

**ALTERAÇÕES NA DINÂMICA DE FÓSFORO NO SISTEMA SOLO-
PLANTA PROMOVIDAS POR MICRO-ORGANISMOS
SOLUBILIZADORES**

VALIDORO BAZONI GIRO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MAIO – 2015**

**ALTERAÇÕES NA DINÂMICA DE FÓSFORO NO SISTEMA SOLO-
PLANTA PROMOVIDAS POR MICRO-ORGANISMOS
SOLUBILIZADORES**

VALIDORO BAZONI GIRO

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Fábio Lopes Olivares

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MAIO – 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 173/2015

Giro, Validoro Bazoni

Alterações na dinâmica de fósforo no sistema solo-planta promovidas por micro-organismos solubilizadores / Validoro Bazoni Giro. – 2015.

116 f. : il.

Orientador: Fabio Lopes Olivares.

Tese (Doutorado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2015.

Bibliografia: f. 91 – 114.

1. Biossolubilização de fosfato de rocha 2. Fosfato natural de Araxá 3. Ácidos húmicos 4. Biofertilizantes 5. Argissolos I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

**ALTERAÇÕES NA DINÂMICA DE FÓSFORO NO SISTEMA SOLO-
PLANTA PROMOVIDAS POR MICRO-ORGANISMOS
SOLUBILIZADORES**

VALIDORO BAZONI GIRO

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Aprovada em 08 de maio de 2015

Comissão Examinadora:

Prof. Marco Antonio Lopes Cruz
(D.Sc., Biociências e Biotecnologia) – UFRJ
(Membro)

Dr. Keiji Jindo
(D.Sc., Técnicas Avançadas em Pesquisa e Desenvolvimento) - UENF
(Membro)

Prof. Luciano Pasqualoto Canellas
(PhD., Ciência do Solo) – UENF
(Membro)

Prof. Fabio Lopes Olivares
(PhD., Ciência do Solo) – UENF
(Orientador)

Dedico este trabalho aos meus pais: Ademir Antônio Giro e Maria Bazoni Giro, pelo apoio total durante minha caminhada acadêmica, não me esquecendo de meus irmãos: Karina, Valerio e Vitor, e Marília, que acompanharam toda minha persistência e força de vontade para construção dessa tese e formação como Doutor. Ao grupo que compõe o NUDIBA (Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para a Agricultura) pelo apoio físico e psicológico. A todos que conviveram comigo na república (lembro aqui dos agregados também), sendo minha segunda família, dando o suporte como amigos de trabalho e/ou incentivando-me nos momentos tristes e felizes.

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora Aparecida pela sua intercessão, por ter me dado a vida dia a dia, saúde e forças em toda essa caminhada, desde os meus primeiros passos como estudante, até o ponto no qual cheguei!

Ao grupo do NUDIBA do CCTA/UENF, pelo apoio intelectual e técnico; Aos Professores Fábio e Luciano (UENF), Jader (UNB), Leonardo (UVV), Marihus (UFV), Lílian (UFV), aos colegas e amigos do NUDIBA pela imensa ajuda neste trabalho técnico-científico. Ao Sr. Monerat da UFRRJ pela paciência no recebimento e envio de resultados das análises de solo e vegetal. A VALE Fertilizantes pela doação dos fosfatos naturais de rocha;

Aos amigos da república *King Size* que colaboraram na implantação, acompanhamento, coleta e pós-coleta dos ensaios: Cássio, Lucas, Régis e, também, àqueles que me deram apoio através da amizade nos momentos de dificuldade, sobretudo minha família (Ademir, Maria, Karina, Valerio e Vitor) e Marília. Agradeço aos amigos de classe da turma de Agronomia 2004. Finalmente, agradeço a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, ao NUDIBA, pela oportunidade de realização deste curso; ao apoio financeiro do CNPq e CAPES pela bolsa de doutorado, bem como a FAPERJ e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para a Fixação Biológica de Nitrogênio (INCT-FBN) que viabilizaram a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Dinâmica do fósforo no sistema solo-planta: P da rocha à biomassa vegetal.....	4
2.2. Problemas do uso de fontes de P sintéticas e solúveis	8
2.3. Micro-organismos solubilizadores de P: Quem são e o que fazem?	9
2.4. Fungos, actinobactérias e bactérias (principais solubilizadores e mecanismos utilizados).....	13
2.5. Métodos de seleção dos MSP.....	15
2.6. Substâncias húmicas.....	16
2.7. Desenvolvimento de insumos biológicos.....	18
3. HIPÓTESE	24
4. OBJETIVOS	25
5. MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1. COMPARAÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE DUAS GRANULOMETRIAS DE FNA POR MPCV.....	26
5.2. AVALIAÇÃO DO FÓSFORO SOLÚVEL (Ps) EM SUBSTRATOS DISTINTOS PELA APLICAÇÃO DE UM FUNGO SOLUBILIZADOR DE P (FSP).....	28

5.3. DINÂMICA DO P _s NO TEMPO EM ARGISSOLO AMARELO INOCULADO COM FUNGO SOLUBILIZADOR DE FÓSFORO.....	30
5.4. RESPOSTA DAS PLÂNTULAS DE MILHO E TOMATEIRO À BIOINOCULAÇÃO COM SOLUBILIZADORES DE P.....	31
5.5. INFLUÊNCIA DO P INCORPORADO E LOCALIZADO EM MILHO.....	35
5.6. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MSP NA NUTRIÇÃO DE P EM PLANTAS DE MILHO (EFEITO DO INOCULANTE SIMPLES E MISTO)	36
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6.1. COMPARAÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE DUAS GRANULOMETRIAS DE FNA POR MPCV.....	41
6.2. AVALIAÇÃO DO FÓSFORO SOLÚVEL (P _s) EM DISTINTOS SUBSTRATOS PELA APLICAÇÃO DE UM FSP.....	47
6.3. DINÂMICA DO P _s NO TEMPO FRENTE À INOCULAÇÃO EM ARGISSOLO AMARELO.....	51
6.4. RESPOSTA DE PLÂNTULAS DE MILHO E TOMATEIRO À BIOINOCULAÇÃO.....	54
6.5. INFLUÊNCIA DO P INCORPORADO E LOCALIZADO EM MILHO.....	62
6.6. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MSP NA NUTRIÇÃO DE P EM PLANTAS DE MILHO.....	72
6.7. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MSP EM COMBINAÇÃO COM ÁCIDOS HÚMICOS E FNA NA NUTRIÇÃO FOSFÁTICA EM PLANTAS DE MILHO.....	79
RESUMO E CONCLUSÕES	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
APÊNDICES	115

RESUMO

GIRO, Validoro Bazoni, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Maio de 2015. Alterações na dinâmica de fósforo no sistema solo-planta promovidas por micro-organismos solubilizadores. Orientador: Professor Fábio Lopes Olivares.

