

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO E  
SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS POR  
BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE  
CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]**

**LEANDRO MARCIANO MARRA**

**2009**

**LEANDRO MARCIANO MARRA**

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO E SOLUBILIZAÇÃO  
DE FOSFATOS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE  
CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de  
Lavras como parte das exigências do Programa de  
Pós-graduação em Ciência do Solo, para a obtenção  
do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

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

Marra, Leandro Marciano.

Fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfatos por bactérias isoladas de nódulos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] / Leandro Marciano Marra. – Lavras : UFLA, 2009. 87 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares.

Bibliografia.

1. Diversidade fenotípica. 2. Fosfatos inorgânicos insolúveis. 3. Bactérias solubilizadoras de fosfatos. 4. Ácidos orgânicos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.389

**LEANDRO MARCIANO MARRA**

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO E SOLUBILIZAÇÃO  
DE FOSFATOS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE  
CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2009.

Prof<sup>a</sup>. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira

UFLA

Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias

UNILAVRAS

Prof. Dr. Renato Fráguas de Carvalho

UFLA

Prof<sup>o</sup>. Dr. Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares

UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

*Aos meus pais, Marilene Marciana e Waldemar Marra, pelo exemplo de luta, de dedicação, de honestidade, de humildade, pela paciência, incentivo, carinho, amor e por acreditarem neste sonho.*

**OFEREÇO**

**às minhas irmãs,**

**Cyntia Marciana Marra  
Glasiely Marciana Marra**

**às minhas sobrinhas,**

**Eduarda e Marinelly**

**ao meu sobrinho-afilhado,**

**Pedro Gabriel**

**à minha futura esposa,**

**Lindayane Cardoso 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: Luciano, Maria Ângela, Miguel, Roberto, Maria Luiza, Christian, Olinda, Sônia, Rosilene, José Teixeira, Romualdo, Onice, Anderson, Fahime, Ernani, Sabino, Maria Inês, Miguelzinho, Zulma, Cristina, Madalena, Zé Bonifácio, Ângelo, Vera, João, Ângela (*in memorian*), Abel, Suely, Rosaly, Rosângela, Hélia, Ney, Nelinha, Nhõ, Helinho, Neuza, Orozimbo, Luciene, Marrinha, Marilene, Maria, Geralda, Ladinha, Zé (*in memorian*), Valder, Lúcia, Narcísio, Heloísio, Rúbens, Renato, Débora, Dona Íria e em especial a minha Vó “Duduca” (94 anos - exemplo de vida).

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo.

Ao Professor Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares, pela oportunidade, confiança, orientação, disponibilidade, ensinamentos, sugestões e críticas.

À Professora Fátima Maria de Souza Moreira, pela disponibilidade, confiança, colaboração e sugestões apresentadas, que muito enriqueceram o trabalho.

Aos Professores Dr. Disney Ribeiro Dias e Dr. Renato Fráguas de Carvalho, pela participação na banca e pelas sugestões que muito contribuíram para a melhoria do trabalho.

Aos amigos, Manoel, Marlene, Michele Rocha, Eliane, Fabiana, e Daniela 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: Amanda, Ana Luíza, Ana Paula, Bruno, Bruna, Cândido, Cleide, Éderson, Gláucia, Jaqueline, Jerusa, Jêsse, José Geraldo, Karina, Karina (Química), Krisle, Ligiane, Maíra, Márcia, Maryeimy, Maurício, Michele Aparecida, Paula, Paulo, Pedro, Plínio, Rogério, Sílvia, Teotônio.

A todos os amigos do Departamento de Ciência do Solo.

Aos amigos e primos de “longe”: Hernane, Julliane, João Henrique, Marcelo, Inara, Rômulo, Rodriguinho, Vinícius, Sara, Olívia, Wendell, Halker, Adriana, Michel, Diogo, Elison, Elaine, Kerley, Welington, Wesley, Alessandro, Michele e Viviane Andrade que mesmo distantes, estão sempre dando aquele apoio.

Aos Professores Jackson Antônio Barbosa (UFLA) e Ubirajara Russi Nunes (UNIPAMPA) pelo grande suporte e confiança.

Ao primo-irmão de república, Thiago, obrigado pela convivência.

À Lindayane, minha namorada, pela paciência, compreensão, amor, confiança e companheirismo. Te amo.

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

Sou eternamente, Grato!

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Importância da fixação biológica de nitrogênio e do feijão caupi.....	3
2.2 Avaliação da diversidade de BFNNL.....	5
2.3 Fósforo e microrganismos solubilizadores de fosfatos.....	6
2.4 Mecanismos de solubilização de fosfatos.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Amostragem do solo e captura de bactérias que nodulam leguminosas por meio de planta isca.....	15
3.2 Isolamento e caracterização cultural de BFNNC.....	19
3.3 Autenticação e eficiência simbiótica dos isolados por meio da inoculação no hospedeiro de origem.....	20
3.4 Capacidade solubilizadora de fosfatos de cálcio, de alumínio e de ferro em meio de cultura sólido e líquido.....	23
3.5 Identificação e quantificação de ácidos orgânicos.....	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Isolamento, caracterização cultural, autenticação e eficiência simbiótica dos isolados de BFNNC.....	28
4.2 Capacidade solubilizadora em meio de cultura sólido e líquido.....	42
4.2.1 Solubilização em meio sólido.....	42
4.2.2 Solubilização em meio líquido.....	47
4.3 Identificação e quantificação de ácidos orgânicos.....	61
5 CONCLUSÕES.....	69
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
ANEXOS.....	83



## RESUMO

MARRA, Leandro Marciano. **Fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfatos por bactérias isoladas de nódulos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]**. 2009. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG<sup>1</sup>.

A fixação biológica do nitrogênio e a solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis são processos mediados por microrganismos do solo os quais podem aumentar a produtividade das culturas. O objetivo deste trabalho foi isolar e selecionar bactérias nodulíferas em caupi eficientes na fixação biológica de nitrogênio e na solubilização de fosfatos insolúveis, e identificar e quantificar os ácidos orgânicos produzidos possivelmente relacionados à capacidade solubilizadora. Estas bactérias foram isoladas de dois solos contendo concentrações elevadas de P insolúvel, oriundos das cidades de Lavras e de Patos de Minas, utilizando como planta isca o feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. Foram obtidos 78 isolados, os quais foram caracterizados de acordo com suas características culturais em meio de cultura 79 juntamente com as estirpes UFLA 03-84, INPA 03-11B e BR3267 (aprovadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA), para produção de inoculante para o feijão caupi) e também a estirpe de *Burkholderia cepacia* (LMG1222), utilizada como controle positivo na solubilização de fosfatos. Avaliou-se a eficiência simbiótica (Fixação Biológica de Nitrogênio - FBN) em casa de vegetação e a eficiência na solubilização de fosfatos insolúveis ligados a cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ), alumínio ( $\text{AlH}_6\text{O}_{12}\text{P}_3$ ) e ferro ( $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) em meio sólido e líquido. Os isolados que se destacaram na solubilização destas fontes de fosfatos foram avaliados também quanto à produção dos ácidos orgânicos: cítrico, glucônico, láctico, oxálico, propiônico e succínico. Verificou-se que as comunidades de bactérias isoladas de nódulos de feijão caupi dos dois solos são distintas e apresentam grande variabilidade na eficiência dos processos de FBN e solubilização de fosfatos insolúveis. A inoculação com os isolados L14, P6, P10, P20, P31 e P40 proporcionou maior crescimento das plantas, maior nutrição de nitrogênio e boa nodulação quando comparadas com as estirpes aprovadas pelo MAPA e com o controle nitrogenado. Maior número de isolados solubilizaram fosfatos insolúveis em meio líquido em relação ao meio sólido, e sua capacidade de solubilização decresceu na seguinte ordem: P-Ca > P-Fe > P-Al. A solubilização de P-Ca e P-Fe, pelos isolados, foi relacionada com a diminuição do pH no meio líquido. Os isolados P31 e P40 se destacaram na

---

<sup>1</sup>Comitê Orientador: Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares - UFLA (Orientador), Fátima Maria de Souza Moreira - UFLA (Co-Orientadora).

solubilização de P-Ca, enquanto os isolados P22 e P29 na solubilização de P-Al e os isolados P28 e P39 na solubilização de P-Fe, juntamente com estes se encontra a estirpe LMG1222 que também apresentou alta solubilização nas diferentes fontes de fosfatos. Os principais ácidos orgânicos produzidos por isolados selecionados foram o propiônico, láctico + succínico, glucônico, oxálico e cítrico. No entanto não houve correlação quantitativa desses com a solubilização de fosfatos. A maioria dos ácidos orgânicos produzidos por isolados com capacidade solubilizadora de P-Ca atuaram acidificando o meio de cultura, enquanto no meio com P-Fe todos atuaram quelando o íon  $Fe^{3+}$ . Desta forma, os bons desempenhos apresentados por alguns isolados nos experimentos avaliados os tornam promissores para futuros testes de eficiência agronômica em feijão caupi.

**Palavras chaves:** diversidade fenotípica, fosfatos inorgânicos insolúveis, bactérias solubilizadoras de fosfatos, ácidos orgânicos.

## ABSTRACT

MARRA, Leandro Marciano. **Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from cowpea nodules [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]**. 2009. 87p. Dissertation (Master Program in Soils Science) - Federal University of Lavras, Lavras, MG<sup>1</sup>.

The biological nitrogen fixation and solubilization of insoluble inorganic phosphates are processes mediated by soil microorganisms which can increase crop productivity. The objective of this study was to isolate and select bacteria nodulating cowpea and efficient in biological nitrogen fixation and solubilization of insoluble phosphates and, to identify and quantify the organic acids produced, possibly related to the solubilizing capacity. These bacteria were isolated from two soils containing high concentrations of insoluble P, from the cities of Lavras and Patos de Minas, by using cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] as trap species. 78 isolates were obtained which were characterized according to their cultural characteristics in the 79 culture medium together with strains UFLA 03-84, INPA 03-11B and BR3267 (approved by the Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA, for the production of cowpea inoculants) and also strain *Burkholderia cepacia* LMG1222, used as positive control in the solubilization of phosphates. To symbiotic efficiency (biological nitrogen fixation - BNF) was evaluated in the greenhouse and efficiency in the solubilization of insoluble phosphates linked to calcium (CaHPO<sub>4</sub>), aluminum (AlH<sub>6</sub>O<sub>12</sub>P<sub>3</sub>) and iron (FePO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O) on solid and liquid media. Strains with high efficiency in phosphate solubilization were also evaluated regarding the production of organic acids: citric, gluconic, lactic, oxalic, propionic and succinic. It was found that communities of bacteria isolated from cowpea nodules in the two soils are different and showed great variability in the efficiency of BNF and solubilization of insoluble inorganic phosphates. The inoculation with isolates L14, P6, P10, P20, P31 and P40 provided greater plant growth, higher nitrogen nutrition and good nodulation compared to the strains approved by MAPA and to the nitrogen control. Larger numbers of isolates solubilized phosphates in liquid than in solid medium and their solubilization capacity decreased in the following order: Ca-P > Fe-P > Al-P. The solubilization of Ca-P and Fe-P was related to the pH decrease in liquid medium. Isolates P31 and P40 stand out in the solubilization of P-Ca, while the isolates P22 and P29 in the solubilization of Al-P and isolates P28 and P39 in solubilization of Fe-P, together with these is the strain LMG1222, which also

---

<sup>1</sup>Guidance committee: Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares - UFLA (Advisor), Fátima Maria de Souza Moreira - UFLA (Co-advisor).

showed high solubility in the various sources of phosphates. The main organic acids produced by the isolates were propionic, succinic + lactic, gluconic, oxalic and citric. However there was no quantitative correlation of these with the solubilization of phosphates. Most organic acids produced by isolates capable of solubilizing Ca-P acted acidifying the culture medium, while in medium with Fe-P all isolates quelated the Fe<sup>3+</sup> ion. So the good performance shown by some isolates evaluated in the experiments make them promising for future experiments on agronomic efficiency in cowpea.

**Key words:** phenotypic diversity, insoluble inorganic phosphates, phosphate solubilizing bacteria, organic acids.

## 1 INTRODUÇÃO

Depois do nitrogênio (N), o fósforo (P) é o nutriente que mais limita o crescimento das plantas e microrganismos. Na maioria dos solos este elemento 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 vegetal. Essa baixa disponibilidade é devida tanto à sua deficiência generalizada em solos tropicais quanto à sua imobilização em decorrência das fortes interações que apresenta com os constituintes destes solos, formando fosfatos insolúveis de cálcio (Ca), alumínio (Al) e ferro (Fe). Fosfatos inorgânicos insolúveis em solos alcalinos estão associados a compostos de Ca, enquanto que em solos ácidos estão associados a compostos de Al e Fe (Raij, 1991). Dessa forma, a solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis é uma importante estratégia para aumentar a disponibilidade deste no solo.

Uma das alternativas que possibilita a melhoria na eficiência de uso das fontes de fósforo presente nos solos é o uso de microrganismos solubilizadores. Desde o final da década de 40, Gerretsen (1948) já demonstrava que algumas bactérias rizosféricas são capazes de solubilizar fosfato de rocha, resultando assim, em melhor desenvolvimento das plantas. Essa capacidade de solubilização de fosfatos insolúveis existe até mesmo entre os fitossimbiontes, sendo o rizóbio uma das espécies com maior potencial de solubilização (Rodriguez & Fraga, 1999). O principal mecanismo de solubilização de fosfatos utilizado pelos microrganismos tem sido atribuído a habilidade destes em diminuir o pH ao seu redor, principalmente, pela produção de ácidos orgânicos. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos de solubilização empregados principalmente, por bactérias da família Rhizobiaceae (Halder et al., 1990, 1991, 1992; Halder & Chakrabarty, 1993) e poucos são os trabalhos que abordam a

identificação e quantificação de ácidos orgânicos na solubilização de fosfatos insolúveis, e quando há são a maioria para P-Ca.

Nesse contexto, a utilização da simbiose leguminosa-rizóbio é um processo chave para o manejo agrícola sustentável, a fim de proporcionar às plantas menor dependência da aplicação de fertilizantes químicos, pois além da capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, alguns isolados são capazes de solubilizar fosfatos pouco solúveis, favorecendo assim, o crescimento vegetal.

Sendo assim, é importante a seleção de estirpes que, além de eficientes no processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico, sejam capazes de solubilizar fosfatos insolúveis, podendo reduzir custos, aumentando a produtividade e a lucratividade das culturas. Portanto, os objetivos do presente trabalho foram isolar e selecionar bactérias nodulíferas em caupi eficientes na fixação biológica de nitrogênio e na solubilização de fosfatos insolúveis, e identificar e quantificar os ácidos orgânicos produzidos possivelmente relacionados à capacidade solubilizadora.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Importância da fixação biológica de nitrogênio e do feijão caupi

O nitrogênio é um elemento essencial para todas as formas de vida. Nos vegetais o N é constituinte de vários compostos como os aminoácidos, ácidos nucléicos, clorofila, proteínas e enzimas. Assim, as principais reações bioquímicas em plantas e microrganismos envolvem a presença do N, o que o torna um dos elementos absorvidos em maiores quantidades pelas plantas. Por estas razões, torna-se um insumo empregado em grandes quantidades na agricultura moderna na forma de fertilizantes, o que na maior parte das culturas representa o nutriente com maior custo na fertilização das lavouras.

De todos os elementos que circulam no sistema solo-planta-atmosfera, o N é o que sofre maior número de transformações bioquímicas no solo (Moreira & Siqueira, 2006), uma vez que este ambiente é dinâmico e abriga processos importantes mediados por microrganismos, destacando-se a ciclagem de nutrientes (Bending et al., 2004). A fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) é um processo importante por aumentar o teor de nitrogênio no solo. Estima-se que a FBN contribui com 139 milhões de toneladas de nitrogênio por ano em sistemas terrestres (Moreira & Siqueira, 2006). Uma tecnologia já bem desenvolvida e utilizada no Brasil é o uso de inoculantes bacterianos como 85% da fonte de fertilizante nitrogenado na cultura da soja (Lopes, 2007), destacando-se por ser um recurso natural e renovável, de baixo custo e sem impacto ambiental, gerando economia estimada de 3,2 Tg ano<sup>-1</sup> de N para o país (Filoso et al., 2006).

A FBN é mediada por uma parcela de procariotos (bactérias) que possuem um complexo enzimático chamado nitrogenase. Estas bactérias são encontradas no solo e podem invadir (penetrar) os tecidos radiculares e ou caulinares de plantas leguminosas, provocando hipertrofia (nódulos) nestes

tecidos. Estas bactérias podem ser nomeadas de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosa (BFNNL). Nos nódulos, as BFNNL se diferenciam em bacteróides e conseguem reduzir o  $N_2$ , transformando-o em  $NH_3$ , o qual é disponibilizado para a espécie leguminosa. Esta, por sua vez, disponibiliza fontes de energia e carbono para as bactérias, formando a simbiose, onde os dois organismos se beneficiam (Moreira & Siqueira, 2006).

As leguminosas possuem o mecanismo simbiótico mais sofisticado e eficiente entre as associações de plantas com bactérias fixadoras de nitrogênio. A maioria das espécies de importância econômica é capaz de nodular e fixar nitrogênio atmosférico em condições mínimas de nitrogênio no solo. A taxa de fixação varia com a espécie, mas é geralmente limitada pelas condições abióticas do solo, como acidez e  $Al^{+3}$  tóxico (Duguma et al., 1988; Hungria & Vargas, 2000), temperatura, umidade e concentração de metais pesados (Moreira, 2008).

Dentre as leguminosas, destaca-se o feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] que é uma planta pertencente à subfamília Papilionoideae. Originário da África, sendo introduzido no Brasil no século XVII pelos portugueses colonizadores e seus escravos africanos, o feijão caupi é uma cultura importante em diversas regiões tropicais e subtropicais, onde é utilizado, principalmente, como alimento básico de elevado valor protéico pelas populações menos favorecidas. Trata-se de uma espécie bem adaptada às condições brasileiras de clima e solo, dotada de grande rusticidade que lhe confere tolerância tanto à seca como à umidade excessiva e capacidade de se desenvolver razoavelmente em áreas de baixa fertilidade (Oliveira & Carvalho, 1988).

É considerada uma leguminosa promíscua, pois pode associar-se com diversos gêneros de rizóbio para obter nitrogênio por simbiose (Lewin et al., 1987; Soares et al., 2006), possuindo as estirpes UFLA 03-84, INPA 03-11B e BR3267, recomendadas com inoculante pela RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes



Microbiológicos de Interesse Agrícola) e autorizada pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para produção de inoculante. Esta associação pode contribuir com valores entre 40 a 90% do total de nitrogênio acumulado pela cultura (Rumjanek et al., 2005). Portanto, é utilizada com sucesso como planta isca na obtenção de BFNNL.

## **2.2 Avaliação da diversidade de BFNNL**

A avaliação da diversidade de bactérias é realizada por diversas técnicas baseadas em características fenotípicas e genotípicas. Alguns exemplos de técnicas que podem ser utilizadas para a caracterização e para a avaliação da diversidade de microrganismos são a avaliação das características culturais, avaliação de perfis de proteína total por eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE (Sodium Dodecil Sulphate – Poliacrylamide Gel Electrophoresis), diversidade e filogenia dos genes *nodC* e *nifH*, composição celular de ácidos graxos, polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), amplificação de elementos repetitivos do genoma (rep-PCR), polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), hibridização DNA-DNA, entre outros (Harrison et al., 1992; Moreira et al., 1993; Pereira, 2000; Moreira & Siqueira, 2006).

Apesar destas sofisticadas técnicas moleculares, a utilização de características culturais para identificação dos isolados ainda é útil, principalmente em países que não possuem condições de utilizar tecnologias de alto custo. Dentre as características culturais que podem ser avaliadas citam-se a produção de exopolissacarídeos, o tamanho, o formato, a cor e o tempo de formação de colônias isoladas, a alteração do pH do meio de cultura e a taxa de crescimento (Vincent, 1970; Moreira et al., 1993).

Por meio destas características, os gêneros de rizóbio descritos até o momento podem ser diferenciados com base em características culturais e morfológicas em meio de cultura 79 (Fred & Waksman, 1928), conforme

abordado por Moreira (1991) e Moreira & Siqueira (2006). Jesus et al. (2005) utilizaram com sucesso as características culturais na diferenciação de isolados de bactérias fixadoras de nitrogênio provenientes de três sistemas de uso da terra, na região do Alto Solimões, localizadas no estado do Amazonas.

Muitas destas características fenotípicas são estudadas com o objetivo não somente de caracterização, mas de verificar a provável adaptabilidade ecológica dos diferentes isolados às condições ambientais prevalentes no ecossistema para o qual se procede a seleção do rizóbio-inoculante (Chagas-Júnior, 2007). Além disso, algumas dessas características, tal como produção de exopolissacarídeos (Yi et al., 2008) e alteração do pH do meio de cultura (Sperber, 1958) podem ser empregadas para diferenciar isolados que possuem capacidade de solubilizar fosfatos inorgânicos insolúveis. Portanto, estas análises de agrupamento por meio das características culturais são importantes na diferenciação destes isolados.

### **2.3 Fósforo e microrganismos solubilizadores de fosfatos**

O fósforo é um elemento importante a todas as formas de vida por compor biomoléculas como ácidos nucleicos, adenosina tri-fosfato (ATP), coenzimas, fosfoproteínas e fosfolipídeos, além de ser crucial no metabolismo das plantas, desempenhando papel importante na transferência de energia da célula, na respiração e na fotossíntese (Raghothama, 1999; Grant et al., 2001). Nos humanos, este nutriente é responsável por 20% dos minerais do corpo (Stauffer & Sulewsku, 2004).

Dentre os vários nutrientes que as plantas precisam para a produção, o fósforo é o mais limitante nos solos tropicais e sub-tropicais, devido à sua dinâmica, tornando limitada a produtividade vegetal nestes solos (Malavolta, 1976; Raij, 1991; Novais & Smith, 1999; Novais et al., 2007).

O Brasil possui a maior área de terras agricultáveis do mundo, mas esta é dominada por solos de baixa fertilidade que requerem a aplicação de grandes quantidades de corretivos e fertilizantes, destacando-se os fosfáticos. As culturas brasileiras apresentam excelentes respostas a fósforo, que se tornou um insumo essencial para o agronegócio brasileiro, especialmente nas novas fronteiras do cerrado, onde mais de 90% dos solos apresentam extrema deficiência em P, com menos de 2 mg kg<sup>-1</sup> de P 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 matéria prima importada. Portanto, o P é um recurso estratégico para o país, pois sem este nossa produção fica comprometida.

Segundo Lopes et al. (2004) as reservas mundiais de rochas fosfáticas para a produção de fertilizantes são adequadas para os próximos 120 anos, considerando os padrões e processos de transformações atuais. Por isso, é necessário dar prioridade a pesquisas que possam aumentar a eficiência de utilização de P pelas plantas cultivadas, contribuindo assim, para aumentar a vida útil das jazidas de rochas fosfáticas em exploração, lembrando que este elemento não tem sucedâneo e é finito.

