstraram a mesma eficiência quando inoculados em feijão caupi.

## 5. Referências Bibliográficas

AHUJA, A.; GHOSH, S.B.; D'SOUZA, S.F. Isolation of a starch utilizing phosphate solubilizing fungus on buffered medium and its characterization. *Bioresource Technology*, v.98, p.3408–3411, 2007.

ALIKHANI, H.A.; SALEN-RASTIN, N.; ANTOUN, H. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. *Plant and Soil*, v.287, p.35-41, 2006.

BARBOSA, M.V.; FREIRE, F.J.; SOBRAL, J.K.; SILVA, M.O.; COSTA, D.P.; SILVA, M.C.B.; ANDRADE, P.A.M. Bioprospecção de bactérias endofíticas de variedades de cana-de-açúcar cultivadas no estado de Pernambuco. *Anais XXII CBCS*. Fortaleza, 2009.

BERRAQUERO, F.R.; BAYA, A.M.; CORMENZANA, A.R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *Ars Pharmaceutica*, v.17, p.399-406, 1976.

CHUNG, H.; PARK, M.; MADHAIYAN, M.; SESHADRI, S.; SONG, J.; CHO, H.; SA, T. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biology and Biochemistry*, v.37, p.1970-1974, 2005.

DAVE, A.; PATEL, H.H. Impact of different carbon and nitrogen sources on phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens*. *Indian Journal Microbiology*, v.43, p.33–36, 2003.

DELVASTO, P.; VALVERDE, A.; BALLESTER, A., IGUAL, J.M.; MUÑOZA, J.A.; GONZÁLEZ, F.; BLÁZQUEZ, M.L.; GARCÍA, C. Characterization of brushite as a re-crystallization product formed during bacterial solubilization of hydroxyapatite in batch cultures. *Soil Biology & Biochemistry*, v.38, p.2645–2654, 2006.

DEUBEL, A., GRANSEE, A., MERBACH, W. Transformation of organic rhizodeposits by rhizoplane bacteria and its influence on the availability of

tertiary calcium phosphate. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, v.163, p.387–392, 2000.

DOROZHKIN, S. A review on the dissolution models of calcium apatites. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, v.44, p.45–61, 2002.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Org. Fabio Cesar da Silva. Brasília. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. 1999. 370p.

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

GULL, M.; HAFEEZ, F.Y.; SALEEM, M.; MALIK, K.A. Phosphorus uptake and growth promotion of chickpea by co-inoculation of mineral phosphate solubilising bacteria and a mixed rhizobial culture. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, v. 44, n.6, p.623-628, 2004.

GUPTA, R., SINGAL, R., SHANKAR, A., KUHAD, R.C. AND SAXENA, R.K. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *Journal General Applied Microbiology*, v.40, p.255-260, 1994.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950.

ILLMER, P.; SCHINNER, F. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v.27,p.257-263, 1995.

JOHRI, J.K., SURANGE, S., NAUTIYAL, C.S. Occurrence of salt, pH and temperature-tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils. *Current Microbiology*, v.39, p.89–93, 1999.

KATZNELSON, H.; PETERSON, E.; ROUATT, J.W. Phosphate dissolving microorganisms on seed and in the root zone of plants. *Canadian Journal Botanical*, v.40, p.1181-1186, 1962.

LINU, M.S.; STEPHEN, J.; JISHA, M.S. Phosphate solubilizing *Gluconacetobacter sp.*, *Burkholderia sp.* and their potential interaction with cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *International Journal of Agricultural Research*, v.4, p.79-87, 2009.

LOUW, H.A.; WEBLEY, D.M. A study of soil bacteria dissolving certain phosphate fertilizers and related compounds. *Journal Applied Bacteriology*, v.22, p.227-233, 1959.

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

NAHAS, E. Solubilização microbiana de fosfatos e de outros elementos. In: SIQUEIRA, J.O. *et al.* Inter-Relação Fertilidade, Biologia do Solo e Nutrição de Plantas. Lavras, SBCS, 818 p. 1999.