A recuperação do fósforo (P) pelas raízes das plantas é muito baixa na maioria dos solos do Brasil, resultado da rápida adsorção específica pela fração mineral. A melhoria da eficiência do uso de P envolve o manejo de fontes, doses, formas de aplicação e, ainda, a compatibilização com as demandas da planta. A redução da taxa de aplicação de fertilizantes fosfatados altamente solúveis mantendo-se patamares de produtividade vegetal representa uma estratégia a ser trabalhada para manejo mais sustentável dos sistemas agrícolas. No presente trabalho foi proposta a combinação de fosfato natural de Araxá (FNA) e micro-organismos solubilizadores selecionados como alternativa complementar ao fornecimento de P para a planta. Para tal, inicialmente foi avaliada a capacidade de solubilização de FNA *in vitro* por diferentes isolados de bactérias, actinobactérias e fungos obtidos em estudos prévios do grupo. Dentre os micro-organismos testados, os fungos foram os que apresentaram os maiores potenciais de solubilização de P para compor bioinoculantes. Também foi observado que a introdução de um fungo solubilizador de P (*Curvularia* sp.) alterou a dinâmica deste elemento na fração lábil do solo, mantendo

concentrações maiores de P-lábil em solução por mais tempo. Ensaio em casa de vegetação evidenciaram o potencial destes micro-organismos em fornecer P para plantas de milho e tomateiro com a possibilidade de substituição de até 30% da dose de P recomendada para a cultura na forma de P-rocha, em substituição a fontes de P solúveis como superfosfato simples. Estudos subsequentes evidenciaram a importância da aplicação localizada de P no aumento da eficiência de uso por plantas de milho em substrato incubado com doses crescentes de P, obtido de um solo com alta capacidade de adsorção de P. Por fim, foi avaliado o uso combinado de micro-organismos solubilizadores de P (MSP) e ácidos húmicos (AH), no qual foram observados ganhos de matéria seca e aumento do conteúdo de P com o uso de 40% da recomendação agronômica na forma de P-sintético e 60% na de P-natural, resultando na redução da demanda de fertilizante sintético. Os resultados aqui obtidos, tomados em conjunto, fundamentam a possibilidade de adoção de novas abordagens tecnológicas considerando a otimização da atividade biomineralizadora de P dos micro-organismos na presença de FNA visando o desenvolvimento de um novo insumo biológico.

ABSTRACT

GIRO, Validoro Bazoni, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. May, 2015. Changes in phosphorus dynamics in the soil-plant system promoted by microorganisms solubilizing. Advisor: Professor Fábio Lopes Olivares.

The recovery of phosphorus (P) by plant roots is very low in most of Brazilian soils as a result of a fast adsorption into the mineral fraction. Increase in P-use efficiency P involves proper sources, doses, application forms, and the compatibility with the demands of the plant. The reduction of the application rate of highly soluble phosphate fertilizer sources maintaining productivity levels is a strategy to be developed for more sustainable agricultural management systems. In the present work, it was proposed the combination of Araxá's natural phosphate (ANP) with selected microorganisms as a complementary alternative for supplying P to the plant. For that, It was initially evaluated the ability of different bacteria, actinobacteria and fungi isolates to solubilize ANP in vitro. Fungi isolates had shown remarkable ability to solubilize P, being the most suitable microorganisms to compose bioinoculants. It was also observed that the inoculation with one selected P-solubilizer fungus (*Curvularia* sp.) affected the dynamics of the P-labile fraction of the element in the soil. Greenhouse experiments showed the potential of these microorganisms to provide P to corn and tomato plants with the possibility to replacing up to 30% of P dose in the form of P-rock. Subsequent studies using a

soil substrate with high P-fixation capacity showed the importance of localized application of P to increase P use efficiency in corn plants. Finally, we evaluated the combined use of P-solubilizing microorganisms (MSP) and humic acid (HA) and observed significant gains in dry matter and P content in maize plants using 40% of agronomic recommendation as P-synthetic form (superphosphate simple) and 60% in P-natural (P-rock), resulting in the suggested reduction of synthetic fertilization demands. Our findings, taken together, drive attention to new avenues to develop technological approaches considering the optimization of P-biomineralization activity using selected combination of microorganism and humic acid in the presence of FNA applied in localized form for the development of a new biological input to increase P-efficiency use in agroforest systems.

1. INTRODUÇÃO

A geração de tecnologias de base biológica na forma de inoculantes, substratos enriquecidos biologicamente e fertilizantes organo-minerais é parte fundamental de um conjunto estratégico de ações para desenvolvimento de alternativas de produção agrícola economicamente viável e ecologicamente sustentáveis. A ênfase na produção vegetal baseada em insumos biológicos diminui a dependência por produtos industrializados (p.ex., fertilizantes sintéticos), que apresentam baixa eficiência de uso pelas plantas e custos cada vez mais significativos para produção agrícola, além de também apresentarem vários efeitos adversos sobre os solos, esgotando sua capacidade de retenção de água, sua fertilidade e equilíbrio entre os nutrientes utilizados (Mohapatra et al., 2013).

Certas espécies de micro-organismos já são largamente usadas como produtos biológicos capazes de fornecer nutrientes em substituição aos fertilizantes sintéticos (Mohapatra et al., 2013). Uma parcela importante da comunidade microbiana edáfica possui a habilidade de solubilizar fosfatos inorgânicos permitindo a liberação de P-assimilável pelas plantas (Silva Filho, 1998). A capacidade de solubilização está intimamente relacionada ao tipo e ao manejo do solo (Nahas et al., 1994).

Fosfatos naturais fornecem fósforo (P) por menor custo por unidade de massa (Renner, 2008). Portanto, estudos sobre a biosolubilização de fosfatos de rocha na presença de micro-organismos com vias ao incremento da disponibilidade desse macronutriente para as culturas podem torná-los uma fonte

de P ambientalmente e economicamente atraente para o processo produtivo (Van Straaten, 2002).