O balanço de nutrientes na agricultura brasileira feita por Malavolta (2002) mostra que o N apresenta déficit de 2,6 milhões de toneladas ano<sup>-1</sup> e o potássio (K) apresenta déficit de 1,2 milhões de toneladas ano<sup>-1</sup>, ambos considerados altos, mas para o P há um balanço positivo de 0,59 milhões de toneladas ano<sup>-1</sup>, indicando grande retenção no solo. De fato, a quantidade de P em diferentes frações em solos brasileiros cultivados por mais de 10 anos aumentou em média 2,8 vezes para fosfato de alumínio, 2,3 vezes para fosfato de ferro e praticamente sem alteração para fosfato de cálcio (Motta et al., 2002). A maior parte do P aplicado ao solo fica retida em suas partículas, acumulando-se, com o tempo, na forma de fosfato inorgânico insolúvel, que são estáveis e podem ser determinado por fracionamento químico (Chang & Jackson, 1957),

com a predominância de fosfato de ferro > fosfato de alumínio > fosfato de cálcio para a maioria dos solos. 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). Goldstein et al. (1993) estimam que a quantidade de P acumulada nos solos agrícolas seria suficiente para sustentar a produção agrícola mundial por cerca de 100 anos sem a adição do P extra, se o P retido já aplicado nos solos pudesse ser aproveitado pelas culturas.

Vários grupos importantes da comunidade microbiana edáfica ou da rizosfera possui a habilidade de solubilizar fosfatos inorgânicos insolúveis, por meio de mecanismos diversos (Gerretsen, 1948; Sperber, 1957, 1958; Paul & Sundara-Rao, 1971; Sylvester-Bradley et al., 1982; Gyaneshwar et al., 1998; Rashid et al., 2004), tornando a solubilização de diferentes fontes de fósforo insolúveis (ortofosfatos, hidroxapatita, variscita, strengita e etc) uma das principais alternativas sustentáveis para aumentar a quantidade deste nutriente disponíveis às plantas (Ralston & McBride, 1976; Laheurte & Berthelin, 1988; Chabot et al., 1993, 1996, 1998; Antoun et al., 1998; Kim et al., 1998; Pal, 1998; Gyaneshwar et al., 2002; Souchie et al., 2005b; Richa et al., 2007). Gerretsen (1948) conseguiu demonstrar que a atividade microbiana na rizosfera pode dissolver o fósforo inorgânico insolúvel e promover o crescimento de plantas.

Essa capacidade solubilizadora existe até mesmo entre os fitossimbiontes, como rizóbio (*Allorhizobium*, *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 et al., 2004; Alikani et al., 2006; Daimon et al., 2006; Rivas et al., 2006; Sridevi et al., 2007), sendo que Rodriguez & Fraga (1999) destacam o *Rhizobium*, juntamente com

*Pseudomonas* e *Bacillus*, como as espécies com maiores potencial de solubilização.

Além da capacidade de fixar nitrogênio contribuindo para o balanço desse nutriente nos ecossistemas, quando em simbiose com espécies da família Leguminosae, os isolados de rizóbio também solubilizam fosfatos inorgânicos insolúveis, disponibilizando o fósforo para as plantas, tornando assim, 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 et al., 2008) e Gramineae (Chabot et al., 1993, 1996; Peix et al., 2001; Selvakumar et al., 2008).

Alguns trabalhos têm demonstrado que a inoculação de *Rhizobium* promove a solubilização de fósforo do solo aumentando a produção de espécies não leguminosas como milho e alface (Chabot et al., 1993, 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 isolados de *Mesorhizobium mediterraneum* promoveu o crescimento, aumentando a produção de matéria seca, a absorção de nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio e cálcio 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 insolúveis, ainda que bactérias desse grupo sejam estudadas como fixadoras simbióticas de nitrogênio em leguminosas.

Microrganismos com capacidade de solubilizar diferentes formas de fosfatos têm maior potencial para o aproveitamento do P presente na fase sólida do solo, constituindo-se em alternativa viável para inoculação de plantas.

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.

A inoculação pode introduzir alterações nas populações do solo que podem aumentar a disponibilidade de nutrientes e conseqüentemente o crescimento e rendimento das plantas. No entanto, para a maximização do processo de solubilização, ainda há a necessidade de um melhor conhecimento destes microrganismos e dos mecanismos utilizados na solubilização, uma vez que este processo não é explorado mesmo em pequena escala.

#### **2.4 Mecanismos de solubilização de fosfatos**

A capacidade dos microrganismos solubilizar fosfatos inorgânicos insolúveis tem sido atribuída a capacidade destes em reduzir o pH ao seu redor. Segundo Stumm & Morgan (1995) e Whitelaw (2000) o abaixamento do pH promove uma maior solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis tais como  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{AlPO}_4$  e  $\text{FePO}_4$ .

Neste contexto, têm-se duas teorias sobre os mecanismos de solubilização: a teoria da produção de ácidos orgânicos (Sperber, 1957, 1958; Duff & Webley, 1959; Taha et al., 1969; Halder et al., 1990; Cunningham &

Kuiack, 1992; Hariprasad & Niranjana 2009), e a teoria da extrusão de prótons ( $H^+$ ) (Illmer & Schinner, 1992; Illmer et al., 1995).

A teoria dos ácidos orgânicos é frequentemente, a mais aceita e estudada pelos pesquisadores. Nesta teoria as fontes de fosfatos inorgânicos insolúveis são solubilizadas pelos microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) por meio da produção de ácidos orgânicos que tanto podem diminuir o valor do pH quanto atuar como agentes quelantes dos metais acompanhante do íon fosfato (Ca, Al e Fe) (Bolan et al., 1994; Nahas, 1999; Lin et al., 2006) Assim, o fosfato inorgânico insolúvel é convertido a fosfatos solúveis ( $H_2PO_4^-$  e  $HPO_4^{2-}$ ), os quais se tornam disponíveis para as plantas.

Nesta teoria a oxidação da glicose, por meio da enzima glicose desidrogenase (GDH), a ácido glucônico, que por ação da enzima ácido glucônico desidrogenase (GADH) é oxidada a ácido 2-cetoglucônico, resultando na acidificação da região ao redor da célula, forma o metabolismo básico e eficiente de solubilização de fosfatos para algumas bactérias Gram negativas (Kpombrekou-A & Tabatabai, 1994; Babu-Khan et al., 1995; Rodriguez & Fraga, 1999; Kim et al., 2003; Song et al., 2008). Lin et al. (2006), estudando a influência dos prótons ( $H^+$ ) liberados na oxidação do ácido glucônico, demonstraram claramente que a concentração de prótons em solução é um dos fatores mais importantes na solubilização de fosfatos por *Burkholderia cepacia*. Portanto, a solubilização de fosfatos por meio da oxidação dos ácidos orgânicos, e conseqüente diminuição do pH, requer um suprimento adequado de  $H^+$ .

Vários ácidos orgânicos são produzidos por MSF (Tabela 1). Um ácido identificado em estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv *viceae*, que apresentou capacidade de solubilização entre 47 e 52% de fosfato de rocha em meio de cultura extrato de levedura glicose (AYG), após três dias de incubação, foi o ácido 2-cetoglucônico (Halder et al., 1990). Alikhani et al. (2006), trabalhando com isolados de rizóbio, após 15 dias de incubação em meio Sperber (1958)

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

MSF	Ácidos Orgânicos <sup>(1)</sup>	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	O + C + G	Illmer et al. (1995)
<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	G + O	Hariprasad & Niranjana (2009)
<i>Azotobacter</i> sp	O + G + S + T + F + L	Yi et al. (2008)
<i>Bacillus megaterium</i>	L + Mal	Taha et al. (1969)
<i>Bacillus megaterium</i>	P + C + L	Chen et al. (2006)
<i>Bacillus subtilis</i>	Ib + G	Hariprasad & Niranjana (2009)
<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>Enterobacter</i> sp	O + C + M + S + T + F	Yi et al. (2008)
<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>Rodococcus erythropolis</i>	G + C	Chen et al. (2006)
<i>Serratia marcescens</i>	G + C + S + L	Chen et al. (2006)

<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.

demonstraram uma capacidade de solubilização de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , por *Rhizobium leguminosarum* bv *viceae* na ordem de 39,4%, *Sinorhizobium meliloti* na ordem de 22,5%, *Mesorhizobium ciceri* e *M. mediterraneum* na ordem de 20,4% e



*Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* na ordem de 17,7%, todos apresentando diminuição de pH.

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 metal 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 (lático, glucônico, propiônico, fumárico, acético) possuem baixa habilidade de complexação, já os que têm dois ou mais grupos (málico, oxálico, tartárico, succínico, cítrico) apresentam uma maior habilidade de complexação (Kpombrekou-A & Tabatabai, 2003). A constante de estabilidade do ácido-metal envolvidos, como demonstrado por Jones (1998), também interfere neste processo, onde os ácidos cítrico, málico e oxálico apresentam alta afinidade pelos metais trivalentes  $Fe^{3+}$  e  $Al^{3+}$ . Johnson & 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. Já Essington et al. (2005), estudando a influência dos ácidos 2-cetoglucônico e cítrico na solubilidade dos minerais gibbsita e goethita, verificaram a especial importância destes, no ciclo do fósforo, onde eles aumentaram a solubilidade do fosfato.

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

Alguns autores (Halder et al., 1990; Hwangbo et al., 2003; Chuang et al., 2007) demonstraram que a quantidade de P solubilizada por diferentes microrganismos foi equivalente à produção de ácidos orgânicos no meio de

cultura. Entretanto, para Illmer et al. (1995) não existe uma correlação linear e positiva da solubilização de fosfato com a quantidade de ácido produzido. Foi neste contexto que estes autores propuseram a teoria da extrusão de prótons ( $H^+$ ), uma vez que, apenas a produção de ácidos orgânicos não seria o único mecanismo de solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis. Eles observaram que a solubilização também é dependente dos mecanismos que envolvem o crescimento microbiano e que favorecem a extrusão de prótons ( $H^+$ ) resultantes da assimilação de  $NH_4^+$  ou pelo mecanismo de translocação do  $H^+$  pela ATPase no processo de produção de energia pela hidrólise do ATP.

Illmer & Schinner (1992), avaliando a solubilização de  $Ca_5OH(PO_4)_3$  por *Pseudomonas* sp. e *Penicillium aurantiogriseum*, observaram que houve solubilização sem, necessariamente, haver produção de ácidos orgânicos. A liberação de  $H^+$  acompanhada da absorção de  $NH_4^+$  estaria relacionada com a solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis (Illmer et al., 1995; Xie, 2008). Vários trabalhos têm demonstrado que a quantidade de fósforo solubilizado em meio com amônio é maior do que em meio com nitrato (Asea et al., 1988; Nautiyal, 1999; Sridevi et al., 2007; Sharan et al., 2008).

Outros mecanismos devem existir, visto que correlações negativas significativas entre pH e P solúvel não foram encontradas por alguns autores (Nahas, 1996; Chaiham & Lumyong, 2009; Jha et al., 2009), evidenciando assim, que pode ocorrer solubilização sem, necessariamente, haver diminuição de pH.

Portanto, independente 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).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Amostragem do solo e captura de bactérias que nodulam leguminosas por meio de planta isca

As amostras de solos foram coletadas na cidade de Lavras – MG, nas coordenadas: S 21° 13' 43,6'' e W 44° 58' 19,4'', e na cidade de Patos de Minas – MG, nas coordenadas: S 18° 35' 52,7'' e W 46° 29' 10,8'', onde estes são classificados como Latossolo Vermelho distroférico (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, 2006). Em Lavras as amostras foram coletadas em uma área sob floresta tropical subperenifólia sendo seu material de origem produto da alteração do gabro (LVdfg), o qual apresenta conteúdo de P-ataque sulfúrico no valor de 210,0 mg kg<sup>-1</sup>, apresentando as principais frações de P ligado a Fe e Al. Já em Patos de Minas as amostras foram coletadas em uma área sob floresta tropical subcaducifólia sendo seu material de origem produto da alteração de tufito (LVdft) o qual, por sua vez, apresenta conteúdo de P-ataque sulfúrico no valor de 3569,0 mg kg<sup>-1</sup> sendo as principais frações de P ligado a Fe, Al e Ca. Na Tabela 2 encontram-se os atributos químicos, físicos e mineralógicos destes solos.

TABELA 2 Atributos químicos, físicos e mineralógicos dos solos.

Atributos	LVdfg – Lavras	LVdft – Patos de Minas
pH H <sub>2</sub> O	4,4	4,9
P (mg dm <sup>-3</sup> ) Mehlich-1	0,8	80,3
P (mg dm <sup>-3</sup> ) Resina	9,8	88,5
P (mg dm <sup>-3</sup> ) Remanescente	5,1	2,4
P-ataque sulfúrico (mg dm <sup>-3</sup> )*	210,0	3569,0
P-Fe	66	839
P-Al	35	703

...continua...

TABELA 2, Cont.

P-Ca	6	283
P-Ca / (P-Al + P-Fe)	0,06	0,18
S (mg dm <sup>-3</sup> )	13,7	23,4
K (mg dm <sup>-3</sup> )	41,8	53,2
Ca <sup>2+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,1	0,5
Mg <sup>2+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,1	0,4
Al <sup>3+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1,5	0,8
H + Al (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	11,6	10,3
SB (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,3	1,0
CTC <sub>e</sub> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1,8	1,8
CTC <sub>i</sub> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	11,9	11,3
V %	2,6	8,8
m %	83	48
MO (dag kg <sup>-1</sup> )	3,8	5,9
Zn (mg dm <sup>-3</sup> )	0,5	0,7
Fe (mg dm <sup>-3</sup> )	165,4	68,9
Mn (mg dm <sup>-3</sup> )	4,5	40,5
Cu (mg dm <sup>-3</sup> )	3,0	5,4
Argila (g kg <sup>-1</sup> )	640	580
Silte (g kg <sup>-1</sup> )	160	240
Areia (g kg <sup>-1</sup> )	200	180
Fe <sub>o</sub> <sup>(1)</sup> (g kg <sup>-1</sup> )*	2,9	5,3
Fe <sub>d</sub> <sup>(2)</sup> (g kg <sup>-1</sup> )*	87	121
Ct <sup>(3)</sup> (g kg <sup>-1</sup> )*	240	0
Gb <sup>(4)</sup> (g kg <sup>-1</sup> )*	200	260
Fe <sub>o</sub> /Fe <sub>d</sub> *	0,03	0,04
Gt/Gt + Hm*	0,34	0,09
Gt/Ct + Gb*	0,55	0,00
CMAF <sup>(5)</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )*	1393	3000

K-Fe-Zn-Mn-Cu – Extrator - Mehlich-1. Ca-Mg-Al – Extrator - KCl - 1 mol L<sup>-1</sup>. H + Al – Extrator - SMP. S – Extrator – Fosfato monocálcico em ácido acético. SB = Soma de Bases Trocáveis. CTC<sub>e</sub> – Capacidade de troca catiônica efetiva. CTC<sub>i</sub> - Capacidade de troca catiônica a pH 7,0. V = Índice de Saturação de Bases. m = Índice de Saturação de Alumínio. Mat. Org. (MO) – Oxidação Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 4N + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 N. <sup>(1)</sup>Ferro extraído com oxalato de amônio; <sup>(2)</sup>Ferro extraído com

ditionito-citrato-bicarbonato; <sup>(3)</sup>Caulinita; <sup>(4)</sup>Gibbsita; <sup>(5)</sup>Capacidade máxima de adsorção de fósforo. \*Atributos mineralógicos retirados de Motta et al. (2002).

Foram amostrados aleatoriamente cinco pontos equidistantes dentro de cada área, sendo que em cada ponto foram coletadas três amostras simples de solo, na camada de 0-20 cm, utilizando o trado de rosca, o qual foi limpo com papel toalha e flambado antes da coleta em cada ponto para evitar contaminação microbiológica. Também foi retirada a serrapilheira de cada ponto para proceder à coleta. As três amostras simples foram divididas em amostras compostas formada por duas simples destinadas à análise microbiológica (cerca de 300g), que foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis *Nasco*®, armazenadas em recipientes de isopor, para conservação, e levadas para o laboratório, no qual foram conservadas a -4°C até o uso. A outra amostra simples foi utilizada para realização das análises química e física do solo, totalizando cinco amostras por cidade. Cada amostra foi seca ao ar e passada em peneira de malha de 2 mm, para obtenção da terra fina seca ao ar (TFSA). As análises químicas seguiram os métodos compilados em Embrapa (1997) e foram realizadas no Laboratório de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas da Universidade Federal de Lavras.

Para capturar as bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em caupi (BFNNC), um experimento foi conduzido em casa de vegetação do Laboratório de Microbiologia do Solo no Departamento de Ciência do Solo na Universidade Federal de Lavras, nos meses de dezembro de 2007 a fevereiro de 2008, em vasos de Leonard (Vincent, 1970). Como planta isca, utilizamos o feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cultivar BR-17 Gurguéia.

A parte superior do vaso continha aproximadamente 500 cm<sup>3</sup> da mistura de areia com vermiculita na proporção de 1:1 (v/v), e a inferior continha solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950), com a seguinte composição por litro de solução: NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 11,4 mg; KNO<sub>3</sub> 60,7 mg; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 95,0 mg; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 500,0 mg; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 261,3 mg; Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O 126,0 mg; CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 344,0 mg; H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub> 2,86 mg; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 1,81 mg; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

0,22 mg;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,08 mg;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,023 mg; Fe-EDTA 1 mL, apresentando baixa concentração de nitrogênio ( $21,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ N}$ ), diluída duas vezes, sem correção de pH. Após o preparo dos vasos e da solução nutritiva estes foram autoclavados por uma hora, à pressão de  $1,5 \text{ kg cm}^{-2}$  a  $127 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Subamostras de 5 g de solo das amostras compostas foram usadas como fonte de inóculo, estas foram colocadas sobre e no centro da mistura de areia + vermiculita na parte superior dos vasos. Foram preparados 6 vasos para cada amostra composta, totalizando 30 vasos para o solo de Lavras e 30 vasos para o solo de Patos de Minas.

As sementes foram desinfestadas superficialmente com etanol 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio a 2% por 2 minutos. Em seguida as sementes foram lavadas seis vezes com água destilada esterilizada. Posteriormente, foram imersas em água estéril por 2 horas e colocadas em placas de petri com algodão umedecido (autoclavados), por 12 horas em câmara de crescimento a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ . Foram semeadas 4 sementes pré-germinadas por vaso, visando o imediato contato das raízes das plantas com isolados de BFNNC presentes no solo inóculo. 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), com a finalidade de evitar possíveis contaminações. No sexto dia após a germinação, foi realizado o desbaste, deixando-se somente duas plantas por vaso.

A solução nutritiva dos vasos foi periodicamente repostada com solução autoclavada. Aproximadamente 60 dias após a germinação, período que ocorreu o florescimento, as plantas foram seccionadas na base do caule. Foram selecionados das raízes das plantas, nas quais ocorreu nodulação, dois dos

maiores nódulos com coloração intensa avermelhada, indicando a atividade da FBN, sendo estes imediatamente processados para o isolamento das BFNNC.

### **3.2 Isolamento e caracterização cultural de BFNNC**

Para realizar o isolamento das BFNNC, os nódulos selecionados no experimento anterior passaram por uma desinfestação superficial, onde foram, primeiramente, imersos em álcool etílico 95%, por 30 segundos, com o objetivo de quebrar a tensão superficial, imersos posteriormente em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), por 1 minuto, para desinfestar a superfície do nódulo, e depois lavados seis vezes em água destilada esterilizada. Os nódulos então foram esmagados, com o auxílio de uma pinça devidamente esterilizada, sendo o conteúdo espalhado em forma de estrias compostas para obtenção de colônias isoladas em placas contendo o meio de cultura 79 (Fred & Waksman, 1928), com azul de bromotimol, pH 6,8. De cada nódulo foi obtido um isolado. Após a purificação dos isolados, estes foram armazenados em tubos rosqueáveis de plástico com meio 79 sólido à temperatura de  $-4^{\circ}C$  e também em tubos do tipo “ependorf” com meio líquido, acrescido de glicerol 20%, à temperatura de  $-80^{\circ}C$ .

Após o isolamento, os microrganismos foram caracterizados de acordo com suas características culturais em meio de cultura 79 (Fred & Waksman, 1928). Foram avaliadas taxa de crescimento, medida pelo tempo de aparecimento de colônias isoladas (rápido - 2 a 3 dias; intermediário - 4 a 5 dias; lento - acima de 5 dias), alteração do pH do meio de cultura (acidificação, neutralização e alcalinização), produção de goma (polissacarídeos extracelulares; pouca, moderada, abundante), absorção de indicador e características das colônias tais como: tamanho (diâmetro médio das colônias), forma (circular, irregular), borda (inteira, ondulada); elevação (lente, convexo, plana, drop-like), superfície (lisa, rugosa), consistência (seca, gomosa, aquosa), transmissão de luz (opaco, brilhante) e coloração das colônias, conforme

metodologia descrita por Moreira (1991) e Jesus et al. (2005). A caracterização foi realizada assim que se constatou o crescimento da colônia no meio.

Posteriormente, os isolados foram agrupados com base na caracterização cultural, juntamente com as estirpes aprovadas pelo MAPA como inoculante para o caupi: UFLA 03-84 (*Bradyrhizobium* sp.), INPA 03-11B (*Bradyrhizobium elkanii*) e BR3267 (*Bradyrhizobium japonicum*). Os dendogramas foram construídos por meio de todas as características culturais juntamente com a confirmação da nodulação ou não no feijão caupi, com base em sua porcentagem de similaridade realizada pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean), utilizando o coeficiente de Jacard, com o programa estatístico NTSYS (*Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System, version 2.0 Applied Biostatistics, New York*).

### **3.3 Autenticação e eficiência simbiótica dos isolados por meio da inoculação no hospedeiro de origem**

Para confirmar ou não a capacidade nodulífera dos isolados e também sua eficiência simbiótica foi conduzido um experimento, em casa de vegetação, no Departamento de Ciência do Solo na Universidade Federal de Lavras, nos meses de maio a julho de 2008, em vasos de Leonard (Vincent, 1970) (Figura 1).





FIGURA 1 Vista parcial do experimento de autenticação e eficiência simbiótica.

O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado, com 83 tratamentos e 3 repetições. Os tratamentos foram constituídos pelos 78 isolados obtidos no experimento anterior, juntamente com as três estirpes referências, UFLA 03-84, INPA 03-11B e BR3267, aprovadas pelo MAPA para a cultura do feijão caupi, e dois controles não inoculados, um com nitrogênio mineral ( $210,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ N}$ ) e outro sem nitrogênio mineral ( $21,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ N}$ ), este dois últimos com o objetivo de servir de controle a possível contaminação e posterior comparação com as plantas inoculadas.

A parte superior do vaso continha  $500 \text{ cm}^3$  da mistura de areia e vermiculita na proporção 1:2 (v/v), e a inferior continha solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950), conforme descrita anteriormente, mas diluída 4

vezes. O preparo dos vasos, das sementes e o desbaste seguiu a mesma metodologia utilizada no experimento de captura dos isolados.

Os isolados e as estirpes referências foram previamente crescidos em meio 79 (Fred & Waksman, 1928) líquido, num período de três dias sob agitação constante 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. Nos controles foi inoculado apenas 1 mL de meio 79 estéril.

A reposição de solução nos vasos seguiu a seguinte ordem: até 20º dia foi repostada com solução nutritiva estéril, a partir do 21º dia foi repostada um dia com H<sub>2</sub>O destilada esterilizada intercalada com solução nutritiva esteril até o final do experimento. A temperatura média da casa de vegetação foi avaliada semanalmente, identificando-se a média das mínimas de 15 °C e a média das máximas de 36 °C. A máxima obtida foi 42 °C e a mínima 13 °C.

Para relacionar o teor de nitrogênio foliar durante o ciclo da cultura com o teor foliar final foram realizadas leituras com o clorofilômetro (SPAD-502) no estádios fenológicos R1 (30 dias após emergência - DAE), R2 (40 DAE), R3 (50 DAE), e R4 (60 DAE) (Campos et al., 2000).