NAHAS, E. Phosphate solubilizing microorganisms: Effect of carbon, nitrogen, and phosphorus sources. In First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, 16–19 Julho 2002, Salamanca, Spain. Editado por E. Velázquez. p.111–115, 2007.

NARSIAN, V.; SAMAHA, A.A.S.M.; PATEL, H.H. Rock phosphate dissolution by specific yeast. *Indian Journal Microbiology*, Versão on-line, 2008.

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

NAUTIYAL, C.S.; BHADAURIA, S.; KUMAR, P.; LAL, H.; MONDAL, R.; VERMA, D. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiology Letters*, v.182, p.291– 296, 2000.

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

PRADHAN, N.; SUKLA, L.B. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *African Journal Biotechnology*, v.5, p.850–854, 2005.

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

PÉREZ, E.; SULBARÁN, M.; BALL, M.M.; YARZÁBAL, L.A. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biology and Biochemistry*, v.39, p.2905-2914, 2007.

PUENTE, M.E., BASHAN, Y., LI, C.Y., LEBSKY, V.K. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants, I: root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biology*, v.6, p.629–642, 2004.

RAIJ, B. V. Fertilidade do solo e adubação. Piracicaba, Ceres, 1991. 343p.

RAIJ, B. V. Fósforo no solo e interação com outros elementos. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S., eds. Fósforo na Agricultura Brasileira. Piracicaba, Potafos, p.107-115, 2004.

RECOMENDAÇÕES DE ADUBAÇÃO PARA O ESTADO DE PERNAMBUCO (2ª aproximação) por Francisco José de A. Cavalcanti. Recife, IPA, 2008. 198p.

RELARE – Reunião da rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbianos de interesse agrícola. Londrina, Embrapa Soja, 2007. 212p.

RICHARDSON, A.E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Australian Journal of Plants Physiology*, v. 28, p.897-906, 2001.

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

SAS INSTITUTE INC. The SAS System for Windows. Cary: SAS Institute Inc, 1999.

SGROY, V.; CASSÁN, F.; MASCIARELLI, O.; DEL PAPA, M.S.; LAGARES, A.; LUNA, V. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.85, p.371-381, 2009.

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*, v.24, p.3087–3090, 2008.

SILVA FILHO, G.N.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.36, n.12, p.1495-1508, 2001.

SILVA FILHO, G.N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.24, n.2, p.311-319, 2000.

SILVA, M.O.; FREIRE, F.J.; SOBRAL, J.K.; LIRA JUNIOR, M.A.; COSTA, D.P.; ANDRADE, P.A.M. Bioprospecção de bactérias diazotróficas associadas a

variedades de cana-de-açúcar cultivadas no nordeste. Anais XXII CBCS. Fortaleza, 2009.

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas. Brasília: MEC Ministério da Educação, ABEAS; Lavras: ESAL, FAEPE, 1988. 236p.

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

SON, H.J.; PARK, G.T.; CHA, M.S.; HEO, M.S. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt and pH tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresources Technology*, v.97, p.204–210, 2006.

STAUFFER, M.D.; SULEWSKI, G. Fósforo-Essencial para vida. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S. Fósforo na agricultura brasileira. Potafos Piracicaba-SP. 2004, 726p.

VÁZQUEZ, 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 and Fertility of Soils*, v.30, p.460–468, 2000.

VERMA S.C.; LADHA J.K.; TRIPATHI A.K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology*. v.91, p.127-141, 2001.

WELCH, S., TAUNTON, A., BANFIELD, J. Effect of microorganisms and microbial metabolites on apatite dissolution. *Geomicrobiology Journal*, v.19, p. 343–367, 2002.

WHITELAW, M.A. Growth promotion of plant inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advantages Agronomy*, v.69, p.100–151, 2000.