Em solos intemperizados, a adsorção de P pode chegar a $11.500 \text{ kg ha}^{-1}$ de P_2O_5 , com pelo menos 50% fixados em forma não lábil (Ribeiro et al., 1999). Além disso, a recuperação pelas culturas chega somente a 20% do P aplicado em um ano agrícola (Fernandes, 2006). Assim, para atender as demandas de P pela cultura, são exigidas quantidades expressivas de fertilizantes fosfatados com alta solubilidade em água, estes industrialmente acidulados (p.ex. superfosfato simples, superfosfato triplo, fosfato monoamônico (MAP) e fosfato diamônico (DAP)). Os impactos econômicos e a baixa eficiência de uso de P por fontes altamente solúveis impõem a proposição de alternativas mais sustentáveis para o fornecimento de P para as plantas.

Embora fontes como fluorapatita de Araxá ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \text{F}_2$), com cerca de 339 g kg^{-1} de P_2O_5 (Vale Fertilizantes, 2011), sejam pouco solúveis em água (Busato et al., 2005), micro-organismos solubilizadores de fósforo (MSP), representados principalmente por bactérias e fungos (Son et al., 2006) são capazes de acidificar o meio, liberando ácidos orgânicos (AO) específicos e/ou secretando H^+ , na presença do P insolúvel (Pi), disponibilizando-o em solução (Illmer et al., 1995). A adição de MSP ou o manejo de suas populações tem sido sugerido como forma de substituir ou diminuir o uso de fertilizantes fosfáticos solúveis, mediante um melhor aproveitamento dos fosfatos naturais existentes ou adicionados ao solo e dos formados pela aplicação de fontes solúveis (Kim et al., 1998).

Neste trabalho é proposto a combinação de fosfato natural de Araxá (FNA) e micro-organismos selecionados como alternativa complementar ao fornecimento de P para a planta. Assim, a partir de uma coleção de micro-organismos (bactérias, actinobactérias e fungos) isolados de vermicompostos produzidos no Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para Agricultura (NUDIBA), foram selecionados aqueles com maior capacidade de solubilização de P utilizando como fonte o FNA. Os isolados de maior potencial foram testados em formulações simples ou mistas para compor bioinoculantes e ensaios em casa de vegetação evidenciaram o potencial destes micro-organismos em fornecer P para plantas de tomate e milho. Ademais, utilizando como substrato um solo com reconhecida capacidade de fixação de P, foi avaliada a dinâmica de P em solução na presença

e ausência de micro-organismos e fontes de P, bem como a forma de aplicação de P no solo. Por fim, a proposição de formulação de bioinoculantes com MSP na presença de ácidos húmicos revelou-se uma alternativa importante para o aperfeiçoamento das respostas da planta a atividade biomineralizadora de P e seu aproveitamento pela planta. Estes resultados tomados em conjunto, associam novas abordagens tecnológicas para otimização da atividade biomineralizadora de P dos micro-organismos na presença de FNA e se constituíram na base para o desenvolvimento de um novo insumo biológico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Dinâmica do fósforo no sistema solo - planta: P da rocha à biomassa vegetal

Além da necessidade básica de P na nutrição de plantas, existem outras três razões pelas quais a aplicação de P é um dos principais temas de pesquisa agrícola: os preços dos fertilizantes dispararam nos últimos tempos, tornando fertilizantes fosfatados fora do alcance de muitos agricultores em países em desenvolvimento; uso do fosfato de rocha de alta qualidade (pouco grau de impureza) em outras indústrias fornecendo produtos mais caros, tais como conservantes de alimentos, agentes anticorrosivos, cosméticos, cerâmica, fungicidas, tratamento de água e metalurgia; e, por fim, as fontes de fosfato de alta qualidade estão sendo exauridas rapidamente com expectativa de esgotamento em menos de 100 anos. Conseqüentemente a pesquisa agrícola deve focar em: 1) Rocha fosfática de baixo conteúdo de fósforo (9-11% de P_2O_5 ou menos) como uma fonte futura de fertilizante, visto ser um mineral mais abundante e de distribuição mundial e 2) Outras fontes de fosfato, tais como os derivados de estruvita advindos do tratamento de águas residuais (Antoun, 2012).

O cenário acima é agravado pelo comportamento predominante do P no solo que está principalmente sob a forma de fosfatos insolúveis (Abd - Alla, 1994). Ademais, uma grande parte dos fertilizantes fosfatados aplicados aos solos é fixada em formas muitas vezes não disponíveis às plantas. Portanto, a maioria

dos solos contém grandes quantidades de reservas de fósforo não disponível (Rodriguez et al., 1999).

O P é um dos macronutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos (Ehrlich, 1990). Depois do nitrogênio (N) é o elemento químico mais limitante para o crescimento das plantas (Arcand e Schneider, 2006). Normalmente está presente em níveis de 400 - 1200 mg dm³ de solo (Fernández e Novo, 1988) representando cerca de 0,2% da massa seca da planta (Schachtmam et al., 1998). Este é parte integrante de diferentes processos celulares de um organismo vivo e tem papéis definidos no metabolismo da planta, tais como a divisão celular, o desenvolvimento, a fotossíntese, a glicólise, o transporte de nutrientes dentro da planta, a transferência de características genéticas de uma geração para outra, e a regulação das vias metabólicas. A célula pode absorver várias formas de P, mas as formas aniônicas predominantes são HPO_4^{2-} ou H_2PO_4^- (Theodorou e Panxton, 1993; Taiz e Zeiger, 2013). Evidências sugerem que esses íons são transportados nas células vegetais e fúngicas especificamente por H^+ do tipo simporte, um transporte ativo (Taiz e Zeiger, 2013). As plantas obtêm esses ânions a partir da solução do solo na forma de fosfato inorgânico oriunda de duas fontes: (a) produzido pelo intemperismo das rochas ou (b) como pela mineralização de formas de P-orgânico derivado da decomposição vegetal, animal e/ou microbiana. Formas minerais de fósforo no solo são representadas por minerais primários (secundários), tais como a apatita, hidroxiapatita, oxiapatita e fluorapatita, sendo a principal característica destes minerais, a sua insolubilidade, porém, sob condições adequadas, podem ser solubilizados e tornam-se disponíveis para as plantas e os micro-organismos.

O P mineral também pode ser encontrado associado à superfície de óxidos hidratados de Fe, Al e Mn, que são pouco solúveis e assimiláveis (Behera et al., 2013).