As plantas foram colhidas no período de floração, estágio R6 do ciclo cultural do feijão caupi, para avaliar as seguintes variáveis: matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR), área foliar (AF), determinada em aparelho medidor de área, modelo LI-3000A (LI-COR, Lincoln, USA), número de nódulo (NN), matéria seca de nódulos (MSN), teor de nitrogênio (N%), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) e eficiência relativa (ER%). A ER dos tratamentos de inoculação foi calculada em relação à produção de MSPA das plantas do tratamento com N mineral por meio da expressão,  $ER = (\text{MSPA}_{\text{tratamento}}) * 100 / (\text{MSPA}_{\text{tratamento com N}})$ .

O teor de nitrogênio total foi calculado pelo método semi-microkjedahl, de acordo com Sarruge & Haag (1979), determinando-se a porcentagem de N na

matéria seca da parte aérea. O nitrogênio acumulado na parte aérea foi calculado multiplicando-se o peso da matéria seca da parte aérea pelo teor de N.

Nas plantas inoculadas que ao final do experimento apresentaram formação de nódulos, foi confirmada a capacidade nodulífera do isolado que foi inoculado, caso contrário o isolado foi definido como não nodulífero em feijão caupi.

Os resultados do experimento foram submetidos à análise de variância, empregando-se o programa de análise estatística Sisvar, versão 4.6 (Ferreira, 2004). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os valores das variáveis NN e MSN foram previamente transformados pela fórmula  $(X+0,5)^{0,5}$ .

### **3.4 Capacidade solubilizadora de fosfatos de cálcio, de alumínio e de ferro em meio de cultura sólido e líquido**

Foi conduzido um experimento para verificar a capacidade dos isolados de solubilizar fontes inorgânicas insolúveis de fosfatos como  $\text{CaHPO}_4$  (P-Ca),  $\text{AlH}_6\text{O}_{12}\text{P}_3$  (P-Al) e  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (P-Fe), tanto em meio de cultura sólido quanto em meio líquido. A capacidade solubilizadora de todos os 78 isolados obtidos, das três estirpes recomendadas para o caupi (UFLA 03-84, INPA 0311B e BR3267) e um controle positivo para solubilização (estirpe LMG1222, *Burkholderia cepacia*, Gram-negativa, encontrada no solo, em plantas e principalmente em seres humanos, fornecida pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade de Ghent - Bélgica) foram avaliadas em meio glicose-extrato de levedura (GES-modificado) (glicose 10 g L<sup>-1</sup>; extrato de solo 100 mL L<sup>-1</sup>;  $\text{MgSO}_4$  (10%) 2 mL L<sup>-1</sup>;  $\text{CaCl}_2$  (1%) 2 mL L<sup>-1</sup>; NaCl 1 mL L<sup>-1</sup>; solução de micronutriente 2 ml ( $\text{Ca}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,2 g;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,235 g;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,28 g;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,008 g;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,024 g; dissolvida em 200 mL de água destilada); Fe-EDTA (1,64%) 4 mL L<sup>-1</sup>;  $\text{KNO}_3$  0,1 g L<sup>-1</sup>; meio GES) (Sylvester-

Bradley et al., 1982) modificado, com 0,3% de extrato de levedura (meio GEL) (Silva-Filho, 1998) e agar 15 g L<sup>-1</sup> quando meio sólido.

Para avaliação da capacidade solubilizadora em meio sólido e líquido foi realizado um pré-teste para obter a melhor densidade ótica (DO) de inoculação dos isolados. Após determinada esta DO (0,5), os isolados foram crescidos em meio 79 líquido sem corante e utilizando-se de um espectrofotômetro no comprimento de onda 540 nm fizeram as leituras ao longo do tempo até atingirem a DO desejada. Posteriormente, aplicamos 20 µL para formação da colônia em placas com meio sólido (GES) e 1 mL em frascos de erlenmeyer (250 mL) com 50 mL de meio líquido, ambos suplementados com o fosfato de alumínio (AlH<sub>6</sub>O<sub>12</sub>P<sub>3</sub>, p.a.), fosfato de ferro (fosfato férrico granulado, p.a., Merk, FePO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O), que foi moído e passado em peneira com malha de 0,062 mm, e fosfato de cálcio (CaHPO<sub>4</sub>), os quais foram acrescentados ao meio GES sólido na proporção de 0,89 mg L<sup>-1</sup> P e no meio GES líquido na proporção de 0,1 g L<sup>-1</sup> de P. O fosfato de cálcio foi obtido pela adição de 1 mL de uma solução de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 5% e 1 mL de uma solução de CaCl<sub>2</sub> a 10% por 10 mL de meio (autoclavados separadamente) para a produção do fosfato inorgânico insolúvel, CaHPO<sub>4</sub> (Sylvester-Bradley et al., 1982). Para o meio contendo P-Al, ajustou-se o pH para 4,5, enquanto nos meios contendo P-Ca e P-Fe o pH foi ajustado em 7,0.

O delineamento utilizado para avaliação em meio sólido foi inteiramente casualizado, com 82 tratamentos e três repetições, (3 colônias por placa). Para avaliação da ausência de contaminação mantiveram-se placas de Petri com meio contendo os três fosfatos não inoculados. As placas foram incubadas a 28 °C por 15 dias e as avaliações feitas no 15º dia (área translúcida em torno da colônia) por meio da medição do diâmetro do halo de solubilização, utilizando-se um paquímetro digital, resultando em uma medição por isolado. A partir dessas medidas, foram obtidos os Índices de Solubilização (IS) = Ø halo (mm) / Ø

Colônia (mm) (Berraquero et al., 1976) (Figura 2). Com base nos índices de solubilização, os isolados foram classificados como de baixa (IS até 2), média (IS de 3 a 4) e alta (IS > 4) capacidade de solubilização.

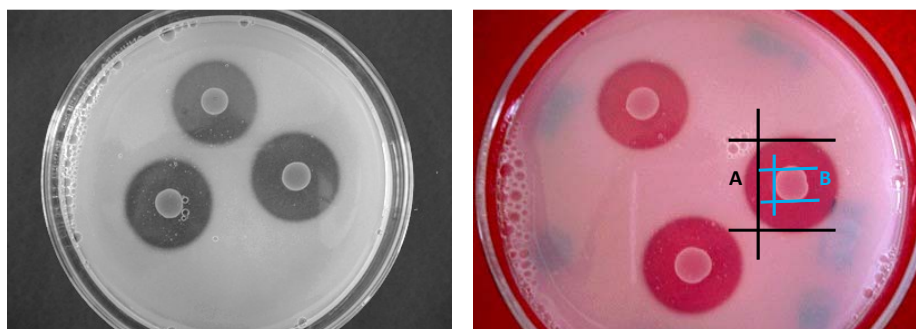


FIGURA 2 Halo de solubilização de  $\text{CaHPO}_4$  em meio GES.  $\text{IS} = \text{A (mm)} / \text{B (mm)}$ .

No meio líquido o delineamento foi inteiramente casualizado, com 82 tratamentos mais um controle e três repetições, sendo que o controle foi o meio de cultura mais a dose de fosfato na ausência dos isolados. Estes frascos foram incubados a 28 °C, sob agitação de 150 rpm por cinco dias. No final deste período, procedeu-se a centrifugação (13.500 rpm por 5 min), determinação do pH e quantificação dos teores de P solúvel no sobrenadante pelo método fosfomolibídico (Embrapa, 1997). A capacidade solubilizadora de cada isolado foi determinada, pela diferença entre a quantidade de P-solúvel no seu meio e o teor deste elemento no tratamento controle.


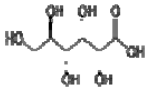
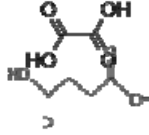

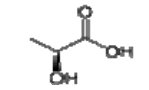
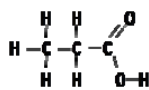
### 3.5 Identificação e quantificação de ácidos orgânicos

Nesta avaliação foram testados os isolados: P31, que se destacou na solubilização de P-Ca; P22 e P29, que se destacaram na solubilização de P-Al; e P28 e P39 que se destacaram na solubilização de P-Fe. Também foi avaliado um controle sem inoculação para cada fonte de fosfato. O delineamento estatístico

foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6 x 3 (5 isolados mais um controle e 3 fontes de fósforo), com 2 repetições.

O procedimento para cultivo dos isolados e obtenção das amostras foi o mesmo descrito no item 3.4 para solubilização em meio líquido, havendo apenas uma modificação no meio de cultura GES, o qual não recebeu em sua composição extrato de solo. Para a identificação e quantificação de ácidos orgânicos, empregou-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Agilent HP Série 1100). Após obtenção das amostras, estas foram filtradas em membrana celulósica com 0,45 µm de diâmetro do poro, para injeção em coluna cromatográfica modelo Supelcogel C-610H 9µm, 30 cm x 7,8 mm. Como padrões analíticos foram utilizados ácidos orgânicos pró-analise Merck®. A fase móvel utilizada foi H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a 0,1% (pH 1,81) com fluxo de 0,5 mL min<sup>-1</sup> e injeção de 100 µL por amostra. O tempo de aquisição dos cromatogramas foi de 30 minutos, com intervalo de 30 minutos entre as corridas. A detecção foi por UV a 210 nm, utilizando-se um detector de arranjo de diodos (DAD). As moléculas identificadas e os tempos de retenção típicos encontrados para os ácidos foram os seguintes: cítrico (12,71 min), glucônico (13,18 min), láctico (18,20), oxálico (10,30 min), propiônico (25,10 min) e succínico (18,21 min). A quantificação dos ácidos foi feita através das curvas de calibração construídas com os padrões analíticos. Na Tabela 3 encontram-se algumas características químicas dos ácidos orgânicos estudados.

TABELA 3 Características químicas dos ácidos orgânicos estudados (Moss et al., 1994).

Nome comum	Nome Iupac	Fórmula Química	Fórmula Estrutural	PM <sup>(1)</sup>	pKs <sup>(2)</sup>
Ácido cítrico	Ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> .H <sub>2</sub> O		210,14	1º) 3,15 2º) 4,77 3º) 6,40
Ácido glucônico	Ácido (2R,3S,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahidroxihexanóico	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>		178,14	1º) 3,86
Ácido oxálico	Ácido etanodióico	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O		126,07	1º) 1,23 2º) 4,19
Ácido succínico	Ácido butanodióico	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>		118,09	1º) 4,16 2º) 5,61
Ácido láctico	Ácido 2-hidroxiopropanóico	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>		90,08	1º) 3,85
Ácido propiônico	Ácido propanóico	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>		74,07	1º) 4,87

<sup>(1)</sup>Peso molecular (g mol<sup>-1</sup>). <sup>(2)</sup>pH onde 50% do ácido está dissociado.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Isolamento, caracterização cultural, autenticação e eficiência simbiótica dos isolados de BFNNC

Foram obtidos 78 isolados, sendo 37 do solo de Lavras e 41 do solo de Patos de Minas (Tabela 4).

TABELA 4 Número de isolados que nodularam o feijão caupi no teste de autenticação.

Solo	Nº Total Isol. <sup>(1)</sup>	Nº Isol Nod <sup>(2)</sup>	% Nodulação
Lavras	37	22	59,46
Patos de Minas	41	14	34,15
Total	78	36	46,15

<sup>(1)</sup> Número total de isolados, <sup>(2)</sup> Número de isolados que nodularam.

As características culturais das espécies bacterianas pertencentes à família Rhizobiaceae, genericamente identificadas como rizóbio, fornecem informações importantes para sua identificação e agrupamento.

O dendograma formado pelo agrupamento dos isolados do solo de Lavras com estas características é apresentado na figura 3. Podem-se distinguir dois grandes grupos a 29% de similaridade. No grupo IL estão 22 isolados. Destes, 11 não nodularam e 11 nodularam. Este grupo se subdivide em dois outros grupos a aproximadamente 35% de similaridade, aqui denominados IL-1 e IL-2. A maioria dos isolados agruparam-se no grupo IL-1, sendo que 4 isolados não nodularam e 10 isolados nodularam. Já no grupo IL-2 apenas 1 isolado nodulou, enquanto 7 não nodularam. Semelhantemente ao que ocorre no grupo IL, o grupo IIL também se divide em dois outros grupos a



aproximadamente 35% de similaridade, aqui denominados IIL-1 e IIL-2, onde apenas 3 isolados se encontram no grupo IIL-1 e o restante se encontra no grupo

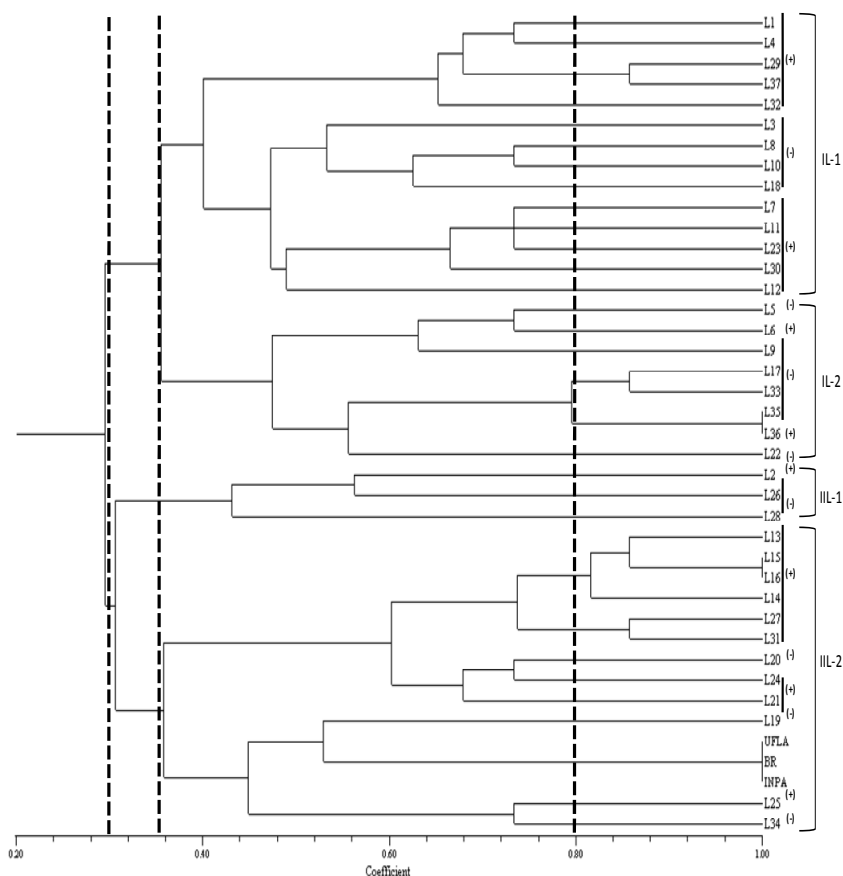


FIGURA 3 Dendrograma de similaridade, construído de acordo com as características culturais dos isolados de bactérias nodulíferas ou não em feijão caupi capturadas do solo de Lavras - MG. (+) nodulou, (-) não nodulou.

IIL-2, os quais se agrupam com as estirpes referências de *Bradyrhizobium* sp., sendo que 2 não nodularam e 10 nodularam.

O dendrograma formado pelo agrupamento dos isolados do solo de Patos de Minas é apresentado na figura 4. Podem-se distinguir dois grandes grupos a

aproximadamente 27% de similaridade. No grupo IP estão 37 dos 41 isolados, dos quais 25 não nodularam e apenas 12 nodularam, sendo que nenhuma das

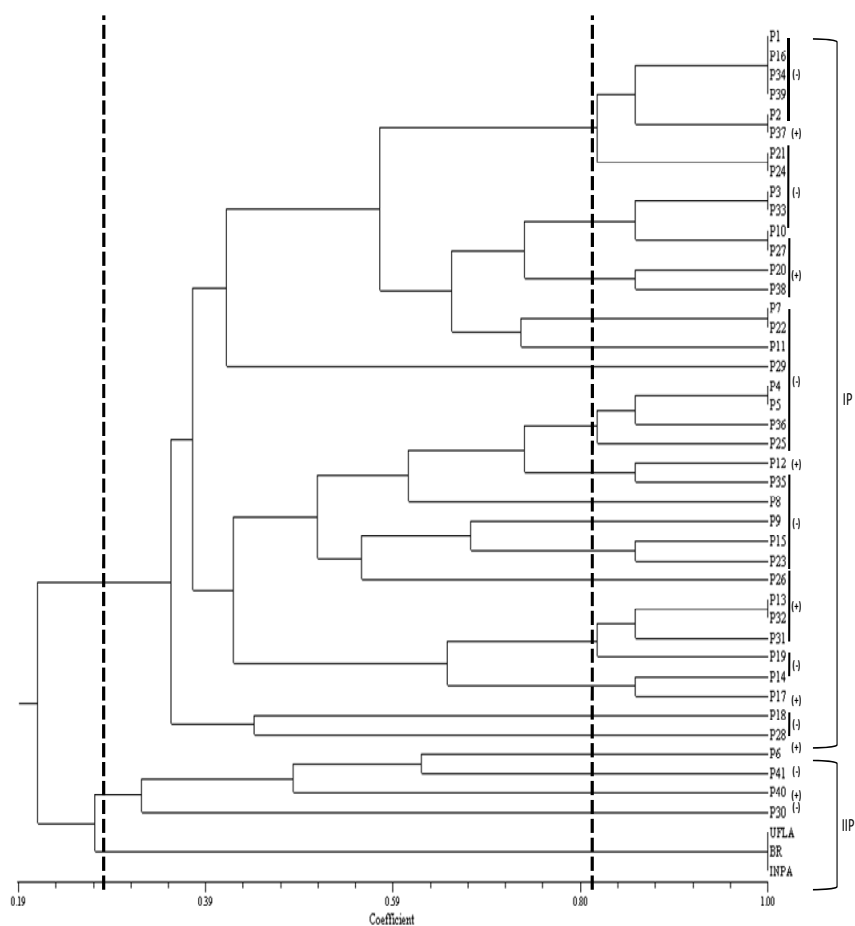


FIGURA 4 Dendrograma de similaridade, construído de acordo com as características culturais dos isolados de bactérias nodulíferas ou não em feijão caupi capturadas do solo de Patos de Minas - MG. (+) nodulou, (-) não nodulou.

estirpes referências se encontra neste grupo. Os isolados do grupo IIP agrupam-se com as estirpes referências de *Bradyrhizobium* sp, neste grupo estão apenas 4 isolados, sendo que 2 não nodularam e 2 nodularam. Os isolados P6 e P40,

apesar de alcalinizarem o meio de cultura, apresentam crescimento rápido, enquanto os isolados L14, P10, P20 e P31 acidificam o meio e também são de crescimento rápido, o que os distingue do comportamento apresentado pelos isolados de bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, atualmente representado pelas estirpes INPA 03-11B, BR3267 e UFLA 03-84.

É interessante notar também que em um maior nível de discriminação, a 80% de similaridade, formam-se 31 grupos entre os isolados do solo de Lavras e 21 grupos entre os isolados do solo de Patos de Minas, evidenciando assim, uma maior diversidade entre os isolados do solo de Lavras. Junto a esta grande diversidade, cerca de 96% dos isolados obtidos dos dois locais de coleta apresentaram crescimento rápido em meio de cultura e 85% acidificaram o meio, dados semelhantes aos encontrados por Pereira (2000) e Chagas-Júnior (2007) com solo de áreas de floresta amazônica. Estes resultados confirmam a baixa especificidade do feijão caupi e concordam com aqueles encontrados por Pereira (2000), Lima et al. (2005), Melloni et al. (2006) e Soares et al. (2006), avaliando a diversidade fenotípica de rizóbios em diversos ecossistemas, utilizando o feijão caupi como planta isca. Isto confirma que a simbiose das estirpes capazes de nodular feijão caupi não se restringe ao gênero *Bradyrhizobium*.

Observa-se também que com o uso destas características, à medida que aumentamos a percentagem de similaridade há tendência em ocorrer distinção entre os isolados que não nodularam e nodularam em feijão caupi. Isto pode ser confirmado principalmente pela quase totalidade dos isolados do sub-grupo IIL-2, onde se encontram as estirpes referência, formarem nódulos e também por haver distinção entre os sub-grupos IL-1 e IL-2, os quais tendem a ser compostos por isolados que nodularam e não nodularam, respectivamente, comportamento este semelhante aos observados para os isolados do solo de Patos de Minas. Segundo Chagas-Júnior (2007), apesar da quantidade de informações genotípicas disponíveis aos pesquisadores nos dias atuais, a

correlação destes com as características culturais é uma das condições para a descrição de novos gêneros e espécies bacterianas, evidenciando assim, a importância destas características no agrupamento de microrganismos para as mais diversas funções.

No experimento em vaso de Leonard, para autenticação dos isolados por meio da inoculação no hospedeiro original e avaliação da eficiência simbiótica, verificou-se que 22 isolados capturados do solo de Lavras nodularam, enquanto para os isolados capturados no solo de Patos de Minas apenas 14 nodularam, totalizando 36 isolados que nodularam o feijão caupi, representando 46% de nodulação do total de isolados capturados (Tabela 4). Considerando que os isolados foram obtidos de nódulos da mesma planta hospedeira (feijão caupi), esperava-se uma elevada taxa de nodulação no ensaio de autenticação. Entretanto, conforme salientado por Li et al. (2008), o nódulo pode apresentar microrganismos endofíticos e estes podem ter sido isolados. Além disso, não podemos descartar a possibilidade de ter ocorrido contaminações, por microrganismos oportunistas, no processo de isolamento.

Para o número de nódulos (NN) e matéria seca de nódulos (MSN) os isolados L14 e P6 foram superiores aos demais tratamentos, inclusive às estirpes aprovadas pelo MAPA. Além disso, os controles sem nitrogênio e nitrogenado não apresentaram nódulos, indicando, portanto, que não houve contaminação do experimento (Figuras 5 e 6).