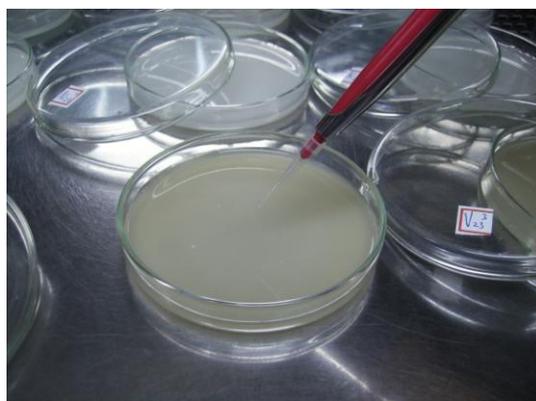
XIE, J.; KNIGHT, J.D.; LEGGETT, M.E. Comparison of media used to evaluate *Rhizobium leguminosarum* bivar *viciae* for phosphate solubilizing ability. *Canadian Journal Microbiology*. v.55, p.910–915, 2006.

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

## 6. Apêndices

### APÊNDICE 1

Demonstração de etapas de execução do experimento com meios TSA, NBRIP e VERMA sólidos.



1



3



2



4

- 1- Inoculação do meio VERMA sólido com 7 $\mu$ L de caldo bacteriano.
- 2- Incubação das placas contendo os meios sólidos TSA, NBRIP e VERMA em estufa bacteriológica.
- 3- Crescimento da colônia bacteriana do isolado UAGC 65 com presença de halo claro ao redor, indicando a solubilização de fosfato em meio NBRIP.
- 4- Placas contendo colônia bacteriana de um mesmo isolado inoculado em meio TSA (à esquerda) e meio NBRIP (à direita).

## APÊNDICE 2

Demonstração de etapas de execução do experimento com meios NBRIP e VERMA líquidos.



1



3



2



4

- 1- Seringa, filtro de seringa, tubo a vácuo e frasco de penicilina contendo meio NBRIP.
- 2- Frasco de penicilina contendo os meios NBRIP e VERMA inoculados com isolados solubilizadores de fosfato.
- 3- Sucção do meio de cultura líquido com uma seringa de 10 mL.
- 4- Filtragem do meio de cultura líquido em tubo a vácuo utilizando filtro de seringa de 0,22 µm.

### APÊNDICE 3



1



2

1- Vaso de Leonard confeccionado em garrafa tipo long-neck.

2- Aspecto geral das plantas de feijão caupi inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato cultivadas nos vasos de Leonard.

## APÊNDICE 4

Análise de variância dos experimentos com meios sólidos e líquidos, e em casa de vegetação.

Experimento com meios sólidos		
Fonte de variação	IS experimento 1	IS experimento 2
	-----Pr > F-----	
Isolado	< 0,0001	< 0,0001
Meio	< 0,0001	< 0,0001
Isolado x meio	< 0,0001	< 0,0001
R <sup>2</sup>	0,93	0,99
CV (%)	6,7	6,8

Dados do experimento 1 transformados por  $1/\sqrt{(x+1)}$  e do experimento 2 por  $(x+1)^{-3,3}$

Experimento com meios líquidos		
Fonte de variação	P solubilizado	pH
	-----Pr > F-----	
Bloco	0,4348	0,7801
Isolado	< 0,0001	< 0,0001
Meio	< 0,0001	< 0,0001
Dai	< 0,0001	< 0,0001
Isolado x meio	< 0,0001	< 0,0001
Isolado x dai	< 0,0001	< 0,0001
Meio x dai	0,0327	< 0,0001
Isolado x meio x dai	< 0,0001	< 0,0001
R <sup>2</sup>	0,98	0,99
CV (%)	6,5	2,0

Dados de P solubilizado transformados por  $\sqrt{x}$  e do pH por  $1/x$

Dai=dias após inoculação

Experimento em casa de vegetação				
Fonte de variação	Teor de P no substrato (%)	MSPA (g planta <sup>-1</sup> )	Teor de P na planta (%)	Conteúdo de P (mg planta <sup>-1</sup> )
	-----Pr > F-----			
Inoculação	0,5593	0,6751	0,6289	0,4666
Fonte de P	0,7581	<0,0001	0,6476	0,0002
Inoculação x fonte de P	0,4326	0,4513	0,3943	0,6039
R <sup>2</sup>	0,30	0,56	0,30	0,48
CV (%)	26	23	10	11

Dados de Teor de P e conteúdo de P transformados por Log10.