Um segundo componente essencial de P no solo é constituído pela matéria orgânica. Formas orgânicas de P podem constituir com 30 a 50% do P total na maioria dos solos, embora variem em uma faixa ampla de muito baixo a muito elevado, ou seja, de 5 a 95% do total, respectivamente (Paul e Clark, 1988). O P orgânico no solo está em grande parte na forma de inositol fosfato (fitato). É sintetizado por micro-organismos e plantas e é o mais estável das formas

orgânicas de P no solo, sendo responsável por até 50% do total de P orgânico (Anderson, 1980; Harley e Smith, 1983). Outros compostos fosfáticos orgânicos nos solos estão na forma de fosfomonoésteres e diésteres, incluindo fosfolípidios, ácidos nucleicos e fosfotriésteres. Muitos destes compostos fosfáticos são materiais de elevada massa molecular que primeiro devem ser bioconvertidos a qualquer fosfato iônico solúvel (HPO_4^{2-} , H_2PO_4^-), ou de baixa massa molecular para ser assimilado pela célula vegetal (Goldstein, 1994).

O ciclo do P na biosfera pode ser descrito como "aberto" ou "sedimentar", porque não existe nenhum intercâmbio com a atmosfera. Os micro-organismos desempenham um papel central no ciclo de P natural. Este ciclo ocorre por meio da oxidação e da redução de compostos de P, nos quais as reações de transferência de elétrons entre os estádios de oxidação variam de fosfina (-3) a fosfato de (+5). Mecanismos e bioquímicos dessas transformações ainda não são completamente compreendidos (Ohtake et al., 1996). A concentração de P solúvel no solo é normalmente muito baixa, em níveis de 1 mg kg^{-1} (Goldstein, 1994).

O P está presente nas plantas como componente de biomacromoléculas tais como as encontradas na classe dos ácidos nucleicos, fosfolípidios e na forma de ATP (Marschner, 1995). A principal fonte de P para plantas é o Pi, também denominado de extraível, trocável, lábil ou ainda disponível (P-biodisponível) (Salcedo e Medeiros, 1995). Na maioria dos ecossistemas naturais de crescimento vegetal é limitada a disponibilidade de Pi (Smith et al., 2003).

Os principais processos responsáveis pela manutenção do equilíbrio catiônico e aniônico frente às mudanças de pH na rizosfera são:

- 1) A extrusão de H^+ e OH^- ou;
- 2) A acumulação e degradação de ácidos orgânicos (Haynes, 1990).

A geração de acidez ou de alcalinidade na rizosfera é diretamente influenciada pelas raízes das plantas, e causada por desbalanços na absorção de nutrientes catiônicos e aniônicos. A fim de manter a eletroneutralidade na interface solo-raiz, a captação dos ânions P (PO_4^{2-} , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}), pode ser estequiometricamente balanceada pela excreção ativa de OH^- , do mesmo modo que a absorção de um cátion (por exemplo, NH_4^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+) é equilibrada pela excreção de H^+ (Haynes, 1990). A bioquímica da manutenção do pH no interior das células, pode ser modificada por ácidos orgânicos fortes ou

fracos por meio de mecanismos de carboxilação/ descarboxilação (Davies, 1986). A quantidade de ácidos orgânicos excretados para solubilizar P quelando íons metálicos governa a imobilização ou geração de complexos solúveis com P ou ambos (Neumann et al., 2000). Tais alterações no pH rizosférico podem ocorrer em resposta a condições nutricionais adversas, tais como deficiência de P (Haynes, 1990).

O conteúdo de P na geosfera é geralmente elevado, mas a sua disponibilidade para as plantas é muitas vezes limitada (Anwar e Jalaluddin, 1999). A rocha fosfatada é o maior reservatório de P na natureza. No entanto, mesmo um fosfato de rocha mais puro possui baixa solubilidade e pode não ser recomendado para uso direto nas culturas em algumas situações tais como de cultivo intensivo de variedades precoces. As técnicas tradicionais para aumentar a quantidade de P solúvel em fosfato de rocha não são amigáveis do ponto de vista ecológico e energético e, portanto, novas técnicas são necessárias (Vanlauwe et al., 2000). Um caminho a ser explorado pode ser resultado da intensificação do uso de processos microbianos na forma de inoculantes microbianos em processos de bioaugmentação. Por exemplo, Richardson et al. (2009) sugeriram o uso de um inoculante específico para melhorar a eficiência de fertilizantes fosfatados, capaz de melhorar a disponibilidade de P no solo, ou a absorção desse elemento pelas raízes.

Os impactos positivos do uso de inoculantes contendo solubilizadores de P podem ser melhor percebidos em países em desenvolvimento onde a ausência de P disponível para as culturas é mais aguda e a rocha fosfática utilizada como fertilizante é majoritariamente constituída de P-insolúvel, este quase indisponível para o crescimento das plantas (Antoun, 2012). Essa situação implica na deficiência de P, que em todo mundo diminui a produtividade agrícola em mais de dois bilhões de hectares (Oberson et al., 2001, Daniels et al., 2009).

O conteúdo médio de P em solos é de 0,05% (m/m), mas apenas 0,01% do P total está disponível potencialmente para as plantas (Zou et al., 1992). As formas indisponíveis ocorrem na forma de um grande número de complexos químicos solúveis que se ligam ao cálcio, ferro e alumínio, gerando, assim, sais de fosfato insolúveis presentes no solo, e convertidos em formas indisponíveis com baixa solubilidade (P- não lábil). Assim, quando formas solúveis de P são aplicadas como fertilizante, estas são facilmente precipitadas, resultando em

formas insolúveis, tais como: CaHPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, FePO_4 e AlPO_4 e resultando em baixa eficiência de absorção pelas plantas.

A adsorção de fósforo é um processo pelo qual o fosfato biodisponível é removido da solução e retido à superfície de minerais do solo (Do Carmo Harta e Torrente, 2007). A adsorção do fosfato é particularmente forte em complexos de esfera interna com óxidos de ferro e de alumínio hidratados (por exemplo, goetita) que predominam em solos altamente intemperizados dos trópicos (Jackman et al., 1997; Onweremadu, 2007). Solos derivados de materiais vulcânicos (origem ígnea) - alofana, ferridrita, e goetita são responsáveis pela forte adsorção de P_i a partir da solução do solo (Jackman et al., 1997; Vistoso et al., 2012).