A planta inoculada com o isolado P6 apresentou maior produção de matéria seca de parte aérea (MSPA) que o controle nitrogenado e as estirpes INPA 03-11B, BR3267 e UFLA 03-84, e conseqüentemente, maior eficiência relativa (ER%). O isolado P6 apresentou MSPA 22% superior ao controle nitrogenado e em média 9% em relação às estirpes recomendadas. As plantas inoculadas com os isolados L14 e P10 promoveram produção de MSPA superior ao controle nitrogenado e equivalente à estirpe UFLA 03-84, sendo inferior às

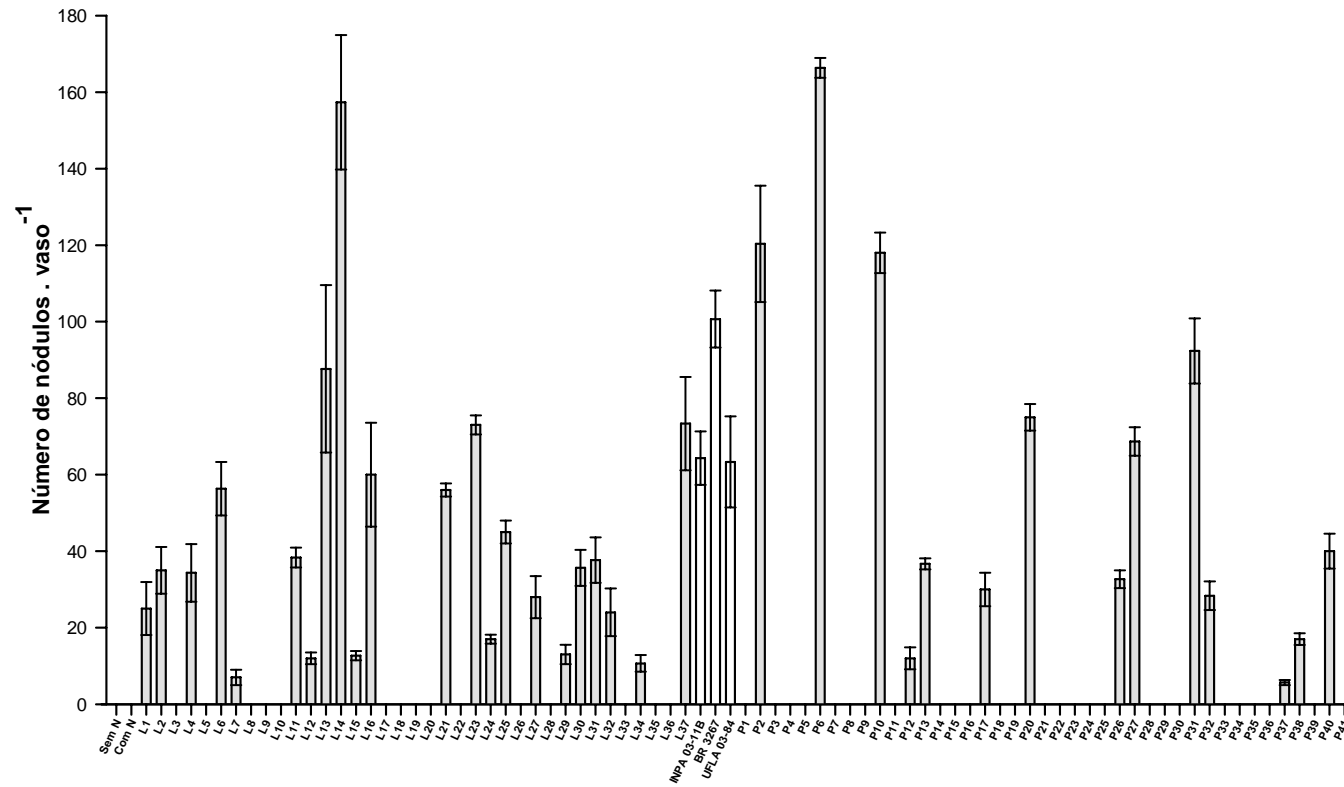


FIGURA 5 Número de nódulos em feijão caupi cv. BR 17 - Gurguéia inoculado com diferentes isolados de bactéria.

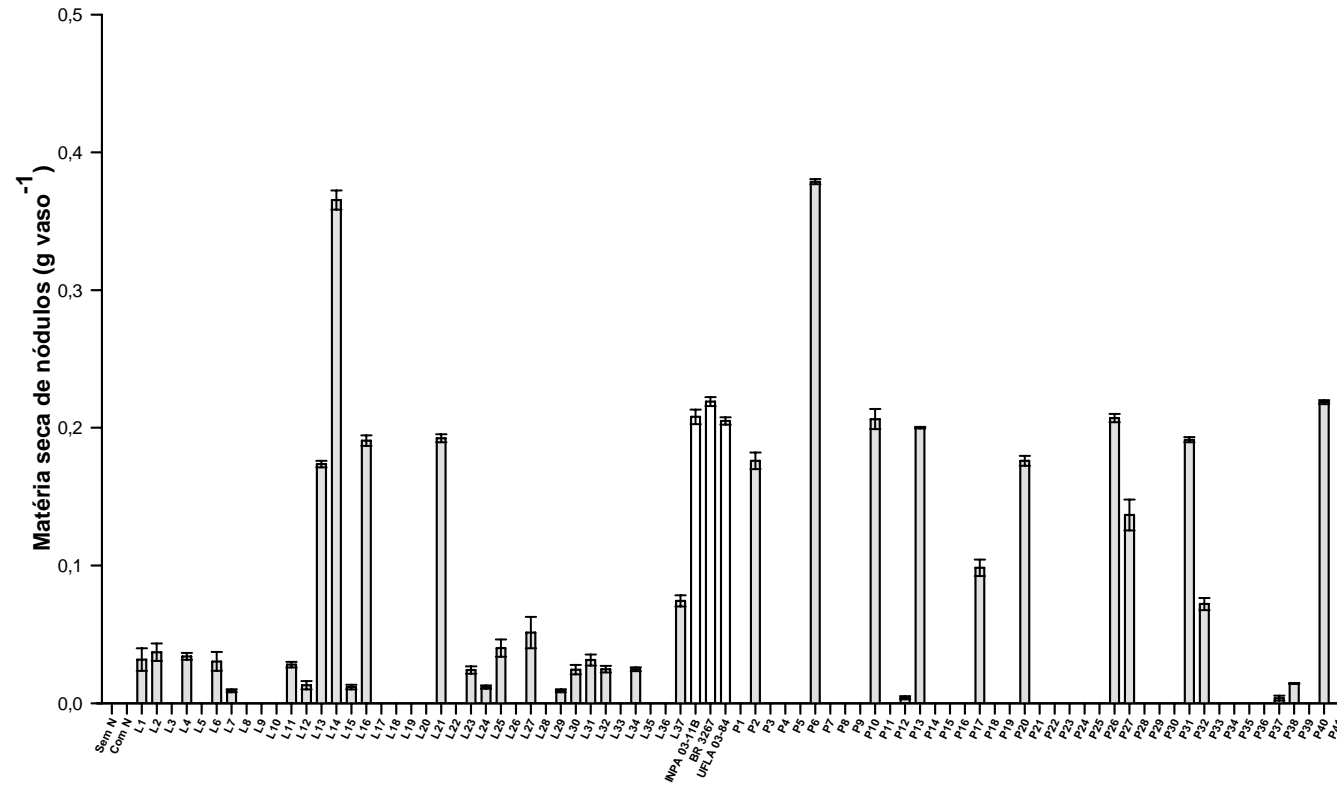


FIGURA 6 Matéria seca de nódulos em feijão caupi cv. BR 17 - Gurguéia inoculado com diferentes isolados de bactéria.

estirpes INPA 03-11B e BR3267, enquanto os isolados P20 e P31 apresentaram MSPA equivalente ao controle nitrogenado. Já o isolado P40 apesar de apresentar uma MSPA inferior ao controle nitrogenado, esta foi superior aos demais tratamentos (Figura 7).

Assim como observado para produção de matéria seca, verificou-se que o maior valor de área foliar (AF) foi obtido no tratamento P6, seguido dos tratamentos INPA 03-11B, BR3267, L14, P40, P31, controle nitrogenado, UFLA 03-84, P20 e P10, que foram superiores aos demais (Figura 8).

Quanto à produção de matéria seca de raiz (MSR), o isolado P6, juntamente com a estirpe BR3267, foram superiores aos demais tratamentos. O isolado L14 apresentou MSR igual ao controle nitrogenado e as estirpes INPA 03-11B e UFLA 03-84 (Figura 9).

Lima et al. (2005) também encontram estirpes capazes de promover a produção de MSPA equivalentes ao controle nitrogenado ( $210 \text{ mg vaso}^{-1}$ ), estirpes estas que foram recomendadas para teste de eficiência agrônômica. Desta forma, o bom desempenho apresentado pelo isolado P6, seguido de L14, P10, P20, P31 e P40 os tornam promissores para futuros testes de eficiência agrônômica em feijão caupi.

Com relação ao teor de nitrogênio (TN) na parte aérea do feijão caupi, as estirpes UFLA 03-84, BR3267, assim como os isolados P6, P13, P17, P26, P27, P31 e P40 superaram o controle nitrogenado, com concentrações variando de  $37,7$  a  $56,5 \text{ g kg}^{-1}$  (Figura 10). Soares et al. (2006) e Lacerda et al. (2004), conduzindo experimentos em campo, demonstraram que para produzir  $1 \text{ kg}$  de MSPA, utilizando as estirpes INPA 03-11B e UFLA 03-84 como fonte de N, gastaram-se em média  $39,09$  e  $27,35 \text{ g}$  de N, respectivamente. Lima et al. (2005), trabalhando com estas duas estirpes em casa de vegetação, obtiveram em média a concentração de nitrogênio em torno de  $29,08 \text{ g kg}^{-1}$ . Portanto, os

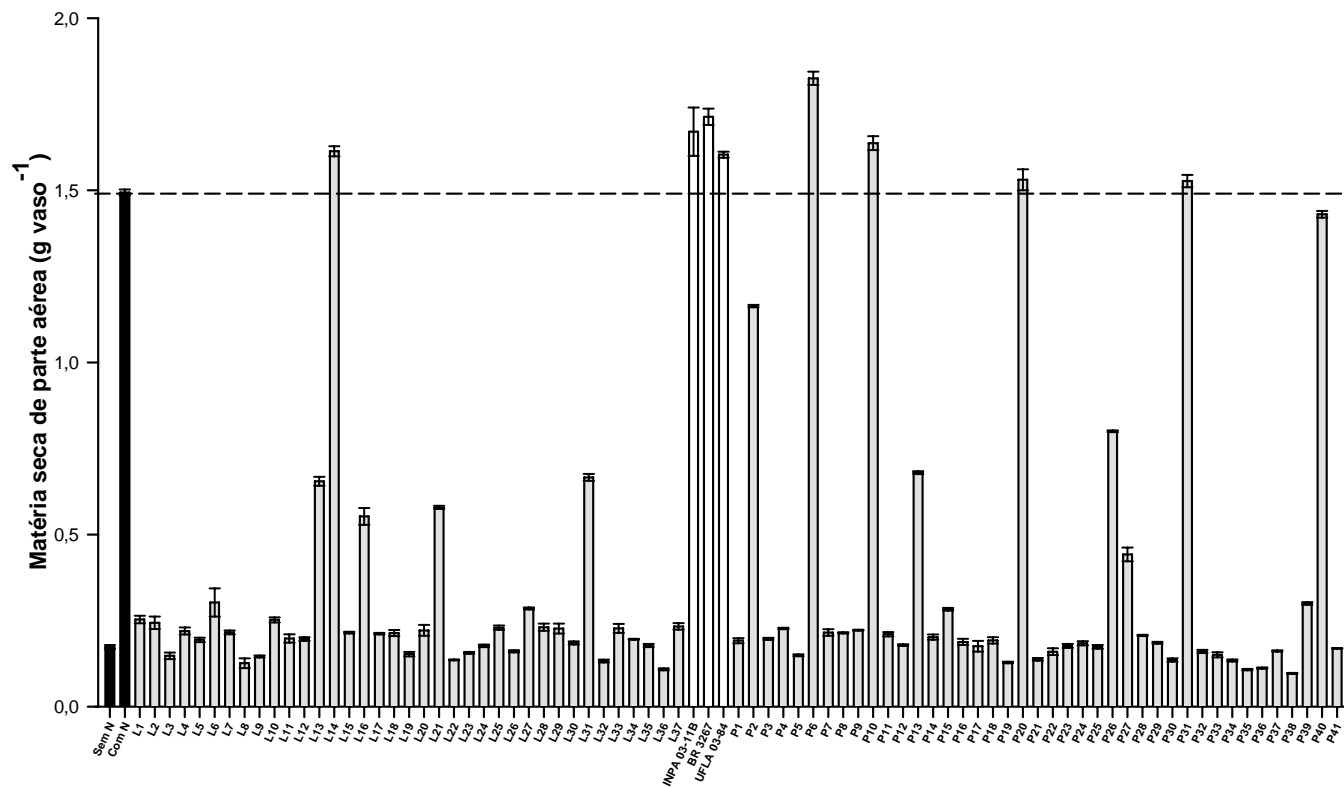


FIGURA 7 Matéria seca da parte aérea do feijão caupi cv. BR 17 - Gurguéia, inoculado com diferentes isolados de bactéria. Linha tracejada representa a média encontrada no controle nitrogenado.



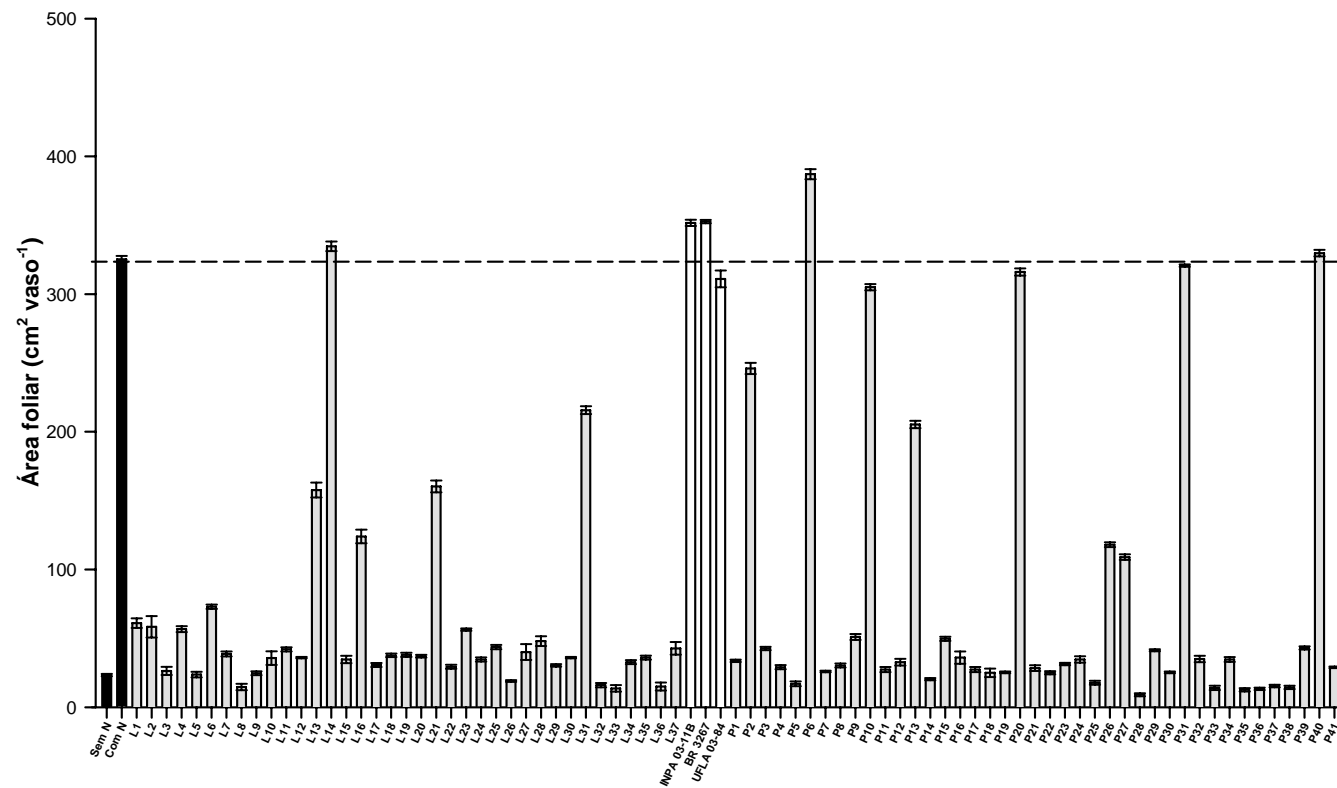


FIGURA 8 Área foliar do feijão caupi cv. BR 17 - Gurguéia inoculado com diferentes isolados de bactéria. Linha tracejada representa a média encontrada no controle nitrogenado.

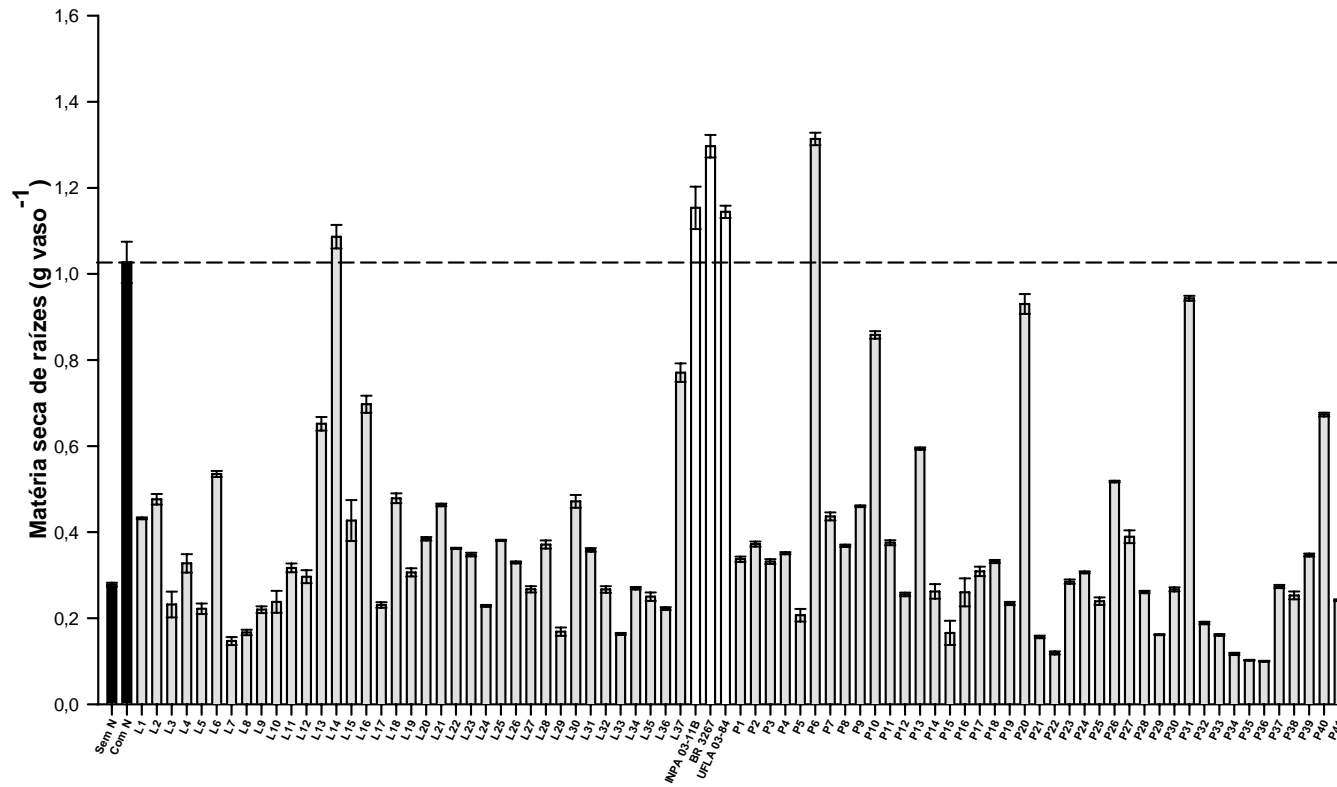


FIGURA 9 Matéria seca de raízes do feijão caupi cv. BR 17 - Gurguéia inoculado com diferentes isolados de bactéria. Linha tracejada representa a média encontrada no controle nitrogenado.

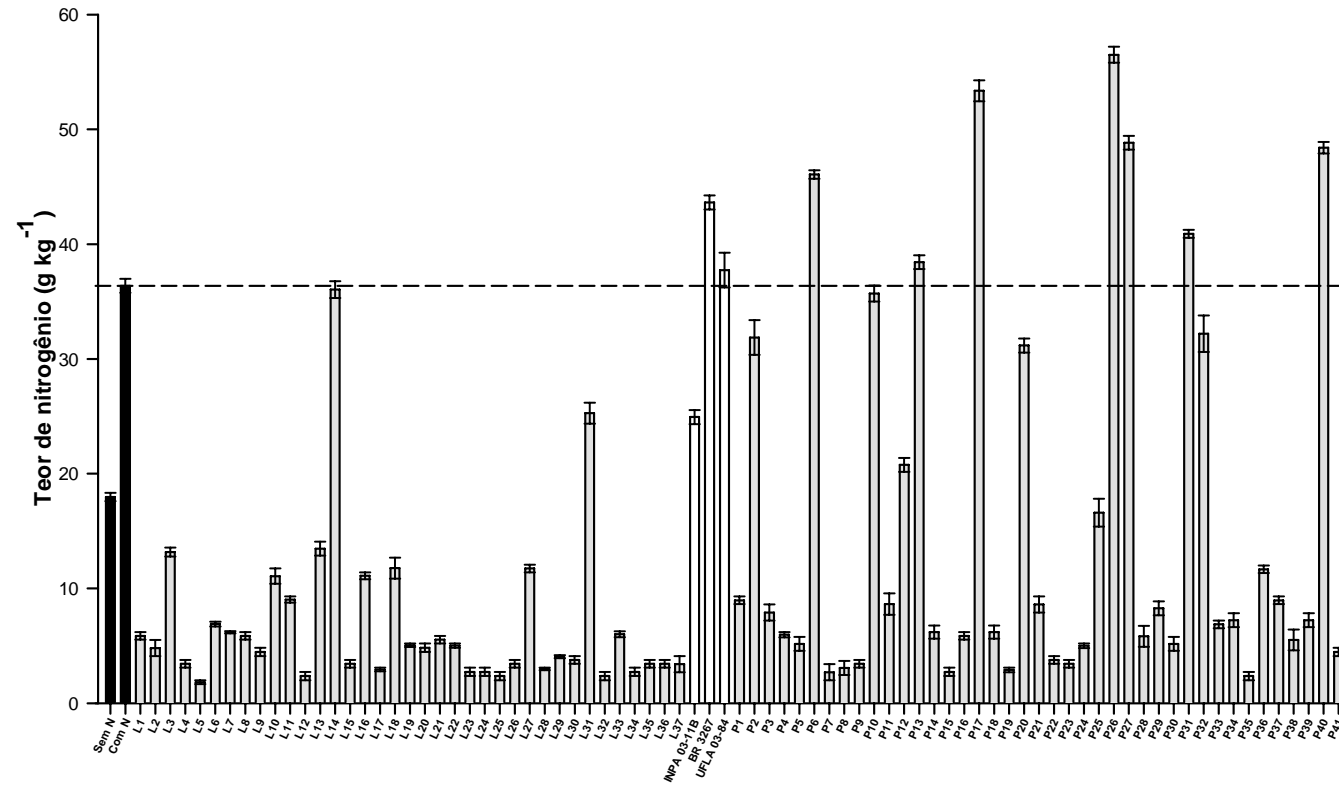


FIGURA 10 Teor de nitrogênio na matéria seca da parte aérea do feijão caupi cv. BR 17 - Gurguéia inoculado com diferentes isolados de bactérias. Linha tracejada representa a média encontrada no controle nitrogenado.

valores encontrados para estes isolados e para as estirpes, neste trabalho, são suficientes para garantir uma boa adubação nitrogenada no cultivo do feijão caupi. Já para o acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA), os isolados L14, P6, P10, P31 e P40, assim como as estirpes UFLA 03-84 e BR3267 apresentaram valores superiores aos demais tratamentos, inclusive quando comparados ao controle nitrogenado. Destaque, novamente, deve ser dado ao isolado P6, que apresentou valores superiores a todos os tratamentos (Figura 11).

Entre todas as variáveis analisadas neste experimento há que se destacar que a MSN e NN correlacionaram-se positivamente com MSPA ( $r:0,85$ ;  $p<0,01$ ) e ( $r:0,70$ ;  $p<0,01$ ), respectivamente (Tabela 5). Correlações positivas e significativas entre MSPA e MSN também foram relatadas por Fernandes et al. (2003), Lima et al. (2005) e Melloni et al. (2006). Outra correlação importante é entre a MSN e o teor de nitrogênio fixado biologicamente ( $r:0,75$ ;  $p<0,01$ ), o qual também foi encontrado por Fernandes et al. (2003). Verificaram-se também correlações entre as variáveis respostas (MSPA, MSR, AF, NN, MSN, TN e ANPA) com a leitura SPAD feita aos 60 DAE. Tal comportamento pode ser explicado em função de os máximos teores de clorofila em folha serem atingidos pela cultura no estágio de florescimento, aproximadamente 60 DAE (Silva et al., 2008).