2.2. Problemas do uso de fontes de P sintéticas e solúveis

Muitos estudos têm sido realizados para substituir ou reduzir o uso de agroquímicos na agricultura moderna em função de seus efeitos negativos sobre o meio ambiente (Adesemoye e Kloepper, 2009; Dadhichet et al., 2011). O aumento da população humana pressiona para uma maior produção de alimentos, que por sua vez, conduz a uma maior demanda por fertilizantes e pesticidas sintéticos (Berg, 2009; Hamuda e Patko, 2010). Tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento necessitam de grande quantidade destes fertilizantes para atender as demandas contemporâneas e futuras de alimentos.

Cerca de 50% dos fertilizantes sintéticos são usados para a produção de cereais (trigo, arroz e milho), e 50% de todos os fertilizantes são consumidos na China, EUA e Índia (Roy et al., 2006). Somado a isso, o Brasil importa aproximadamente 50% dos fertilizantes fosfáticos aplicados às culturas agrícolas (MF-SEAE, 2011), portanto, é importante minimizar a dependência dessa fonte nutricional.

O Brasil é o sexto maior produtor mundial de fosfato, com cerca de 6,2 milhões de toneladas de concentrado em 2011. Isto representa 3% da produção mundial estimada em 191 milhões de toneladas. Com os novos investimentos previstos, a produção deverá alcançar 11,6 milhões de toneladas anuais para os próximos cinco anos. A produção mundial de rocha fosfática está concentrada em sete países, destacando-se China, Estados Unidos, Marrocos, Rússia, Tunísia,

Brasil e Jordânia. A China é a líder em produção, com 72 milhões de toneladas (USGS – 2012).

O Brasil tem 310 milhões de toneladas em reservas de minério contido, localizadas principalmente em Minas Gerais (68%), seguido de Goiás (14%), São Paulo (6%) e outros estados com 12% (USGS – 2012). O Brasil, é ainda, o 4º consumidor mundial de fertilizantes, ficando atrás apenas da China, da Índia e dos Estados Unidos. A importação em 2011 cresceu vertiginosamente, principalmente, dos produtos intermediários de P, que saltou de 1,2 milhão de toneladas em 2010 (correspondente a US\$ 561,3 milhões), para 2,1 milhões de toneladas em 2011, com um custo de US\$ 1,3 bilhão (USGS – 2012).

Nas últimas décadas, o uso intenso de insumos sintéticos na agricultura desencadeou inúmeros problemas ambientais. Entre eles, a poluição da água, o declínio na qualidade do produto colhido e da fertilidade do solo (Garshashi et al., 2014). Usa-se cada vez mais fertilizantes sintéticos, conseqüentemente, a poluição ambiental se agrava (Donner & Kucharik, 2008), prejudicando a saúde dos organismos vivos envolvidos na cadeia trófica (Pineda, 2014). Gerando, por conseguinte, o excesso de aplicação/depósito de fertilizantes fosfáticos nos solos cultivados (Omar, 1998). A maior parte dos fosfatos é rapidamente transformada em formas insolúveis (Reddy et al., 2002) ou é lavada e/ou lixiviada pelas águas sobre ou dentro do solo. O aumento das aplicações regulares resulta, infelizmente, na poluição do ambiente agrícola (Shigaki et al., 2006). Por dissolução e carreamento, o ambiente urbano também pode ser afetado. Portanto, a necessidade de desenvolvimento de tecnologias mais econômicas e ambientalmente corretas para resolver este problema é cada vez maior (Vassilev & Vassileva, 2003). Formas alternativas para resolver estas questões ambientais devem ser criadas para uma agricultura mais alicerçada em processos biológicos com práticas agrícolas sustentáveis (Zarabi et al., 2011; Agamy et al., 2013).

2.3. Micro-organismos solubilizadores de P: Quem são e o que fazem?

Os micro-organismos estão envolvidos em uma gama de processos que afetam a transformação de P no solo, sendo assim, parte integrante do ciclo de P. Particularmente, a microbiota do solo é eficaz na liberação de P das formas inorgânicas e orgânicas por meio de processos de solubilização e mineralização, respectivamente (Hilda e Fraga, 1999).

Recentemente, MSP tem atraído a atenção de agricultores como inoculante de solo com a finalidade de melhorar o crescimento e a produtividade de uma dada cultura (Young, 1994; Fasim et al., 2002). Dentre os grupos ativos na solubilização de P estão as bactérias promotoras de crescimento (BPCV), as quais promovem o crescimento da planta por diferentes mecanismos relacionados à biofertilização e bioestimulação (Glick, 1995). Sua habilidade de solubilização de P é considerada um dos papéis mais importantes associados à nutrição de P pela planta. Evidências da presença de comunidades microbianas solubilizadoras de P na rizosfera vegetal remontam ao ano de 1903 (Khan et al., 2007). Neste contexto, bactérias e fungos são amplamente conhecidos como capazes de solubilizar P em processos de biomineralização. As bactérias representam o domínio biológico mais diverso, embora os fungos sejam mais eficazes na solubilização de P (Alam et al., 2002). Da população microbiana total presente na fração culturável, as bactérias solubilizadoras de P (BSP) constituem de 1 a 50%, enquanto fungos solubilizadores de P (FSP) representam somente 0,1 a 0,5% em potencial de solubilização (Chen et al., 2006). A rizosfera representa o nicho mais abundante para abrigar comunidades de BSP em comparação com o solo não rizosférico e o ambiente endofítico (Katznelson et al., 1962; Raghu & MacRae, 1966). Os fluxos de carbono lábil na forma de exsudatos, secreções e células destacadas sustentam a atividade biomineralizadora dos MSP neste compartimento de interface solo-planta (Vasquez et al., 2000).

Normalmente, um grama de solo fértil contém 10^1 a 10^{10} bactérias, e sua biomassa viva pode exceder $2,0 \text{ Mg ha}^{-1}$. As BSP são onipresentes com variação de formas e população em diferentes tipos de solo. A população de BSP depende de diferentes propriedades do solo (propriedades físicas e químicas, matéria orgânica e teor de P). Populações maiores são encontradas em solos agrícolas e pastagens (Yahya e Azawi, 1998). Bactérias tais como *Bacillus megaterium*, *B. circulans*, *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. sircalmous*, *Pseudomonas striata*, e *Enterobacter* sp. são consideradas espécies solubilizadoras mais importantes (Subbarao, 1988; Kucey et al., 1989). Estirpes ectorizosféricas de *Pseudomonas* e *Bacillus*, rizóbios endosimbióticos (Iguar et al., 2001), bem como gêneros *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium* e *Erwinia* têm a capacidade de solubilizar compostos de fosfato inorgânico insolúvel, tais como: fosfato di e tricálcico, hidroxapatita e fluorapatita

(Goldstein, 1986). Além do reino Monera, fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* são reconhecidamente solubilizadores de P (Whitela, 2000). Estes fungos convertem P não disponível em formas disponíveis, produzindo substâncias promotoras do crescimento vegetal.

Os MSP são capazes de solubilizar fosfato inorgânico a partir de diferentes fontes de P-mineral tais como fosfatos di e tri-cálcicos, bem como fosfatos de rocha apresentando, portanto, potencial para modulação do crescimento das plantas pela melhoria da nutrição de P (Vessey, 2003). A biodiversidade microbiana no solo desempenha um papel significativo no metabolismo de moléculas complexas, disponibilizando nutrientes às plantas e oferecendo vias bioquímicas, antibióticos, metabólitos e outras moléculas úteis para incremento da produtividade agrônômica para qual o conteúdo e a qualidade da matéria orgânica do solo (MOS) são essenciais para a sustentação da diversidade e atividade de micro-organismos benéficos em ambientes agrícolas mais conservacionistas.

As MSP podem aumentar a disponibilidade de P em solos por meio de diferentes mecanismos que envolvem a transformação de formas insolúveis do fosfato em formas solúveis. O ortofosfato (PO_4^{3-}) é a forma mais abundante no solo e, pode ser absorvido diretamente pelas raízes ou raízes colonizadas por MSP (Vasquez, 2000). Estes são capazes de transferir o P às plantas. Todavia, há uma escassez de informações sobre detalhes deste processo. No entanto, o mecanismo principal da solubilização de P-mineral é a liberação de metabólitos microbianos, principalmente ácidos orgânicos (Whitelaw, 2000; Lin et al, 2006), que, por dissociação incrementam a atividade de H^+ no meio reacional. Os grupamentos hidroxila e carboxila são capazes de quelar os cátions ligados ao fosfato, convertendo assim formas de P indisponível em formas solúveis (Kpombrekou & Tabatabai, 1994; Chen et al., 2006). Outros mecanismos atuantes na solubilização de P resultam da atividade de enzimas fosfatases ou, ainda, síntese de agentes quelantes (Rodríguez e Fraga, 1999).

Estes ácidos orgânicos de baixa massa molecular são produzidos majoritariamente pelos micro-organismos encontrados na rizosfera. A concentração de ácidos orgânicos de cadeia curta na solução do solo é geralmente baixa, variando de 1 a 50 mM (Strobel, 2001). As vias metabólicas, regulação gênica e produção dessas substâncias orgânicas por MSP não foram

completamente elucidadas, sendo necessário gerar mais conhecimento sobre este assunto.

Muitos ácidos orgânicos são eficazes na redução da adsorção ou dessorção de Pi (Guppy et al., 2005). De acordo com Hue (1991) e Bolan et al. (1994), a eficácia na diminuição da adsorção de Pi pode ser classificada como: tricarbóxicos > dicarbóxicos > ácidos monocarbóxicos. Estes ácidos orgânicos, tais como cítrico, oxálico, glucônico, málico, entre outros, são produzidos pelas raízes (Nwoke et al., 2008; Li et al., 2009) e pelos micro-organismos do solo (Puente et al. 2009; Bashan et al. 2012). Portanto, os micro-organismos edáficos podem remobilizar o Pi da superfície das partículas reativas dos solos, tornando-o mais acessível em solução (Hoberg et al. 2005; He et al. 2002).

Em bactérias gram-negativas os ácidos cetoglucônico e glucônico são os principais ácidos envolvidos na solubilização de Pi (Panhwar et al., 2011). Esta acidificação também está associada com a liberação de compostos orgânicos na forma de sais como citrato, oxalato, lactato e gluconato, produzidos por muitos micro-organismos (Deubel & Merbach, 2005). A extrusão de prótons pelas raízes pode ser acompanhada pela liberação de ânions de ácidos orgânicos, o que contribuiu para a mobilização e absorção de P pelas plantas de trigo inoculadas com *Bacillus* sp. (Öğüt et al., 2011).

O fenômeno de dessorção de Pi por ânions orgânicos é amplamente aceito como um mecanismo para aumentar a disponibilidade de Pi na rizosfera. Isto ocorre na superfície do solo por troca de ligantes (Sato & Comerford, 2006; Bashan et al., 2012). No entanto, a concentração destes ácidos orgânicos/ânions é relativamente baixa na maioria dos solos porque eles podem ser precipitados com os cátions livres (por exemplo, Al^{3+} , Fe^{3+} e Ca^{2+}), adsorvidos na superfície de minerais do solo, e/ou utilizados como fontes de carbono pelos micro-organismos do solo (Jones et al., 2003). Assim, a microbiota da rizosfera competente, capaz de produzir ácidos orgânicos ou ânions, pode desempenhar um papel importante no manejo da deficiência de Pi em solos de alta capacidade de adsorção, como a maioria dos solos tropicais altamente intemperizados.

Baldotto et al. (2011) aproveitaram o papel dos ácidos orgânicos para aumentar a disponibilização do P em um substrato contendo uma fonte de P insolúvel em água. A absorção e o acúmulo do P, ao lado de um maior crescimento e maior massa vegetal, podem ser conseguidos pela combinação de

fosfato natural com ácidos orgânicos. Tal eficiência agrônômica pode ser atribuída ao aumento da solubilidade de P decorrente da aplicação de ácidos orgânicos (Baldotto et al., 2011).

Reconhecendo as potencialidades dos MSP na biodisponibilização de P para as plantas (Antoun, 2012) é importante desenvolver práticas de manejo que possam melhorar a disponibilidade e a eficiência de uso de P no solo (Oberson et al., 2010). Fontes recalcitrantes podem ser disponibilizadas em solução via processos de acidificação e secreção de ácidos orgânicos por micro-organismos, com impactos positivos sobre a absorção de P e sobre o crescimento de milho (Hameeda et al., 2008).

A biossolubilização de fosfatos de rocha para incremento da disponibilidade pode torná-los uma fonte de P ambientalmente e economicamente atraentes no processo produtivo (Van Straaten, 2002) fornecendo P por menor custo por unidade de massa. A solubilização da rocha granulada pelos micro-organismos diminui o custo energético de fabricação de fertilizantes fosfatados a partir de reações com o enxofre.