Nota-se que de acordo com os parâmetros de crescimento e nutrição mineral de N pelo feijão caupi, o desempenho do isolado P6, na simbiose, foi superior ao controle nitrogenado e às estirpes já recomendadas como inoculantes. Além disso, os isolados L14, P10, P20, P31 e P40 obtiveram desempenho semelhante ao das estirpes aprovadas pelo MAPA e ao controle nitrogenado.

Contudo, existe a necessidade da avaliação da contribuição desses isolados para a fixação do  $N_2$  e para a produtividade de caupi por meio de testes agrônômicos em condições de campo, uma vez que as condições testadas no

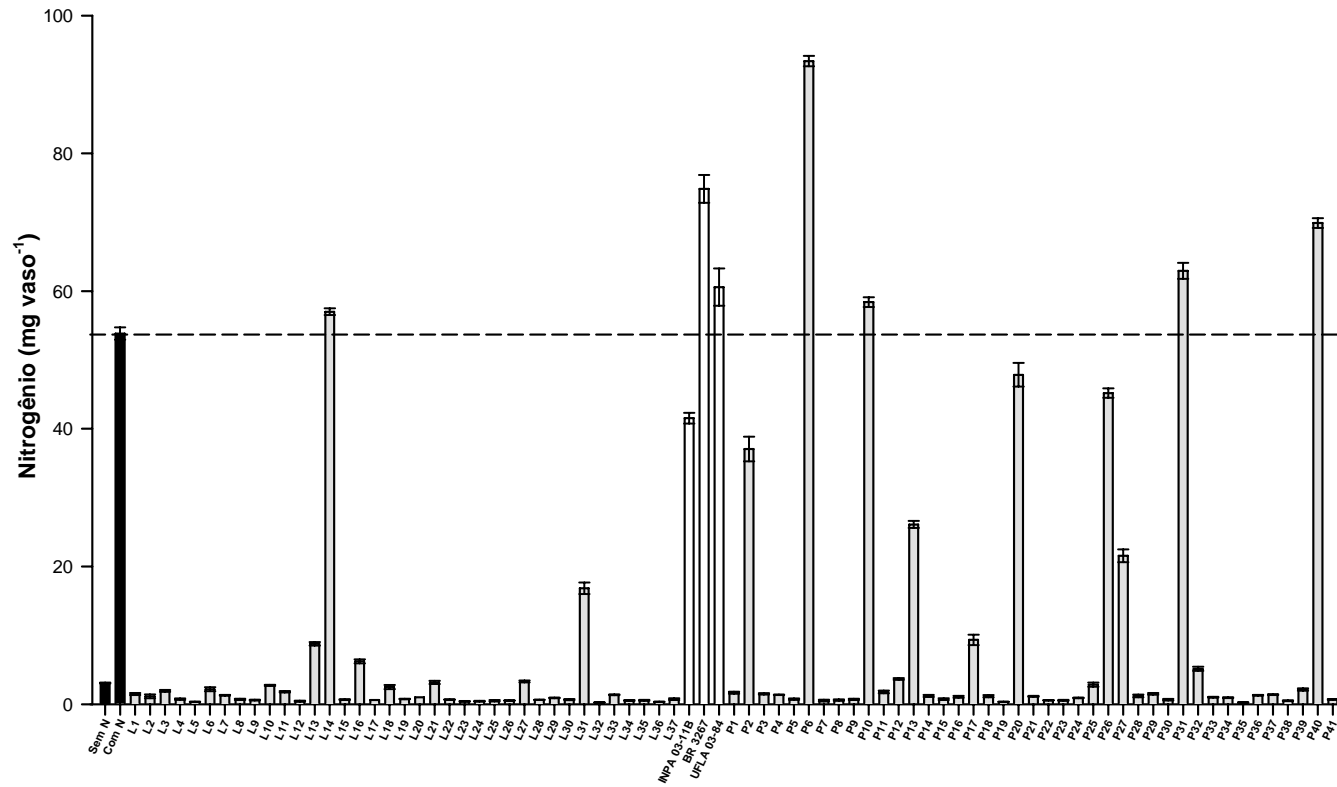


FIGURA 11 Acúmulo de nitrogênio na MSPA do feijão caupi cv. BR 17 - Gurguéia inoculado com diferentes isolados de bactérias. Linha tracejada representa a média encontrada no controle nitrogenado.

presente trabalho são ótimas e não refletem as condições adversas de campo, tanto do ponto de vista biológico (relações antagonistas), como físico e químico.

TABELA 5 Coeficientes de correlação de Person entre a matéria seca de parte aérea (MSPA), matéria seca de raiz (MSR), área foliar (AF), número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), teor de nitrogênio (TN), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) e leitura SPAD aos 60 DAE, obtidos na inoculação do feijão caupi com isolados de bactérias. n = 249

	MSPA	MSR	AF	NN <sup>(1)</sup>	MSN <sup>(1)</sup>	TN	ANPA	Spad 60
MSPA	-	0,86**	0,96**	0,70**	0,85**	0,74**	0,96**	0,90**
MSR		-	0,80**	0,71**	0,80**	0,58**	0,80**	0,80**
AF			-	0,72**	0,83**	0,73**	0,91**	0,89**
NN				-	0,85**	0,59**	0,66**	0,74**
MSN					-	0,75**	0,83**	0,87**
TN						-	0,83**	0,72**
ANPA							-	0,86**
Spad 60								-

\*\*Significativo ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste t. <sup>(1)</sup>Análise de correlação realizada com os dados transformados para  $(x + 0,5)^{0,5}$ .

## 4.2 Capacidade solubilizadora em meio de cultura sólido e líquido

### 4.2.1 Solubilização em meio sólido

A capacidade solubilizadora de fosfatos inorgânicos insolúveis em meio de cultura sólido e líquido foi testada para todos os isolados obtidos, tanto nodulífero como não nodulífero. Verificou-se, em meio sólido, um número maior de isolados capazes de solubilizar P-Ca, seguidos de P-Al, evidenciado pelo halo transparente ao redor das suas colônias, enquanto que nenhum isolado apresentou halo de solubilização em meio com P-Fe (Tabela 5). Resultados estes semelhantes aos observados por muitos autores (Silva-Filho & Vidor, 2000, 2001; Souchie et al., 2005a). As estirpes UFLA 03-84 e LMG1222 apesar de

solubilizarem apenas P-Ca apresentaram um dos melhores índices de solubilização neste meio, já as estirpes BR3267 e INPA 03-11B não solubilizaram nenhuma fonte de fosfato inorgânico insolúvel (Tabela 5). Apenas 7 isolados que solubilizaram P-Ca também foram capazes de solubilizar P-Al. Estes resultados divergem dos encontrados por Hara & Oliveira (2004, 2005), que identificaram uma alta ocorrência de isolados que solubilizaram P-Ca e P-Al. Entretanto, Silva-Filho & Vidor (2000) e Souchie et al. (2005a) também detectaram uma baixa incidência de solubilizadores de P-Al, entre solubilizadores de P-Ca. Esses autores sugerem que tal fato pode ser atribuído a seleção dos isolados durante o isolamento, além das características intrínsecas de solubilidade dos fosfatos tais como a constante de solubilidade.

Entre os isolados que se destacaram no experimento de eficiência simbiótica em casa de vegetação, um destaque deve ser dado ao isolado P6 e P31 que também conseguiram solubilizar P-Ca em meio sólido, obtendo o isolado P6 um dos maiores índices de solubilização.

Quanto ao índice de solubilização, independente do meio, nenhum dos isolados apresentaram índice alto, e a maioria apresentou índice baixo (Figura 12), já os isolados L24, L33, L35, P4, P6 e P8 e as estirpes UFLA 03-84 e LMG1222 obtiveram índices médios na solubilização de P-Ca e apenas o isolado L36 obteve índice médio na solubilização de P-Al (Tabela 5). Piex et al. (2001) encontraram isolados da família Rhizobiaceae efetivos na solubilização de P-Ca em laboratório, mas a eficiência de solubilização variou entre eles. Hara & Oliveira (2004, 2005), trabalhando com vários isolados de rizóbio da região amazônica na solubilização de P-Ca e P-Al observaram baixos índices de solubilização entre eles, indicando, portanto, que estes isolados que obtiveram índice médio podem ser potenciais inoculantes em testes de campo.

Apesar de muitos isolados não apresentarem halo de solubilização nos meios sólidos contendo P-Ca, P-Al e P-Fe, alguns foram capazes de crescer e se

desenvolver nestes meios, principalmente no meio com P-Fe (Tabela 6). Silva-Filho (1998) também encontrou resultados semelhantes e explica que isto é possível em P-Ca e P-Fe, pois o cálcio e o ferro têm efeito nutritivo, enquanto o

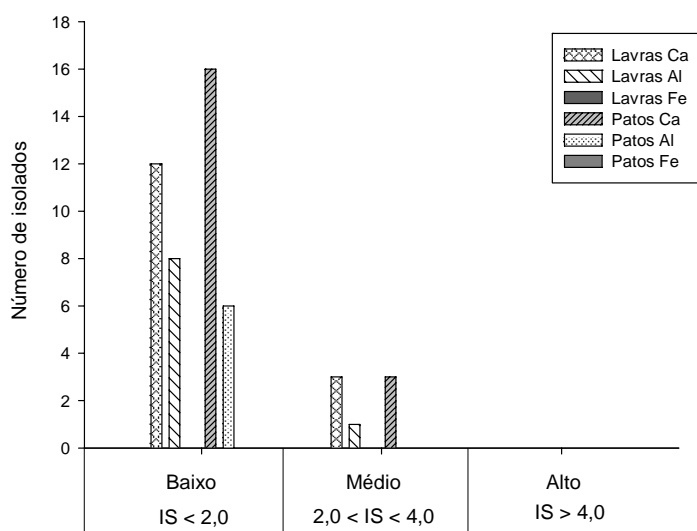


FIGURA 12 Histograma do número de isolados por classe de índice de solubilização.



TABELA 6 Índice de solubilização de P-Ca, P-Al e P-Fe em meio sólido por isolados obtidos de solos sob floresta em Lavras - MG e Patos de Minas – MG, incubados durante 15 dias.

Isolado <sup>(1)</sup>	P-Ca	P-Al	P-Fe	Isolado <sup>(2)</sup>	P-Ca	P-Al	P-Fe
L1	1,26 <sup>(3)</sup>	NC	NC	P1	1,63	NC	CNS
L2	NC <sup>(4)</sup>	1,69	NC	P2	1,60	NC	CNS
L3	CNS <sup>(5)</sup>	NC	CNS	P3	CNS	CNS	CNS
L4	CNS	NC	CNS	P4	2,34	1,07	CNS
L5	1,04	1,36	CNS	P5	1,85	NC	NC
L6	NC	NC	CNS	P6	3,55	NC	CNS
L7	CNS	NC	CNS	P7	1,11	1,03	CNS
L8	1,65	CNS	CNS	P8	2,89	NC	CNS
L9	1,61	1,16	CNS	P9	CNS	NC	CNS
L10	1,57	NC	CNS	P10	CNS	NC	CNS
L11	1,07	NC	CNS	P11	CNS	NC	CNS
L12	1,96	1,16	CNS	P12	CNS	NC	CNS
L13	1,18	1,28	CNS	P13	1,10	NC	CNS
L14	CNS	NC	CNS	P14	CNS	NC	CNS
L15	CNS	CNS	CNS	P15	CNS	NC	CNS
L16	CNS	CNS	CNS	P16	1,94	NC	CNS
L17	CNS	CNS	CNS	P17	1,26	NC	CNS
L18	NC	NC	CNS	P18	1,06	1,21	NC
L19	NC	NC	CNS	P19	1,09	NC	NC
L20	CNS	NC	CNS	P20	CNS	NC	CNS
L21	CNS	1,29	CNS	P21	1,05	NC	NC
L22	1,15	NC	CNS	P22	1,14	1,09	NC
L23	CNS	NC	CNS	P23	CNS	CNS	CNS
L24	2,48	NC	CNS	P24	1,13	NC	CNS
L25	CNS	NC	CNS	P25	CNS	NC	CNS
L26	NC	NC	CNS	P26	CNS	CNS	CNS
L27	NC	NC	CNS	P27	CNS	CNS	CNS
L28	NC	1,45	CNS	P28	CNS	1,10	CNS
L29	1,15	NC	CNS	P29	CNS	1,2	CNS
L30	1,21	NC	CNS	P30	NC	NC	NC

...continua...

TABELA 6, Cont.

L31	1,05	NC	CNS	P31	1,27	NC	CNS
L32	NC	NC	NC	P32	CNS	CNS	CNS
L33	2,66	NC	CNS	P33	CNS	NC	CNS
L34	NC	1,08	CNS	P34	CNS	NC	CNS
L35	2,37	NC	CNS	P35	1,16	CNS	CNS
L36	NC	2,03	CNS	P36	1,12	NC	CNS
L37	CNS	CNS	CNS	P37	1,16	NC	CNS
LMG1222 <sup>(7)</sup>	3,46	CNS	CNS	P38	CNS	CNS	CNS
INPA 03-11B <sup>(6)</sup>	CNS	NC	CNS	P39	CNS	CNS	CNS
BR3267 <sup>(6)</sup>	NC	NC	CNS	P40	NC	NC	NC
UFLA 03-84 <sup>(6)</sup>	2,91	NC	CNS	P41	CNS	1,19	CNS

<sup>(1)</sup>Isolados obtidos do solo coletado na cidade de Lavras – MG. <sup>(2)</sup>Isolados obtidos do solo coletado na cidade de Patos de Minas – MG. <sup>(3)</sup>I.S. = Ø HALO (mm) / Ø COLÔNIA (mm), avaliado no 15º dia de incubação. <sup>(4)</sup>NC = Não cresceu. <sup>(5)</sup>CNS = Cresceu, mas não solubilizou. <sup>(6)</sup>Estirpes recomendadas, pelo MAPA, como inoculante para Feijão caupi. <sup>(7)</sup>*Burkholderia cepacia*, controle positivo.

alumínio não é considerado um elemento essencial. Sendo assim, outros mecanismos devem existir para explicar este crescimento no meio com P-Al. Uma hipótese levantada por nós é a disponibilização de fósforo solúvel após esterilização do meio em autoclave, um exemplo disto é na preparação do meio de cultura líquido, onde inicialmente adicionamos 100 mg L<sup>-1</sup> de fosfato insolúvel, mas após 5 dias sob agitação e temperatura de 28 °C constante, o tratamento controle (sem inoculação de microrganismos) apresentou consideráveis concentrações de fósforo solúvel, as quais podem ser suficientes para um pleno desenvolvimento dos microrganismos. Aliado a isto, Souchie et al. (2005a) chamam a atenção para à solubilidade do fosfato, sua pureza e composição, as quais também podem afetar a avaliação visual da formação do halo.

#### 4.2.2 Solubilização em meio líquido

Muitos dos isolados que não apresentaram halo de solubilização em meio sólido, demonstraram-se eficientes na solubilização destes fosfatos em meio líquido. O número de isolados que solubilizaram em meio líquido foi maior que no meio sólido para os meios com P-Ca e P-Fe, fato este não observado para P-Al (Tabela 6). Souchie et al. (2005a) encontraram apenas um isolado de fungo capaz de solubilizar P-Al em meio sólido enquanto todos os isolados de bactérias e fungos solubilizaram P-Al em meio líquido e atribui isto ao estado físico do meio sólido ou à sua distinta composição, em relação ao meio líquido, do que à incapacidade dos isolados de solubilizar esse fosfato.

Os teores de P encontrados no controle após cinco dias de incubação foram 72,68 mg L<sup>-1</sup> para CaHPO<sub>4</sub>, 81,95 mg L<sup>-1</sup> para AlH<sub>6</sub>O<sub>12</sub>P<sub>3</sub> e 20,92 mg L<sup>-1</sup> para FePO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O. O menor teor de P solúvel no controle para P-Fe pode ser explicado pela menor constante de solubilidade deste fosfato ( $K_s = 1 \times 10^{-26}$ ) em comparação a P-Ca ( $K_s = 2,51 \times 10^{-7}$ ) e P-Al ( $K_s = 1 \times 10^{-21}$ ) (Stumm & Morgan, 1995), podendo explicar assim a não solubilização dos isolados em meio sólido com esta fonte de fosfato.

Em relação ao solo de onde foram capturados, houve um maior número de isolados do solo de Patos de Minas com capacidade de solubilizar P-Ca e P-Al, já para P-Fe ocorreu um maior número de isolados com capacidade de solubilizá-lo no solo de Lavras (Tabela 7). Isto pode ter sido influenciado pelas diferenças nas características químicas dos diferentes solos, principalmente na relação (P-Ca / (P-Al + P-Fe)), a qual é 0,18 no solo de Patos de Minas e 0,06 no solo de Lavras, ou seja, proporcionalmente há maior concentração de fósforo ligado a cálcio no solo de Patos de Minas, enquanto no solo de Lavras há uma maior concentração de fósforo ligado a ferro.

TABELA 7 Número e percentagem total de isolados que solubilizaram P-Ca, P-Al e P-Fe em meio sólido e líquido.

Local	Total	P-Ca		P-Al		P-Fe	
		Sólido	Líquido	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido
L	37	15	12	9	3	0	18
P	41	19	29	6	9	0	9
Total (%)	L	40,54	32,43	24,32	8,10	0,00	48,64
	P	46,34	70,73	14,63	21,95	0,00	21,95

L = Lavras – MG. P = Patos de Minas – MG.

Para o meio com P-Ca, verifica-se que 12 entre os 37 isolados do solo de Lavras e 29 entre os 41 isolados do solo de Patos de Minas aumentaram os teores de P solúvel ao final do período de incubação (Figura 13), com destaque aos isolados L2, L4, L8, L10, P7, P26, P29, P30, P31, P36, P40. Para o meio com P-Al, verificou-se que 3 entre os 37 isolados do solo de Lavras e 9 entre os 41 isolados do solo de Patos de Minas aumentaram os teores de P solúvel ao final do período de incubação (Figura 14), dando destaque aos isolados L9, P17, P22, P29, P35 e P36, enquanto que para o meio com P-Fe, verificou-se que 18 entre os 37 isolados do solo de Lavras e 9 entre os 41 isolados do solo de Patos de Minas aumentaram os teores de P solúvel ao final do período de incubação (Figura 15), com destaque aos isolados L2, L3, L4, L8, L29, P10, P25, P28 e P39. Além destes isolados que se destacaram em cada fonte de fosfato, verificou-se que a estirpe LMG1222, apresentou elevada capacidade solubilizadora de fosfatos inorgânicos insolúveis em meio líquido, fato este demonstrado em outros trabalhos (Lin et al., 2006; Song et al., 2008).

Os isolados L4, P31 e P40 foram os que mais conseguiram solubilizar P-Ca. Para P-Al os isolados L9, P22, P29 e P36 foram os que mais conseguiram

solubilizá-lo, enquanto os isolados P25, P28 e P39 foram os que mais conseguiram solubilizar P-Fe.

Por outro lado, como aconteceu com muitos isolados, as estirpes UFLA 03-84, INPA 03-11B e BR3267, não conseguiram solubilizar nenhuma das três fontes de fosfatos em meio líquido e ainda consumiram o que estava disponível inicialmente, principalmente no meio com P-Ca e P-Fe (Figuras 13 e 15), isto pode ser um indicativo de adaptabilidade dos isolados testados aos solos contendo fosfatos insolúveis.

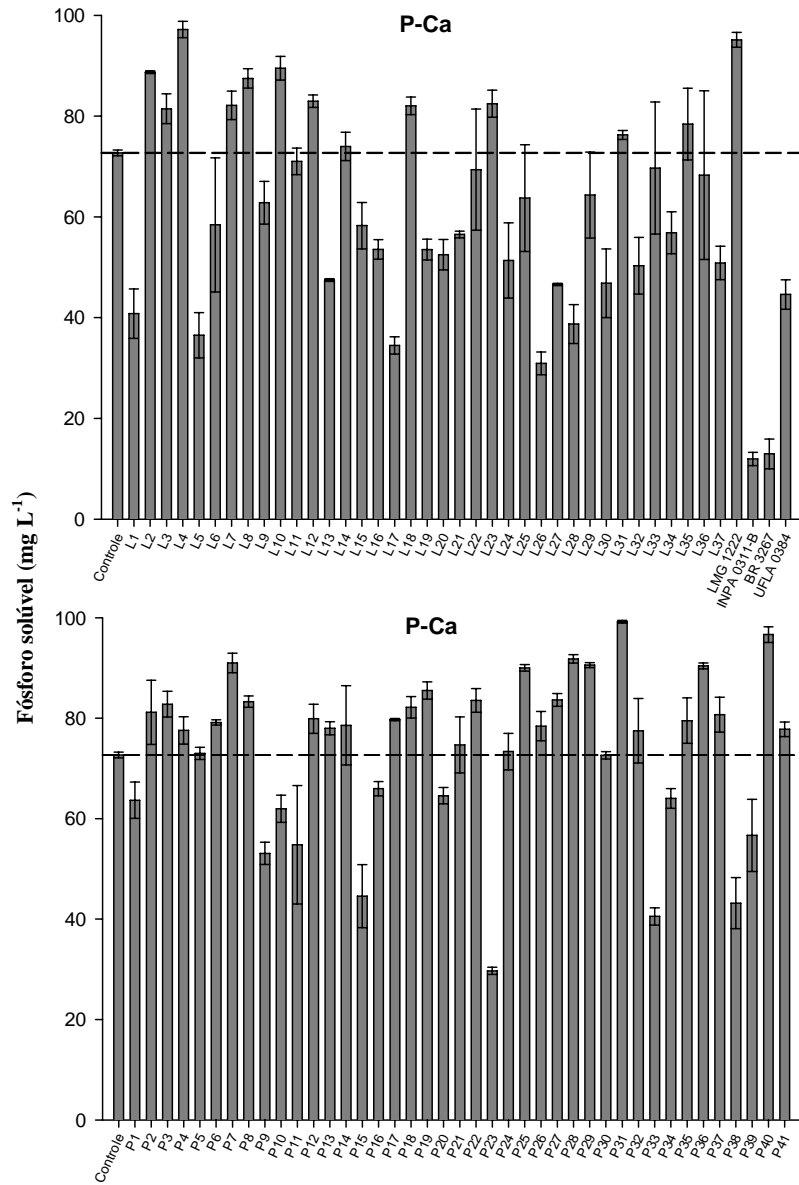


FIGURA 13 Fósforo solúvel em meio líquido, após incubação de isolados de bactérias na presença de P-Ca insolúvel. Linha tracejada representa o valor encontrado no controle.

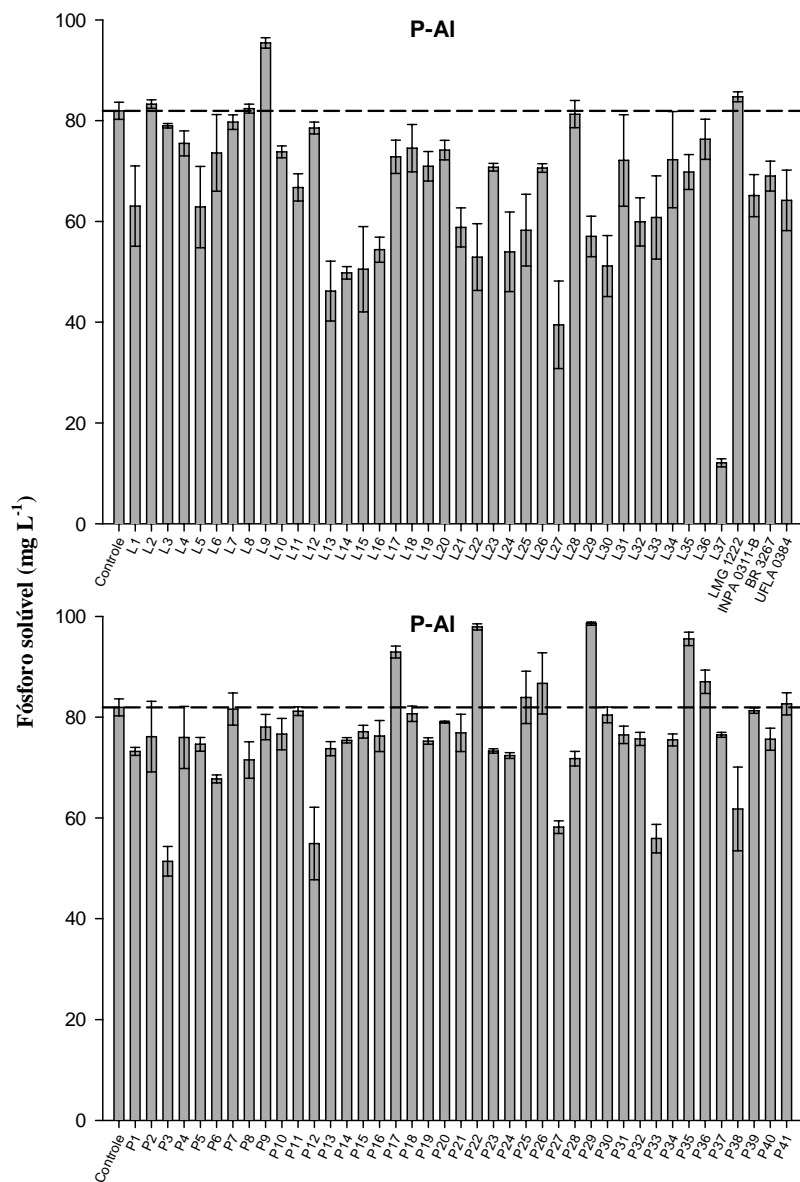


FIGURA 14 Fósforo solúvel em meio líquido, após incubação de isolados de bactérias na presença de P-AI insolúvel. Linha tracejada representa o valor encontrado no controle.

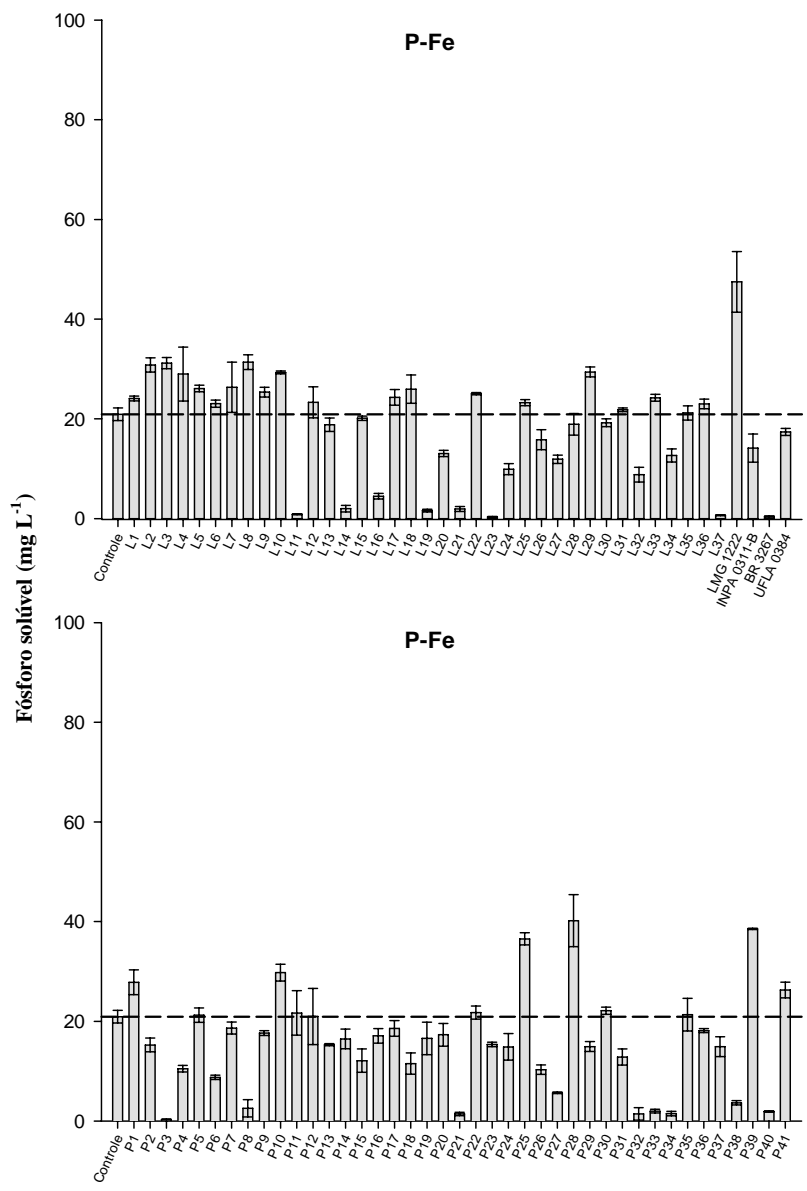


FIGURA 15 Fósforo solúvel em meio líquido, após incubação de isolados de bactérias na presença de P-Fe insolúvel. Linha tracejada representa o valor encontrado no controle.



De uma maneira geral, ocorreu um maior número de isolados com capacidade de solubilizar P-Ca, seguida de P-Fe e poucos conseguiram solubilizar P-Al, o mesmo ocorreu na eficiência de solubilização, sendo que em P-Ca obteve-se um concentração máxima de P solúvel no valor de 26,53 mg L<sup>-1</sup>, seguida de P-Fe no valor de 19,24 mg L<sup>-1</sup> e por fim P-Al no valor de 16,62 mg L<sup>-1</sup>. Esta maior solubilização de P-Ca pode ser explicada por Whitelaw (2000) que demonstra que a solubilização destes fosfatos insolúveis em solução aquosa é dependente do pH, uma vez que ocorreu maior diminuição do pH em meio com P-Ca, seguida de P-Fe e para o P-Al praticamente sem alteração. Chung et al. (2005) também encontraram esta relação quanto a eficiência de solubilização avaliando isolados de bactérias da rizosfera de plantas na Coréia do Sul e observaram que existe uma variação, entre os isolados, quando se refere a capacidade de solubilização nas diferentes fontes de fosfatos. Resultados diferentes foram encontrados por Silva-Filho (1998), que obteve maiores valores de solubilização em meio com P-Al do que em meio com P-Fe, e Illmer et al. (1995) quando avaliando quatro isolados de fungos na solubilização de P-Al, obtiveram altos valores de fósforo solúvel após incubação dos isolados no meio de cultura. Isto nos mostra que diferenças nos resultados encontrados, principalmente as relacionadas com solubilização em meio líquido, não podem ser atribuídas às mudanças no metabolismo do isolado, mas provavelmente são produtos das condições de cada meio, das limitações que estes impõem ao desenvolvimento dos microrganismos e da difusão das substâncias produzidas, criando regiões com diferentes concentrações que podem afetar o crescimento e/ou a solubilização (Silva-Filho, 1998).

É amplamente sugerido na literatura que a solubilização de fosfatos ocorre pela acidificação do meio e que isto estaria relacionado à produção de ácidos orgânicos, liberação de prótons e também devido aos processos de quelatação do metal acompanhante do íon fosfato (Halder et al., 1990;

Kpombrekou & Tabatabai, 1994). Entretanto, a quelação está condicionada ao pH do meio e aos pKs dos ácidos orgânicos, uma vez que sendo o pH do meio menor que o pKs de um determinado ácido orgânico, este estará protonado e assim não atuaria no processo de quelação, mas atuaria na solubilização por meio da acidificação, principalmente para o P-Ca. Caso contrário ( $\text{pH} > \text{pKs}$ ) este ácido estará na forma aniônica e assim atuaria como quelante do metal acompanhante do íon fosfato. No presente trabalho, a maioria dos isolados acidificaram os meios contendo P-Ca e P-Fe (Figuras 16 e 17). Para o meio contendo P-Al, apenas 6 isolados diminuíram o pH ao final do período de incubação, sendo que na maioria dos isolados o pH final permaneceu sem alteração (Figura 18). De modo geral, o meio contendo P-Al não sofreu alteração no pH, o que justifica menor número de isolados solubilizando esta fonte de fosfato. Houve uma relação inversa entre o pH do meio e a quantidade de P solúvel para P-Ca ( $r: -0,51^{**}$ ;  $y = 131,05 - 11,15x$ ) e P-Fe ( $r: -0,28^{**}$ ;  $y = 34,17 - 3,02x$ ), relação esta não observada para o P-Al. Resultados estes também foram encontrados por diversos autores (Sperber, 1958; Duff & Webley, 1959; Taha et al., 1969; Halder et al., 1990; Cunningham & Kuiack, 1992; Illmer & Schinner, 1992; Whitelaw et al., 1999; Hariprasad & Niranjana, 2009), sugerindo que a redução do pH é um processo envolvido na solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis no meio.

A estirpe LMG1222, usada como controle positivo, diminuiu o pH nos meios com P-Ca, P-Al e P-Fe a valores bem inferiores aos do controle. Estes resultados já eram esperados para P-Ca, uma vez que Lin et al. (2006) e Song et al. (2008) demonstram a alta eficiência em abaixar o pH e conseqüentemente solubilizar P-Ca, mas é novidade em se tratando de P-Al e P-Fe, mostrando assim, que o potencial de abaixar o pH do meio de cultura e solubilizar fosfatos insolúveis desta bactéria independe da fonte de fosfato. Ácidos orgânicos são

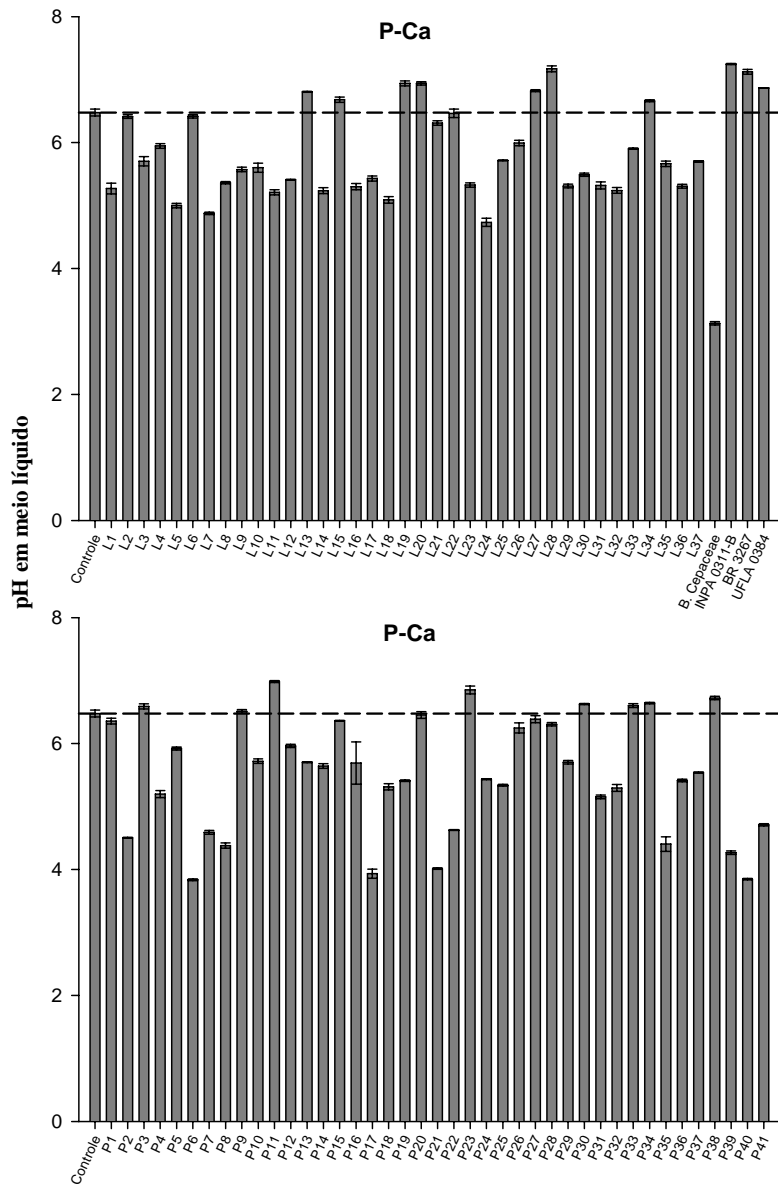


FIGURA 16 pH em meio líquido, após incubação de isolados de bactérias na presença de P-Ca insolúvel. Linha tracejada representa o valor encontrado no controle.

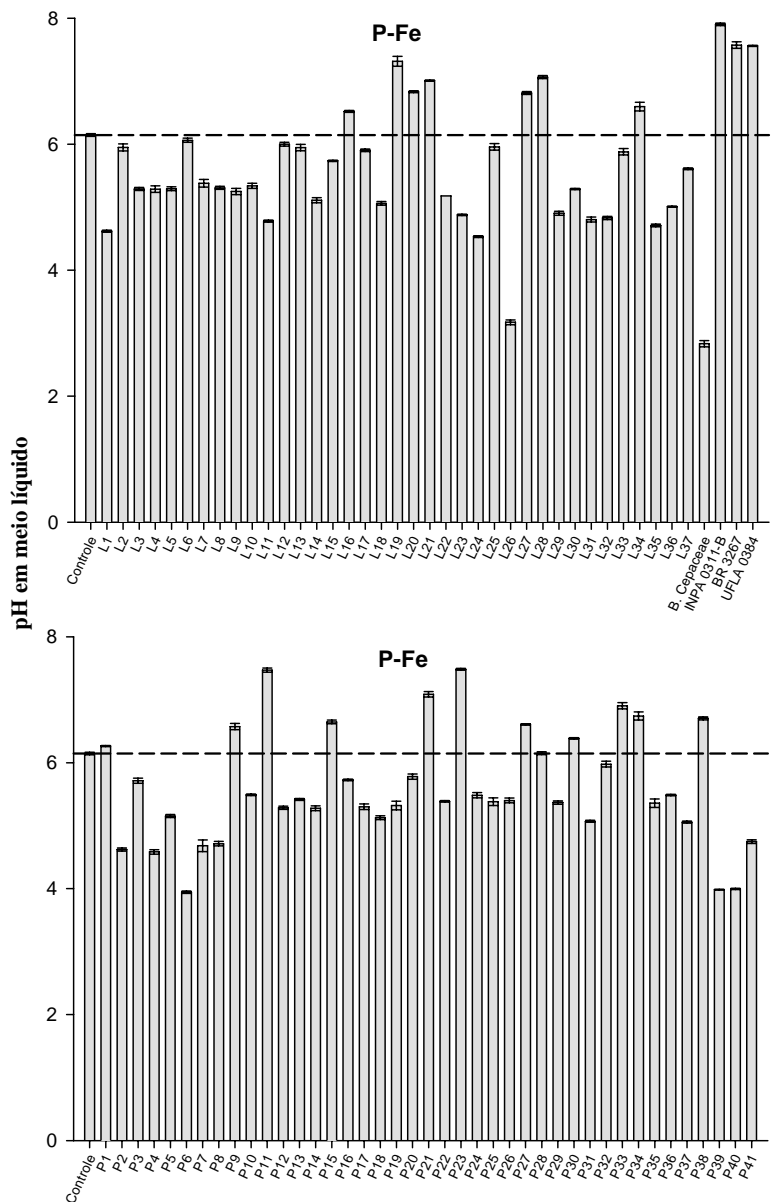


FIGURA 17 pH em meio líquido, após incubação de isolados de bactérias na presença de P-Fe insolúvel. Linha tracejada representa o valor encontrado no controle.

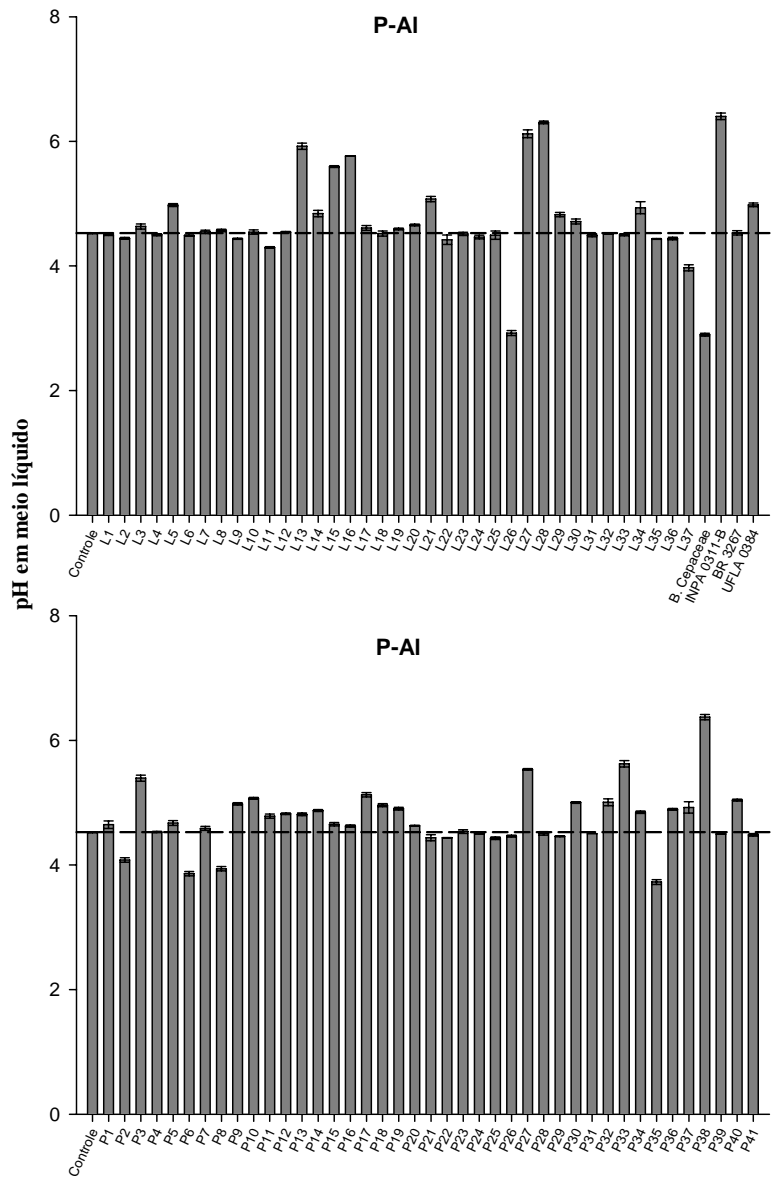


FIGURA 18 pH em meio líquido, após incubação de isolados de bactérias na presença de P-AI insolúvel. Linha tracejada representa o valor encontrado no controle.

liberados pela bactéria, como resultado da assimilação de carboidratos, e atuam na complexação do cátion do fosfato inorgânico para liberar fosfato solúvel (Whitelaw et al., 1999), este pode ser um dos mecanismos utilizados por esta bactéria. Por outro lado as estirpes UFLA 03-84, INPA 03-11B e BR3267, aumentaram o pH destes meios, o mesmo observado na caracterização cultural destas estirpes em meio 79, fato este que pode explicar o porque destas estirpes não conseguem solubilizar fosfatos insolúveis em meio líquido.

A relação entre a capacidade de solubilização em meio líquido e a eficiência na FBN indicada pela matéria seca de parte aérea por alguns isolados testados é mostrada nas figuras: 19 para P-Ca e 20 para P-Fe e 21 para P-Al. Neste modelo de quadrantes, a linha na horizontal separa os isolados que conseguiram solubilizar fosfatos inorgânicos insolúveis em meio líquido dos que não conseguiram e a linha na vertical separa os isolados mais eficientes dos menos eficientes, ou seja, que proporcionaram matéria seca de parte aérea superior e inferior ao controle nitrogenado. Os isolados do quadrante 1 solubilizaram fosfato em meio líquido e apresentaram MSPA superior ao controle nitrogenado, do quadrante 2 não solubilizaram fosfato em meio líquido, mas apresentaram MSPA superior ao controle nitrogenado, enquanto os do quadrante 3 não solubilizaram fosfatos em meio líquido e apresentaram MSPA inferior ao controle nitrogenado, e por fim, os isolados do quadrante 4 solubilizaram fosfato em meio líquido e apresentaram MSPA inferior ao controle nitrogenado. Não houve correlação entre a solubilização em meio líquido e a eficiência da FBN para as diferentes fontes de fosfatos. Os isolados presentes nestes quadrantes foram selecionados da seguinte maneira: L14, P6, P10, P20, P31 e P40 foram eficientes na FBN; P22, P28, P29, P31 e P39 foram avaliados quanto a produção de ácidos orgânicos em meio de solubilização líquido; L2, L4 e L8 foram capazes de solubilizar P-Ca e P-Fe em meio líquido; P29 e P36 foram capazes de solubilizar P-Ca e P-Al em meio líquido.

Quando analisamos os isolados que se destacaram na FBN com sua capacidade de solubilização podemos verificar que os isolados L14, P6, P31 e P40 foram eficientes na solubilização de P-Ca, nenhum solubilizou P-Al e apenas o isolado P10 foi eficiente na solubilização de P-Fe, também é interessante notar que os isolados L2, L4 e L8 se destacaram na solubilização de P-Ca e P-Fe, e os isolados P29 e P36 na solubilização de P-Ca e P-Al, aumentando assim, sua capacidade de uso como inoculante em solos com ambas as formas de fosfatos insolúveis, tanto em espécies leguminosas quanto em não leguminosas.

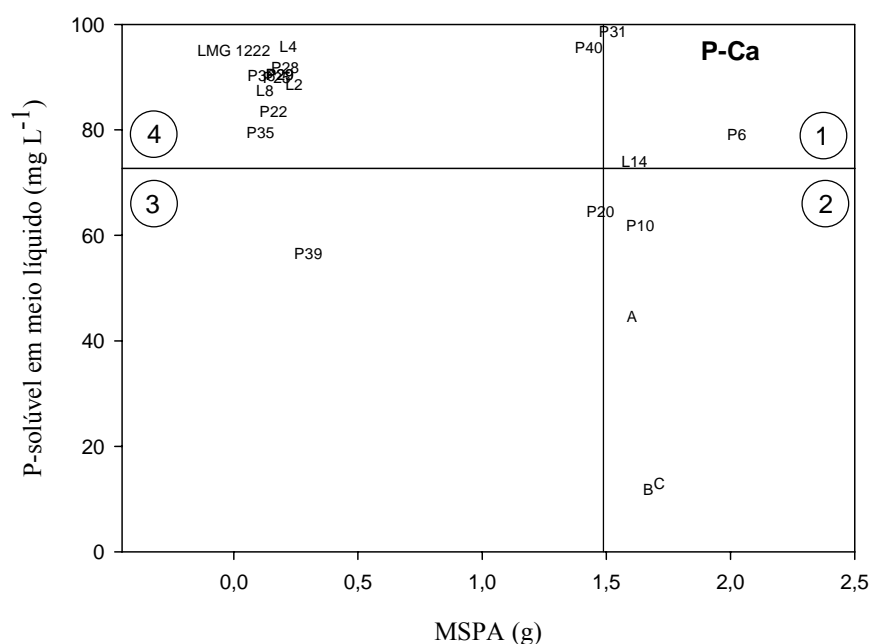


FIGURA 19 Modelo quadrante ilustrando a relação entre a solubilização de P-Ca em meio líquido e matéria seca de parte aérea (MSPA). Os quadrantes são separados pela concentração de P solúvel em meio líquido presente no tratamento controle ( $72,68 \text{ mg L}^{-1} \text{ P}$ ) e pelo peso de MSPA presente no controle nitrogenado ( $1,49 \text{ g}$ ). A= UFLA 03-84, B= INPA 03-11B, C= BR3267.