Devido à capacidade de solubilização de P em fontes insolúveis inorgânicas os MSP têm sido propostos para formulação de bioinoculantes para aumentar a absorção de P e a produtividade das plantas cultivadas (Hameeda et al., 2006b; Chen et al., 2008).

2.4. Fungos, actinobactérias e bactérias (principais solubilizadores e mecanismos utilizados)

A pesquisa indica que MSP podem ser empregados para substituir em até 50% as fontes sintéticas de P aplicadas aos solos, resultando em redução da demanda por fontes aciduladas de P. Existem vários micro-organismos do solo que convertem formas de P insolúveis em formas solúveis (Raju e Reddy, 1999) pela acidificação e complexação competitiva de cátions na superfície mineral (Bianco e Defez, 2010; Mohapatra et al., 2013), aumentando a disponibilidade de P em solução e fornecendo de 10 a 20% do P requerido pelas culturas.

A biodiversidade microbiana da rizosfera capaz de produzir e secretar metabólitos ácidos está diretamente relacionada ao aumento da disponibilidade de P para as plantas. As análises dos sobrenadantes de cultivo de muitos MSP demonstraram a produção de ácido mono, di e tri-carboxílicos. A correlação direta

entre quedas de pH e aumento na disponibilidade de P do meio de cultura foi comprovada (Agnihotri, 1970; Liu et al., 1992, citados por Behera et al., 2013).

Ácidos inorgânicos tais como sulfúrico (Hopkins e Whiting, 1916, citado por Behera et al., 2013), nítrico e carbônico envolvem outros mecanismos de solubilização de P. No entanto, a eficácia e a sua contribuição para a liberação de P à solução do solo parece ser menor do que a produção de ácidos orgânicos (Vázquez, 1996), já que os ânions dissociados se ligam aos óxidos de ferro e alumínio, reduzindo a fixação de P.

Quadro 1. Produção de ácidos orgânicos por MSP*

Ácidos orgânicos	Estirpes bacterianas e/ou fúngicas	Referências
Ácido 2-cetoglucônico	<i>Rhizobium leguminosarum</i> , <i>R. meliloti</i> , <i>Bacillus firmus</i> .	(Halder et al., 1990)
Ácido acético	<i>Bacillus liqueniformis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> .	(Illmer e Schiner, 1992; Illmer e Schiner, 1982)
Ácido cítrico	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Serratia marcescens</i> .	(Chen et al., 2006)
Ácido glucônico	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Erwinia herbicola</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i> .	(Illmer e Schiner, 1992; Liu et al., 1992; Goldstein et al., 1993)
Ácido isobutírico	<i>Bacillus liqueniformis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> .	(Illmer e Schiner, 1992; Banik e Day, 1982)
Ácido isovalérico	<i>Bacillus liqueniformis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> .	(Illmer e Schiner, 1992; Banik e Day, 1982)
Ácido láctico	<i>Bacillus liqueniformis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>Escherchia trendii</i> .	(Illmer e Schiner, 1992; Banik e Day, 1982)
Ácido propiônico	<i>Bacillus megaterium</i>	(Chen et al., 2006)

*Adaptado de Behera et al., 2013.

A secreção de ácidos orgânicos não parece ser o único mecanismo operante na solubilização de P (Asea et al., 1988; Halder et al., 1990). A solubilização do fosfato de cálcio tem sido relatada mesmo na ausência de ácidos orgânicos em solução (Illmer e Schiner, 1992). Em análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do meio de cultura condicionado por *Pseudomonas* não foram detectados ácidos orgânicos, a despeito da comprovada solubilização de P (Illmer e Schiner, 1995). Dessa maneira, a acidificação do meio pode ter sido dada pela excreção de H⁺ proveniente da absorção de NH₄⁺ (Parks et al., 1990) e da produção de H₂CO₃ da respiração (Juriank et al., 1986, citado por Behera et al., 2013) evidenciando como mecanismos alternativos de solubilização do fosfato mineral. Esses pesquisadores também observaram uma

rápida redução do pH e aumento da disponibilidade de Pi no meio durante os três primeiros dias de incubação.

A utilização de glicose parece estar diretamente correlacionada com a queda do pH. A atividade dos MSP mostrou ser devido à produção de ácido glucônico a partir da glicólise realizada no espaço periplasmático (Goldstein e Liu, 1987; Liu et al., 1992, citado por Behera et al., 2013), sugerindo que tal ácido pode levar à liberação de H⁺ que, finalmente, solubiliza os fosfatos insolúveis (Goldstein, 1994).

2.5. Métodos de seleção dos MSP

O método mais empregado na seleção de MSP é baseado na detecção visual de zonas claras ao redor das colônias dos micro-organismos previamente isolados e inoculados em meios contendo fontes de fosfatos minerais insolúveis principalmente fosfato tricálcico (Gupta et al., 1994). Este método pode ser considerado confiável para o isolamento e a caracterização preliminar dos MSP (Goldstein e Liu, 1987; Illmer e Schinner, 1995). Um procedimento melhorado desenvolvido por Gupta et al. (1994) usa o meio de cultura pikovasky contendo azul de bromofenol, no qual halos coloridos amarelos são formados em torno das colônias em resposta à queda de pH decorrente da liberação de ácidos orgânicos e outras fontes de acidez responsáveis pela solubilização de fosfato.

Em alguns casos, têm sido observados alguns resultados contraditórios com a detecção de halo em placa e a solubilização de P em meio de cultura líquido. Alguns pesquisadores relataram que muitos isolados mesmo não produzindo qualquer halo visível na placa com ágar poderiam solubilizar vários tipos de fosfatos inorgânicos insolúveis em meio líquido (Louw e Webley, 1959, citado por Behera et al., 2013). Talvez a variação das taxas de difusão dos diferentes ácidos orgânicos segregados por um organismo pode ser a causa desta discrepância (Johnson, 1959, citado por Behera et al., 2013).

Ademais, a seleção de MSP ditos eficientes pelo método do halo pode não ser apropriada em algumas circunstâncias, uma vez que é empregado nos trabalhos *in vitro* fosfatos tricálcicos como fontes de P (mais fáceis de serem acessadas pelos micro-organismos). Nos solos dos trópicos, ácidos e em elevado estágio de intemperismo, o P inorgânico encontra-se nas formas de fosfatos de ferro e alumínio e em reservas de apatitas, mais difíceis de serem solubilizadas

via mineralização biológica do P (Antoun, 2012; Bashan et al., 2012). Logo em um programa de seleção de MSP estas deveriam ser as fontes utilizadas.