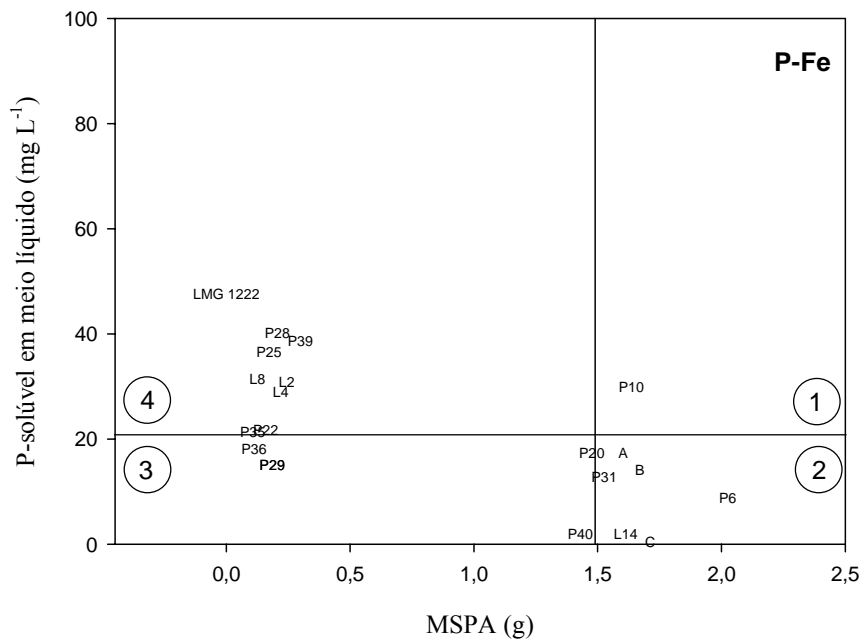


FIGURA 20 Modelo quadrante ilustrando a relação entre a solubilização de P-Fe em meio líquido e matéria seca de parte aérea (MSPA). Os quadrantes são separados pela concentração de P solúvel em meio líquido presente no tratamento controle (20,92 mg L<sup>-1</sup> P) e pelo peso de MSPA presente no controle nitrogenado (1,49 g). A= UFLA 03-84, B= INPA 03-11B, C= BR3267.



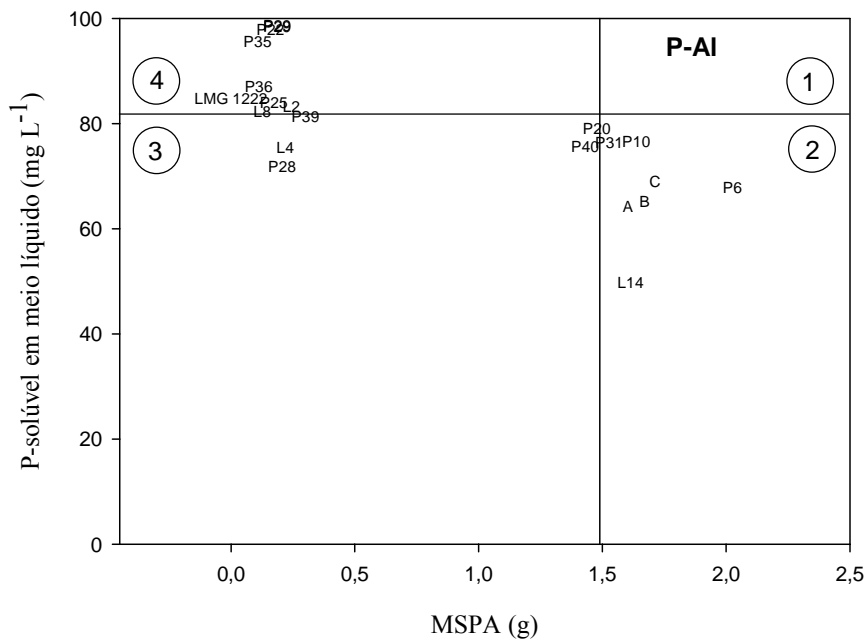


FIGURA 21 Modelo quadrante ilustrando a relação entre a solubilização de P-Al em meio líquido e matéria seca de parte aérea (MSPA). Os quadrantes são separados pela concentração de P solúvel em meio líquido presente no tratamento controle (81,95 mg L<sup>-1</sup> P) e pelo peso de MSPA presente no controle nitrogenado (1,49 g). A= UFLA 03-84, B= INPA 03-11B, C= BR3267.

### 4.3 Identificação e quantificação de ácidos orgânicos

A produção de ácidos orgânicos no meio com P-Ca apresentou uma grande variação entre os isolados. No tratamento controle não foi detectado a presença de ácidos orgânicos (Figura 22). Para o isolado P31 que se destacou na solubilização de P-Ca, observamos a presença dos ácidos cítrico (0,05 mmol L<sup>-1</sup>) e propiônico (11,67 mmol L<sup>-1</sup>). Para os isolados P22 e P29 que se destacaram na solubilização de P-Al, no meio com P-Ca observamos a presença

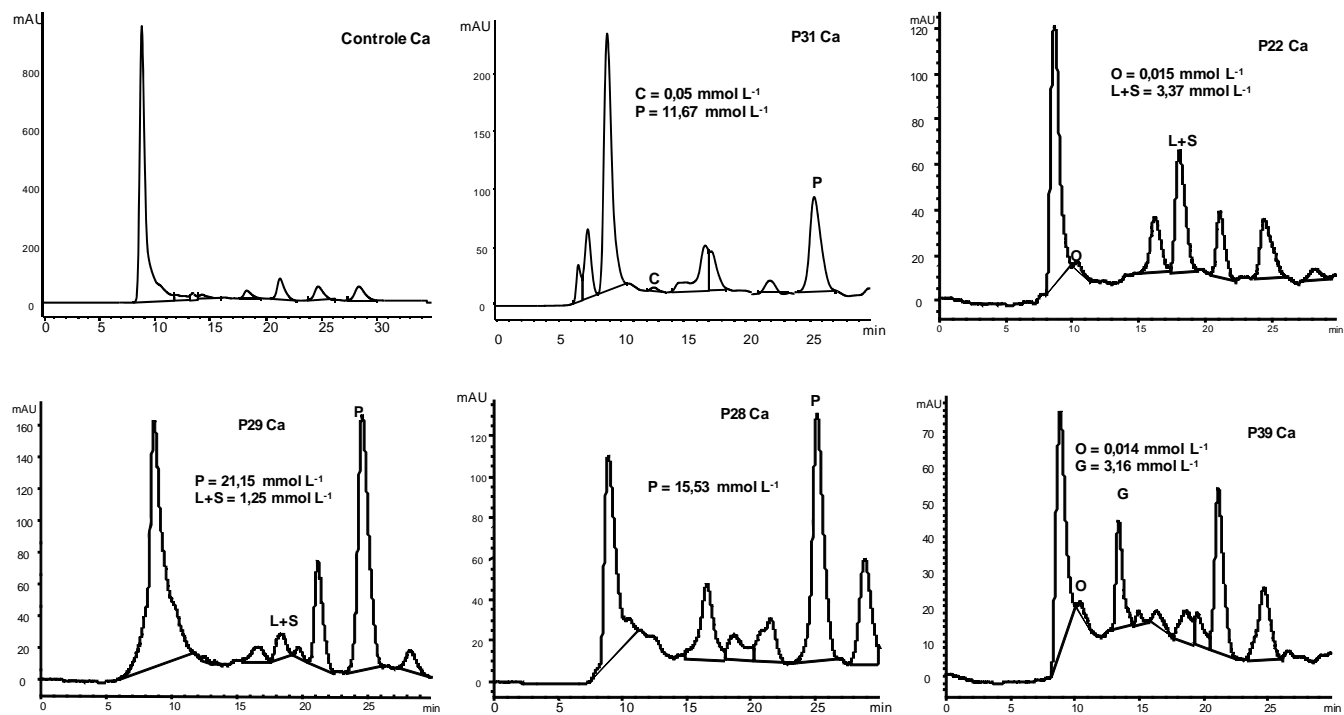


FIGURA 22 Identificação e quantificação dos ácidos orgânicos produzidos no tratamento controle e pelos isolados P31, P22, P29, P28 e P39 em meio de cultura GES suplementado com P-Ca. (C: cítrico; G: glucônico; L+S: lático + succínico; O: oxálico; P: propiónico).

dos ácidos oxálico ( $0,015 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e láctico + succínico ( $3,37 \text{ mmol L}^{-1}$ ) para o isolado P22, e os ácidos láctico + succínico ( $1,25 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e propiônico ( $21,15 \text{ mmol L}^{-1}$ ) para o isolado P29. Enquanto que nos isolados P28 e P39, que se destacaram na solubilização de P-Fe, no meio com P-Ca, foi observado a presença do ácido propiônico ( $15,53 \text{ mmol L}^{-1}$ ) para o isolado P28, e os ácidos oxálico ( $0,014 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e glucônico ( $3,16 \text{ mmol L}^{-1}$ ) para o isolado P39 (Figura 22). Illmer & Schinner (1992), Whitelaw et al. (1999) e Yi et al. (2008) encontraram concentrações próximas a deste trabalho para os ácidos cítrico, glucônico, láctico, succínico e oxálico, entretanto, para o ácido propiônico Sperber (1957) e Chen et al. (2006) demonstraram sua ocorrência, mas não quantificaram sua produção.

A produção de ácidos orgânicos é um dos principais mecanismos atribuídos a maioria dos isolados solubilizadores de fosfatos estudados (Sperber, 1958; Halder et al., 1991; Whitelaw et al., 1999; Whitelaw, 2000; Chuang et al., 2007; Song et al., 2008; Tao et al., 2008; Xie, 2008), entretanto, para o meio com P-Al nenhum dos ácidos orgânicos avaliados foi observado, nem mesmo nos isolados P22 e P29, os quais se destacaram na solubilização deste fosfato (Figura 23). Detalhe importante é que neste meio também não houve alteração do pH para nenhum isolado. Verifica-se que estes resultados difere um pouco dos encontrados por Illmer et al. (1995), trabalhando em meio de cultura com pH inicial de 7,0, pois estes autores demonstraram haver solubilização de P-Al sem necessariamente haver produção de ácidos orgânicos, entretanto houve diminuição do pH. Illmer & Schinner (1992) também demonstraram haver solubilização de P-Ca sem produção de ácidos orgânicos, mas houve diminuição de pH. Um fator estudado por Yi et al. (2008) e que pode justificar esta solubilização é a grande produção de exopolissacarídeos apresentada por estes isolados (Tabela 2 - anexo), uma vez que estes autores confirmaram a

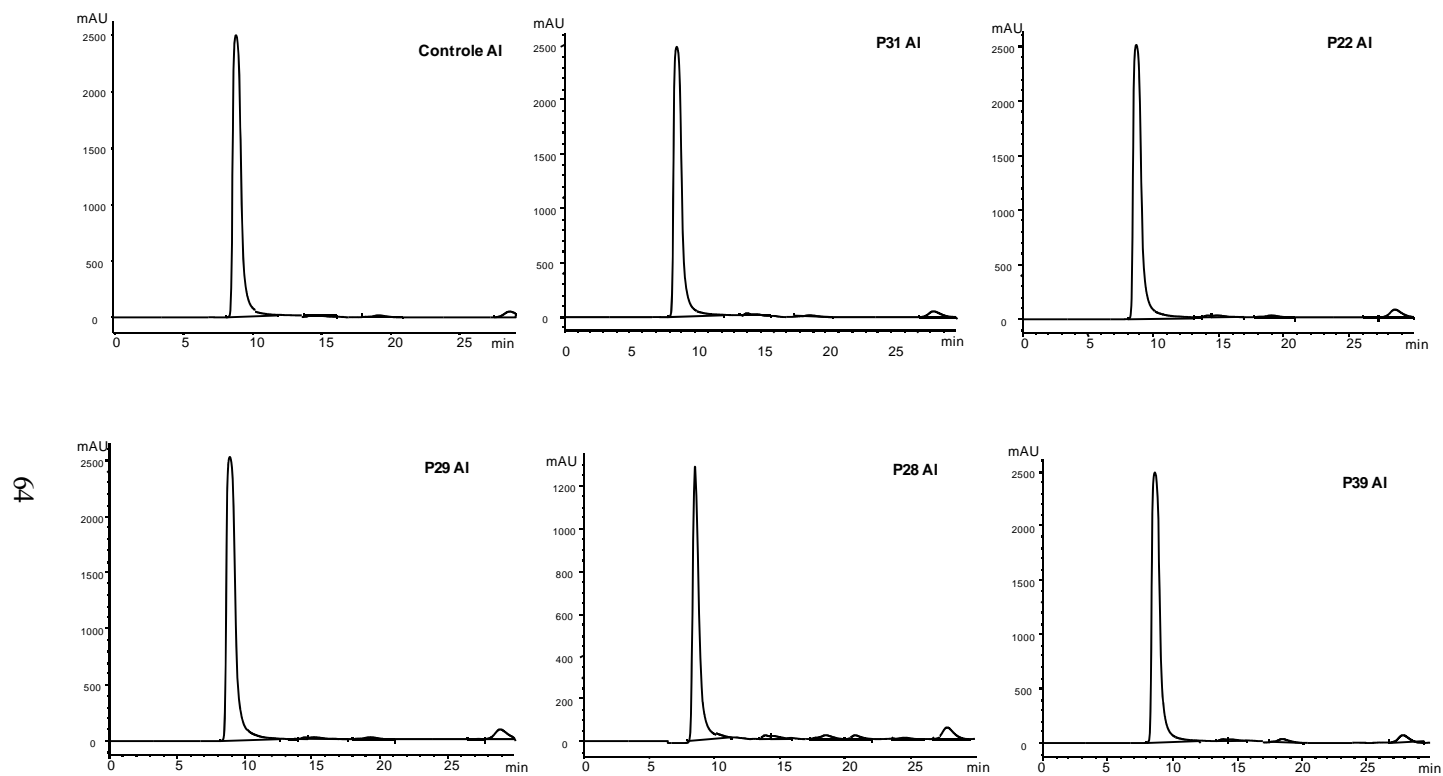


FIGURA 23 Identificação e quantificação dos ácidos orgânicos produzidos no tratamento controle e pelos isolados P31, P22, P29, P28 e P39 em meio de cultura GES suplementado com P-AI.

importância destes exopolissacarídeos na solubilização de P-Ca, evidenciando assim, que além da produção de ácidos orgânicos, existem outros fatores envolvidos na solubilização de fosfatos. Entretanto, há que se pesquisar mais para um melhor entendimento deste processo, pois a presença de outros ácidos orgânicos, tais como: 2-cetoglucônico (Halder et al., 1990), tartárico (Yi et al., 2008) e glicólico (Sperber, 1958) não estudados neste trabalho, podem ter ocorrido.

No meio com P-Fe foi detectada a presença dos ácidos cítrico (0,08 mmol L<sup>-1</sup>) e lático + succínico (5,75 mmol L<sup>-1</sup>) para o isolado P28, e o ácido glucônico (1,28 mmol L<sup>-1</sup>) para o isolado P39, o pH não alterou para o isolado P28, mas diminuiu para o isolado P39, e em ambos ocorreu alta solubilização. Os resultados do isolado P28 não corroboram com os encontrados por Whitelaw et al. (1999), Chuang et al. (2007) e Song et al. (2008), devido a ocorrência de solubilização sem diminuição do pH, entretanto, corroboram com Chen et al. (2006), Sharan et al. (2008), Chaiharn & Lumyong (2009) e Jha et al. (2009) que encontraram bactérias solubilizando P-Ca em pH entre 6,0 e 6,3 na presença de ácidos orgânicos. Além disso, Nahas (1996), Chaiharn & Lumyong (2009) e Jha et al. (2009) não encontraram correlação significativa entre a solubilização de P-Ca e a diminuição do pH do meio e mesmo assim ocorreu solubilização. Assim, outros fatores devem ser também considerados, como por exemplo, o tempo, as condições de crescimento, as características fisiológicas dos microrganismos, o tipo de fosfato utilizado e principalmente o pKs dos ácidos encontrados, pois neste caso, os ácidos apresentam pKs inferiores ao pH do meio, estando assim, na fase aniônica atuando como quelantes do metal acompanhante do íon fosfato, não diminuindo assim o pH (Whitelaw, 2000). Para o isolado P31 foi detectada a presença dos ácidos oxálico (0,27 mmol L<sup>-1</sup>) e lático + succínico (0,56 mmol L<sup>-1</sup>). Enquanto que para os isolados P22 e P29 foram detectadas a presença dos ácidos lático + succínico (3,21 mmol L<sup>-1</sup> e 0,91 mmol L<sup>-1</sup>, respectivamente)

(Figura 24). A identificação e quantificação de ácidos orgânicos por microrganismos de um forma geral em meio com P-Fe é praticamente inexistente, Chuang et al. (2007) demonstraram haver a produção do ácido oxálico na solubilização de P-Fe e ou P-Al, mas não quantificaram, o mesmo acontece no trabalho de Barroso & Nahas (2008) onde concluem que a produção de ácidos é o principal mecanismo utilizado pelo isolado de *Aspergillus niger* para a solubilização do P-Fe, mas não identificaram nem quantificaram estes ácidos.

Os isolados P29 e P31, que foram eficientes na solubilização de P-Al e P-Ca, respectivamente, não conseguiram solubilizar no meio contendo P-Fe, mesmo produzindo ácidos orgânicos neste meio. Estes resultados nos mostram que a produção de ácidos orgânicos nem sempre resultam na solubilização de fosfatos, uma vez que o tipo e a concentração total destes ácidos podem influenciar neste processo (Silva-Filho, 1998).

Também vale destacar que apesar da baixa concentração de ácidos orgânicos no meio com P-Fe, produzidos pelo isolado P31, o pH deste diminuiu na mesma proporção que o pH do meio com P-Ca, pressupõem se então que o abaixamento do pH não ocorre apenas pela produção de ácidos orgânicos, mas também por outros mecanismos envolvidos no equilíbrio químico entre a célula e o meio externo (Illmer et al., 1995; Nahas, 1999). Embora o isolado P29 apresente uma maior concentração de ácidos orgânicos no meio com P-Ca, foi o isolado P31 quem solubilizou maior concentração de P-Ca, evidenciando assim, que o tipo de ácido produzido pelo microrganismo e o pH do meio tem grande importância neste processo, uma vez que o ácido cítrico possui uma maior habilidade de complexação do Ca em pH próximo a 5,0, quando comparado com os ácidos láctico e succínico (Jones, 1998), já que o ácido propiônico foi observado em ambos os isolados.

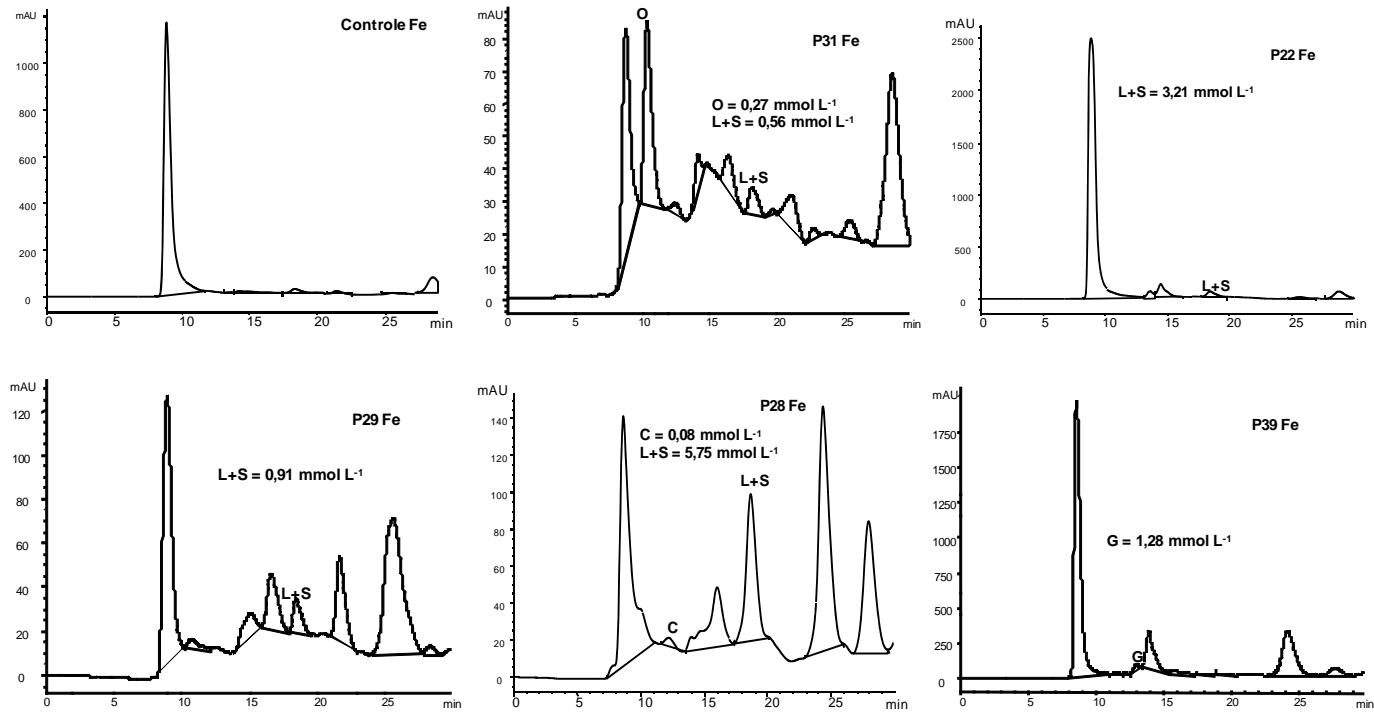


FIGURA 24 Identificação e quantificação dos ácidos orgânicos produzidos no tratamento controle e pelos isolados P31, P22, P29, P28 e P39 em meio de cultura GES suplementado com P-Fe. (C: cítrico; G: glucônico; L+S: láctico + succínico; O: oxálico).

Entre os fosfatos encontramos uma maior concentração total de ácidos orgânicos no meio com P-Ca (56,20 mmol L<sup>-1</sup>), seguida de P-Fe (12,06 mmol L<sup>-1</sup>). Enquanto entre os ácidos a concentração decresce da seguinte ordem: propiônico (48,35 mmol L<sup>-1</sup>); láctico + succínico (15,05 mmol L<sup>-1</sup>); glucônico (4,44 mmol L<sup>-1</sup>), oxálico (0,30 mmol L<sup>-1</sup>); cítrico (0,13 mmol L<sup>-1</sup>). Cunningham & Kuiack (1992) demonstram que os ácidos cítrico e oxálico são produzidos por *Penicillium bilaii* na solubilização de P-Ca. Enquanto Yi et al. (2008) encontraram o ácido láctico (14,48 mmol L<sup>-1</sup>) em maior concentração para *Arthrobacter* sp. na solubilização de P-Ca, seguida dos ácidos oxálico + glucônico (6,90 mmol L<sup>-1</sup>) e cítrico (0,48 mmol L<sup>-1</sup>), já para *Azotobacter* sp a maior concentração encontrada foi para o ácido succínico (1,75 mmol L<sup>-1</sup>).

Diferente dos resultados encontrados por Halder et al. (1990), Hwangbo et al. (2003), Kim et al. (2003), Chuang et al. (2007) e Barroso & Nahas (2008) não encontramos correlação entre a concentração total de ácidos orgânicos produzidos com a solubilização de fosfato, isto é bem discutido por Illmer & Schinner (1992, 1995) e Illmer et al. (1995).

Os resultados obtidos nos demonstram que a solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis é dependente da produção de ácidos, para alguns isolados, em meio principalmente com P-Ca e P-Fe, independentemente se estes estejam atuando na fase protonada ou aniônica, mas no meio com P-Al a solubilização ocorre sem presença destes ácidos orgânicos, demonstrando que esta habilidade depende dos microrganismos, dos fosfatos utilizados, além de fatores não identificados tais como produção de exopolissacarídeos, equilíbrio eletrostático da célula bacteriana, mecanismos de proteção contra alumínio tóxico, dentre outros.



## 5 CONCLUSÕES

As comunidades de bactérias isoladas de nódulos de feijão caupi dos dois solos são distintas e apresentam grande variabilidade na eficiência dos processos de FBN e solubilização de fosfatos inorgânicos insolúveis;

Isolados altamente eficientes na FBN foram obtidos dos dois solos estudados;

De maneira geral houve um maior número de isolados com capacidade de solubilizar fosfatos inorgânicos insolúveis em meio líquido em relação ao meio sólido, cuja capacidade de solubilização decresceu na seguinte ordem: P-Ca > P-Fe > P-Al;

A solubilização de P-Ca e P-Fe, pelos isolados, foi relacionada com a diminuição do pH no meio líquido;

Os principais ácidos orgânicos produzidos pelos isolados selecionados foram: propiônico, láctico + succínico, glucônico, oxálico e cítrico, no entanto não houve relação desses com a solubilização de fosfatos;

A maioria dos ácidos orgânicos produzidos pelos isolados com capacidade solubilizadora de P-Ca atuaram acidificando o meio de cultura, enquanto no meio com P-Fe todos atuaram quelando o íon  $\text{Fe}^{3+}$ ;

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- BARROSO, C.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, p.529-535, abr. 2008.
- BENDING, G.D.; TURNER, M.K.; RAYNS, F.; MARX, M.; WOOD, M. Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.36, p.1785-1792, 2004.
- 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.
- 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.
- CAMPOS, F.L.; FREIRE FILHO, F.R.; LOPES, A.C. de A.; RIBEIRO, V.Q.; SILVA, R.Q.B. da; ROCHA, M. de M. Ciclo fenológico em caupi [*Vigna*

*unguiculata* (L.) Walp.]: uma proposta de escala de desenvolvimento. **Revista Científica Rural**, Bagé, v.5, p.110-116, 2000.

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.

CHAGAS-JUNIOR, A.F. **Características agronômicas e ecológicas de Rizóbios isolados de solos ácidos e de baixa fertilidade da Amazônia**. 2007. 158p. Tese (Doutorado em Biotecnologia)–Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

CHAIHARN, M.; LUMYONG, S. Phosphate solubilization potential and stress tolerance of rhizobacteria from rice soil in Northern Thailand. **World Journal Microbiology Biotechnology**, Oxford, v.25, p.305-314, 2009.

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.

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 & Biochemistry**, Elmsford, v.37, p.1970-1974, 2005.

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.

DUGUMA, B.; KANG, B.T.; OKALI, D.U.U. Effect of liming and phosphorus application on performance of *Leucaena leucocephala* in acid soils. **Plant and Soil**, The Hague, v.110, p.57-61, 1988.

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.

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

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.

ESSINGTON, M.E.; NELSON, J.B.; HOLDEN, W. Gibbsite and goethite solubility: the influence of 2-Ketogluconate and citrate. **Soil Science Society America Journal**, Madison, v.69, p.996-1008, 2005.

FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M.; HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, p.835-842, jul. 2003.

FERREIRA, D.F. **Sisvar versão 4.6**. Lavras: DEX/UFLA, 2004. 32p.

FILOSO, S.; MARTINELLI, L.A.; HOWARTH, R.W.; BOYER, E.W.; DENTENER, F. Human activities changing the nitrogen cycle in Brazil. **Biogeochemistry**, v.79, p.61-89, 2006.

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

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.

GOLDSTEIN, A.H.; ROGERS, R.D.; MEAD, G. Mining by microbe. **Bio/Technology**, v.11, p.1250-1254, 1993.

GRANT, C.A.; FLATEN, D.N.; TOMASIEWICZ, D.J.; SHEPPARD, S.C. **A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta**. Piracicaba: Potafos, 2001. 28p. (Informações agronômicas, 95).

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

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.

HALDER, A.K.; MISHRA, A.K.; CHAKRABARTTY, P.K. Solubilization of inorganic phosphates by *Bradyrhizobium*. **Indian Journal Experimental Biology**, New Delhi, v.29, p.28-31, 1991.

HALDER, A.K.; BANERJEE, A.; MISHRA, A.K.; CHAKRABARTTY, P.K. Role of  $\text{NH}_4^+$  or  $\text{NO}_3^-$  on release of soluble phosphate from hydroxyapatite by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. **Journal of Basic Microbiology**, v.32, p.325-330, 1992.

HALDER, A.K.; CHAKRABARTTY, P.K. Solubilization of inorganic phosphates by *Rhizobium*. **Folia Microbiology**, v.38, p.325-330, 1993.

HARA, F.A. dos S.; OLIVEIRA, L.A. de. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álcalos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazonica**, Manaus, v.34, p.343-357, 2004.

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

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.

HARRISON, S.P.; MYTTON, L.R.; SKOT, L.; DYE, M.; CRESSWELL, A. Characterization of *Rhizobium* isolates by amplification of DNA polymorphisms using random primers. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p.1009-1015, 1992.

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

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.65, p.151-164, 2000.

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 intermedius*. **Current Microbiology**, v.47, p.87-92, 2003.

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

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

JESUS, E. da C.; FLORENTINO, L.A.; RODRIGUES, M.I.D.; OLIVEIRA, M.S. de; MOREIRA, F.M. de S. Bactérias que nodulam sirato em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, p.769-776, ago. 2005.

JHA, B.K.; PRAGASH, M.G.; CLETUS, G.; RAMAN, G.; SAKTHIVEL, N. Simultaneous phosphate solubilization potential and antifungal activity of new fluorescent pseudomonad strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. plecoglossicida*

and *P. mosselii*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, Oxford, v.25, p.573-581, 2009.

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.

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.

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.

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.

LACERDA, A.M.; MOREIRA, F.M.S.; ANDRADE, M.J.B.; SOARES, A.L.L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade de feijão caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, v.51, p.67-82, 2004.

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

LEWIN, A.; ROSENBERG, C.; MEYER, H.Z.A.; WONG, C.H.; NELSON, L.; MANEN, J.F.; STANLEY, J.; DOWLING, D.N.; DÉNARIE, J.; ROUGHTON, W.J. Multiple host-specificity *loci* of the broad host-range *Rhizobium* sp. NGR234 selected using the widely compatible legume *Vigna unguiculata*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.8, p.447-459, 1987.

LI, J.H.; WANG, E.T.; CHEN, W.F.; CHEN, W.X. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v.40, p.238-246, 2008.

LIMA, A.S.; PEREIRA, J.P.A.; MOREIRA, F.M.S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, p.1095-1104, nov. 2005.

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.

LOPES, A.S.; SILVA, C.A.P. da; BASTOS, A.R.R. Reserva de fosfatos e produção de fertilizantes fosfatados no Brasil e no Mundo. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S. **Fósforo na agricultura brasileira**. Piracicaba: Potafos, 2004. p.13-34.

LOPES, E.S. Fixação biológica do nitrogênio no sistema solo-planta. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S.; VITTI, G.C. **Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira**. Piracicaba: INPI Brasil, 2007. 722p.

MALAVOLTA, E. **Manual de química agrícola**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1976. v.1, 410p.

MALAVOLTA, E. **Adubos fosfatados e o ambiente**. Piracicaba: COPEBRAS, 2002. 51p. Relatório.

MELLONI, R.; MOREIRA, F.M.S.; NÓBREGA, R.S.A.; SIQUEIRA, J.O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam Caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.30, p.235-246, 2006.

MOREIRA, F.M.S. **Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de Leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica**. 1991. 152p. Tese



(Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí.

MOREIRA, F.M.S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosae. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: UFLA, 2008. 768p.

MOREIRA, F.M.S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A.A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, New York, v.16, p.135-146, 1993.

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

MOSS, G.P.; SMITH, P.A.S.; TAVERNIER, D. **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: 2 mar. 2009.

MOTTA, P.E.F.; CURI, 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. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolates from soil. **World Journal Microbiology Biotechnology**, Oxford, v.12, p.567-572, 1996.

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: SBSC/UFLA/DCS, 1999. p.467-486.

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.
- OLIVEIRA, I.P.; CARVALHO, A.M.A. de. A cultura do caupi nas condições de clima e solo dos trópicos úmidos e semi-áridos do Brasil. In: ARAÚJO, J.P.P. de; WATT, E.E. (Org.). **O caupi no Brasil**. Brasília, DF: ITA/Embrapa, 1988. p.65-95.
- PAL, S.S. Interactions of an acid tolerant strain of phosphate solubilizing bacteria with a few acid tolerant crops. **Plant and Soil**, The Hague, v.198, p.169-177, 1998.
- 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.
- PAUL, N.B.; SUNDARA-RAO, W.V.B. Phosphate-dissolving bacteria in the rhizosphere of some cultivated legumes. **Plant and Soil**, The Hague, v.35, p.127-132, 1971.
- 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.
- PEREIRA, E.G. **Diversidade de rizóbios isolados diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia**. 2000. 93p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- RAGHOTHAMA, K.G. Phosphate acquisition. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.50 p.665-693, 1999.
- 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.

RALSTON, D.B.; McBRIDE, R.P. Interaction of mineral phosphate-dissolving microbes with red pine seedlings. **Plant and Soil**, The Hague, v.45, p.493-507, 1976.

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.

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.

RUMJANEK, N.G.; MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; NEVES, M.C.P. Fixação Biológica de Nitrogênio. In: FERREIRA FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q. **FEIJÃO-CAUPI: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa, 2005. p.347-417.

SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1979. 27p.

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.

SILVA, R.P. da; SANTOS, C.E. dos; LIRA-JÚNIOR, M.A.; STAMFORD, N.P. Efetividade de estirpes selecionadas para feijão caupi em solo da região semi-árida do sertão da Paraíba. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.3, p.105-110, 2008.

SILVA-FILHO, G.N. **Solubilização de fosfatos pela microbiota do solo**. 1998. 140p. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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

SILVA-FILHO, G.N.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, p.1495-1508, dez. 2001.

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.

SOARES, A.L.L.; PEREIRA, J.P.A.R.; FERREIRA, P.A.A.; VALE, H.M.M.; LIMA, A.S.; ANDRADE, M.J.B.; MOREIRA, F.M.S. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG): I, Caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.30, p.795-802, 2006.

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.

SOUCHIE, E.L.; AZCÓN, R.; BAREA, J.M.; JÚNIOR-SAGGIN, O.J.; SILVA, E.M. da. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, p.1149-1152, nov. 2005a.

SOUCHIE, E.L.; CAMPELO, E.F.C.; SAGGIN JÚNIOR, O.J.; SILVA, E.M.R. da. Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. **Floresta**, Curitiba, v.35, p.329-334, maio/ago. 2005b.

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.

STAUFFER, M.D.; SULEWSKI, G. Fósforo: essencial para a vida. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S. **Fósforo na agricultura brasileira**. Piracicaba: Potafos, 2004. p.1-12.

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, n.1, p.149-160, 1969.

TAO, G.C.; TIAN, S.J.; CAI, M.Y.; XIE, G.H. Phosphate solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. **Pedosphere**, v.18, p.515-523, 2008.

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.

VINCENT, J.M.A. **Manual for the Pratical Study of root-nodule bactéria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164p. (International biological programme handbook, 15).

WHITELAW, M.A.; HARDEN, T.J.; HELYAR, K.R. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.31, p.655-665, 1999.

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

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

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.

## ANEXOS

TABELA 1 Resumo das análises de variância da matéria seca de parte aérea (MSPA), matéria seca de raiz (MSR), área foliar (AF), número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), teor de nitrogênio (Teor de N), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) e eficiência relativa (ER), obtidos da inoculação do feijão caupi com isolados de bactérias.

FV	GL	QM							
		MSPA	MSR	AF	NN	MSN	Teor de N	ANPA	ER
Tratamentos	82	0,7028*	0,2203*	32417,1*	36,8*	0,0093*	6,227*	1334,8*	3059,7*
Erro	166	0,0005	0,0012	19,5	0,3	0,0000	0,009	0,9	2,57
CV (%)		5,47	8,63	5,43	15,93	0,48	7,63	9,29	5,88

\*Teste de F significativo ao nível de 5% de probabilidade.





TABELA 2 Características culturais dos isolados de bactérias obtidos do feijão caupi com amostras de solo de Lavras e Patos de Minas, realizada assim que se constatou o crescimento da colônia no meio.

Isolado	Taxa de Crescimento <sup>(1)</sup>	pH <sup>(2)</sup>	Cor da colônia	Produção de muco	Consistência da colônia	Transmissão de luz	Absorção do Indicador	Diâmetro da colônia <sup>(3)</sup>	Forma da colônia	Elevação da colônia	Borda da colônia	Superfície da colônia
L1 <sup>(4)</sup>	2 a 3	Ácido	Laranja	Pouca	Seca	Opaca	Sim	2 a 3	Irregular	Plana	Ondulada	Rugosa
L2	2 a 3	Alcalino	Rosa	Pouca	Seca	Opaca	Não	3 a 4	Circular	Plana	Inteira	Lisa
L3	2 a 3	Ácido	Laranja	Pouca	Seca	Opaca	Não	1 a 2	Irregular	Plana	Inteira	Lisa
L4	2 a 3	Ácido	Laranja	Pouca	Seca	Opaca	Sim	1 a 2	Irregular	Plana	Ondulada	Lisa
L5	2 a 3	Ácido	Amarela	Média	Aquosa	Opaca	Sim	3 a 4	Circular	Lente	Inteira	Lisa
L6	2 a 3	Ácido	Amarela	Média	Aquosa	Opaca	Sim	1 a 2	Circular	Lente	Inteira	Lisa
L7	2 a 3	Ácido	Amarela	Pouca	Seca	Opaca	Não	1	Circular	Convexa	Inteira	Lisa
L8	2 a 3	Ácido	Amarela	Pouca	Aquosa	Opaca	Sim	1	Circular	Convexa	Inteira	Lisa
L9	2 a 3	Ácido	Laranja	Média	Aquosa	Opaca	Sim	2 a 3	Circular	Convexa	Inteira	Lisa
L10	2 a 3	Ácido	Laranja	Pouca	Seca	Opaca	Sim	1 a 2	Circular	Convexa	Inteira	Lisa
L11	2 a 3	Ácido	Amarela	Pouca	Aquosa	Opaca	Não	1 a 2	Circular	Lente	Inteira	Lisa
L12	4 a 5	Ácido	Amarela	Pouca	Seca	Opaca	Sim	1	Circular	Lente	Ondulada	Lisa
L13	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Sim	2 a 3	Circular	Drop-like	Inteira	Rugosa
L14	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Sim	1 a 2	Circular	Drop-like	Inteira	Lisa
L15	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Sim	2 a 3	Circular	Drop-like	Inteira	Lisa
L16	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Sim	2 a 3	Circular	Drop-like	Inteira	Lisa
L17	2 a 3	Ácido	Amarela	Média	Aquosa	Opaca	Sim	1 a 2	Irregular	Lente	Ondulada	Lisa
L18	2 a 3	Ácido	Amarela	Pouca	Seca	Opaca	Sim	1 a 2	Irregular	Convexa	Ondulada	Lisa
L19	2 a 3	Alcalino	Amarela	Média	Aquosa	Brilhante	Não	1	Circular	Lente	Inteira	Lisa
L20	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Não	< 1	Circular	Plana	Inteira	Lisa
L21	2 a 3	Ácido	Branca	Alta	Gomosa	Brilhante	Não	1 a 2	Circular	Convexa	Inteira	Lisa

...continua...

TABELA 2, Cont.

L22	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Sim	4 a 5	Irregular	Convexa	Ondulada	Lisa
L23	2 a 3	Ácido	Amarela	Pouca	Aquosa	Brilhante	Não	1	Circular	Convexa	Inteira	Lisa
L24	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Não	1 a 2	Circular	Lente	Inteira	Lisa
L25	2 a 3	Ácido	Branca	Média	Aquosa	Brilhante	Não	3 a 4	Irregular	Lente	Ondulada	Rugosa
L26	2 a 3	Alcalino	Rosa	Pouca	Seca	Opaca	Não	1 a 2	Circular	Lente	Inteira	Lisa
L27	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Não	6 a 7	Circular	Drop-like	Inteira	Lisa
L28	4 a 5	Neutro	Branca	Pouca	Seca	Opaca	Não	< 1	Circular	Lente	Inteira	Lisa
L29	2 a 3	Ácido	Amarela	Pouca	Seca	Opaca	Sim	1 a 2	Irregular	Lente	Ondulada	Rugosa
L30	2 a 3	Ácido	Amarela	Pouca	Aquosa	Brilhante	Sim	1 a 2	Circular	Lente	Inteira	Lisa
L31	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Não	3 a 4	Circular	Convexa	Inteira	Lisa
L32	2 a 3	Ácido	Branca	Pouca	Seca	Opaca	Não	1 a 2	Irregular	Plana	Ondulada	Rugosa
L33	2 a 3	Ácido	Amarela	Média	Aquosa	Brilhante	Sim	1 a 2	Irregular	Lente	Ondulada	Lisa
L34	2 a 3	Ácido	Branca	Média	Aquosa	Brilhante	Não	3 a 4	Circular	Lente	Inteira	Lisa
L35	2 a 3	Ácido	Amarela	Média	Aquosa	Brilhante	Sim	3 a 4	Irregular	Lente	Ondulada	Lisa
L36	2 a 3	Ácido	Amarela	Média	Aquosa	Brilhante	Sim	4 a 5	Irregular	Lente	Ondulada	Lisa
L37	2 a 3	Ácido	Amarela	Pouca	Seca	Opaca	Sim	1	Irregular	Plana	Ondulada	Rugosa
P1 <sup>(5)</sup>	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Sim	4	Irregular	Convexa	Ondulada	Lisa
P2	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Sim	4 a 5	Irregular	Convexa	Ondulada	Lisa
P3	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Sim	5	Circular	Drop-like	Inteira	Lisa
P4	2 a 3	Ácido	Amarela	Média	Aquosa	Brilhante	Sim	2 a 3	Irregular	Lente	Ondulada	Lisa
P5	2 a 3	Ácido	Amarela	Média	Aquosa	Brilhante	Sim	3 a 4	Irregular	Lente	Ondulada	Lisa
P6	2 a 3	Alcalino	Branca	Pouca	Seca	Opaca	Não	2	Irregular	Lente	Ondulada	Lisa
P7	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Sim	< 1	Circular	Convexa	Inteira	Lisa
P8	2 a 3	Ácido	Amarela	Média	Aquosa	Brilhante	Sim	<1	Circular	Lente	Inteira	Lisa
P9	2 a 3	Neutro	Amarela	Média	Aquosa	Opaca	Não	1 a 2	Irregular	Lente	Ondulada	Rugosa

...continua...

TABELA 2, Cont.

P10	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Sim	7	Circular	Drop-like	Inteira	Lisa
P11	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Sim	1 a 2	Circular	Drop-like	Ondulada	Lisa
P12	2 a 3	Ácido	Amarela	Média	Aquosa	Brilhante	Sim	1 a 2	Irregular	Lente	Ondulada	Lisa
P13	2 a 3	Ácido	Amarela	Pouca	Seca	Opaca	Sim	1 a 2	Irregular	Lente	Ondulada	Lisa
P14	2 a 3	Ácido	Amarela	Pouca	Seca	Opaca	Sim	1	Circular	Lente	Inteira	Lisa
P15	2 a 3	Ácido	Amarela	Média	Aquosa	Opaca	Não	2 a 3	Irregular	Lente	Ondulada	Rugosa
P16	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Sim	2 a 3	Irregular	Convexa	Ondulada	Lisa
P17	2 a 3	Ácido	Amarela	Pouca	Seca	Opaca	Sim	1 a 2	Circular	Lente	Inteira	Lisa
P18	2 a 3	Alcalino	Amarela	Média	Aquosa	Opaca	Sim	3	Circular	Convexa	Inteira	Lisa
P19	2 a 3	Ácido	Amarela	Pouca	Seca	Opaca	Sim	1	Irregular	Lente	Ondulada	Lisa
P20	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Não	5	Circular	Convexa	Inteira	Lisa
P21	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Sim	2 a 3	Irregular	Lente	Ondulada	Lisa
P22	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Sim	1 a 2	Circular	Convexa	Inteira	Lisa
P23	2 a 3	Ácido	Amarela	Média	Aquosa	Opaca	Sim	2 a 3	Irregular	Lente	Ondulada	Rugosa
P24	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Sim	3	Irregular	Lente	Ondulada	Lisa
P25	2 a 3	Ácido	Amarela	Média	Aquosa	Brilhante	Sim	3 a 4	Irregular	Lente	Ondulada	Rugosa
P26	2 a 3	Neutro	Amarela	Média	Seca	Opaca	Sim	2 a 3	Irregular	Lente	Ondulada	Rugosa
P27	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Sim	6	Circular	Drop-like	Inteira	Lisa
P28	2 a 3	Ácido	Amarela	Média	Seca	Opaca	Sim	<1	Circular	Drop-like	Inteira	Rugosa
P29	2 a 3	Ácido	Branca	Alta	Gomosa	Brilhante	Não	9	Irregular	Lente	Ondulada	Rugosa
P30	4 a 5	Alcalino	Rosa	Pouca	Seca	Opaca	Não	1 a 2	Circular	Lente	Inteira	Lisa
P31	2 a 3	Ácido	Amarela	Pouca	Seca	Brilhante	Sim	1 a 2	Irregular	Lente	Ondulada	Lisa
P32	2 a 3	Ácido	Amarela	Pouca	Seca	Opaca	Sim	< 1	Irregular	Lente	Ondulada	Lisa
P33	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Sim	2 a 3	Circular	Drop-like	Inteira	Lisa
P34	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Sim	3 a 4	Irregular	Convexa	Ondulada	Lisa

...continua...

TABELA 2, Cont.

P35	2 a 3	Ácido	Amarela	Média	Aquosa	Brilhante	Sim	1 a 2	Irregular	Lente	Ondulada	Lisa
P36	2 a 3	Ácido	Amarela	Média	Aquosa	Brilhante	Sim	2 a 3	Irregular	Convexa	Ondulada	Lisa
P37	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Sim	2 a 3	Irregular	Convexa	Ondulada	Lisa
P38	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Sim	2	Circular	Convexa	Inteira	Lisa
P39	2 a 3	Ácido	Amarela	Alta	Gomosa	Brilhante	Sim	3 a 4	Irregular	Convexa	Ondulada	Lisa
P40	2 a 3	Alcalino	Branca	Pouca	Seca	Brilhante	Não	< 1	Irregular	Plana	Ondulada	Lisa
P41	2 a 3	Alcalino	Branca	Pouca	Seca	Opaca	Não	3 a 4	Irregular	Lente	Ondulada	Rugosa

<sup>(1)</sup> Aparecimento de colônias isoladas. <sup>(2)</sup> pH do meio de cultura. <sup>(3)</sup> Diâmetro da colônia em mm. <sup>(4)</sup> Isolados obtidos do solo de Lavras.

<sup>(5)</sup> Isolados obtidos do solo de Patos de Minas.