Tendo em vista que a produção de ácidos orgânicos representa o mecanismo majoritário de solubilização de P, sua determinação qualitativa/quantitativa por CLAE é relevante para o avanço das pesquisas com a identificação de ácidos orgânicos em amostras de interesse (Chen et al., 2006). Já a detecção qualitativa pode ser feita por cromatografia em camada fina (TLC) (Joveva et al., 1991). Ácidos orgânicos também podem ser detectados de forma qualitativa e quantitativa, por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (Sulbaran et al., 2008).

2.6. Substâncias húmicas

A maior parte do carbono orgânico da superfície terrestre encontra-se na forma de substâncias húmicas (SH) (Hayes e Malcon, 2001). De acordo com a sua solubilidade, as SH podem ser fracionadas em: ácidos húmicos (AH), solúvel em álcali e insolúvel em ácido; ácidos fúlvicos (AF), solúvel em álcali e solúvel em ácido; e humina, insolúvel em álcali e ácido (Kononova, 1982).

A estrutura macromolecular e a natureza polimérica das SH foram revistas após trabalhos envolvendo métodos químicos distintos, tais como cromatografia líquida de alto desempenho por exclusão de tamanho (Piccolo, 2002), ressonância nuclear magnética (Simpson, 2002), espectroscopia de massa (Piccolo e Spiteller, 2003; Saiz-Jimenez et al., 2006) e métodos quimiométricos (Peuravuori, 2005).

A fração solúvel da matéria orgânica humificada pode ser considerada como um complexo supramolecular que contém vários compostos heterogêneos que têm uma massa molecular relativamente baixa, mas são dinamicamente associados por ligações fracas como interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (Sutton e Sposito, 2005), estas facilmente rompidas por ácidos orgânicos aplicadas em baixas concentrações.

As SH condicionam a maior parte das propriedades químicas, físicas e biológicas do solo e, além disso, afetam diretamente o crescimento das plantas (Vaughan e Malcom, 1985). O vermicomposto é uma fonte naturalmente enriquecida com AH e, além disso, também produz SH com elevada atividade biológica (Façanha et al., 2002; Canellas et al., 2002; Quaggiotti et al., 2004;

Canellas et al., 2006; Rodda et al., 2006a,b; Zandonadi et al., 2007). Essas substâncias têm atividades similares às dos hormônios vegetais e aumentam a absorção de nutrientes e o crescimento vegetal (Vaughan e Malcolm, 1985; Chen e Aviad, 1990; Nardi et al., 2002), sugerindo sua aplicação a campo como agente promotor do crescimento vegetal.

Os ácidos húmicos pelo uso combinado com bactérias promotoras do crescimento vegetal, podem atuar também no aumento da população de micro-organismos benéficos associados à planta e, conseqüentemente, no incremento dos efeitos benéficos sobre a planta hospedeira (Marques Júnior, 2006), além de não interferirem negativamente no crescimento e na atividade, estimulando a colonização das plantas pela microbiota nativa (Conceição et al., 2009).

A bioatividade das substâncias húmicas é em parte explicada por seus efeitos sobre a H⁺-ATPase da membrana plasmática, na qual moléculas bioativas oriundas do arranjo supraestrutural dos ácidos húmicos modulam a atividade desta enzima. Esta estimulação promove o abaixamento do pH apoplástico, o qual dispara uma ação orquestrada de afrouxamento das fibrilas de celulose da parede e incremento da pressão de turgescência pelo movimento de entrada de água no vacúolo celular, resultando em expansão celular e, por conseguinte, (Hager et al., 1991) explica a promoção do crescimento do tecido radicular. Ademais, alterações na arquitetura das raízes são percebidas pela indução de um número maior de raízes laterais, evidenciado pelo aumento do número de sítios de mitose e na proporção de raízes finas, já demonstrado para plântulas de milho (Canellas et al., 2002; Zandonadi et al., 2007) e *Arabidopsis* (Dobbss et al., 2007). Estas alterações anatômicas e bioquímicas podem beneficiar o estabelecimento de micro-organismos benéficos nas raízes pelo aumento do número de pontos de infecção (Cerigioli, 2006; Canellas e Olivares, 2014).

A ação promotora de crescimento vegetal e acúmulo de nutrientes nas plantas pelos AH aplicados em baixas doses (Baldotto et al., 2011) se dá através da fragmentação supraestrutural deste no ambiente acidificado da rizosfera, gerando subunidades potencialmente capazes de alterar o metabolismo celular, por meio da ativação de H⁺ ATPases da membrana plasmática de células de raiz (Piccolo, 2001; Façanha et al., 2002; Canellas et al., 2006). Além dos efeitos bioativos e sua relação com a modulação da interação estrutural entre bactérias e plantas, ácidos húmicos têm sido considerados excelentes veículos e aditivos

para introdução de micro-organismos benéficos na forma de inoculantes no sistema solo-planta ou na forma de spray foliar na parte aérea, resultando em benefícios sobre as taxas de sobrevivência e atividade microbiana (Canellas e Olivares, 2014)

2.7. Desenvolvimento de insumos biológicos

À medida que a população mundial continua a aumentar a um ritmo acelerado, as demandas colocadas sobre a agricultura para oferta futura de alimentos serão um dos maiores desafios a serem superados. Para tanto, será necessário um grande esforço direcionado a melhor compreensão da complexidade do agrossistema quanto aos processos e interações que regem seu equilíbrio com foco no sistema biológico do solo (Walpola e Yoon, 2012).

Os micro-organismos contribuem direta e indiretamente para o equilíbrio do solo por meio de suas atividades benéficas (Khan et al., 2007). Solubilizadores de fosfato têm um papel chave para um crescimento ótimo das plantas em condições de desequilíbrio nutricional. A solubilização natural do fosfato é econômica, ambientalmente correta compensando assim as fontes inorgânicas caras de fertilizantes sintéticos fosfatados (Wu et al., 2005).

O potencial biotecnológico de MSP pode ser descrito como:

- a) Biofertilizante: células vivas ou latentes de micro-organismos benéficos, que aumentam a disponibilidade de nutrientes para as plantas. (Goldstein, 1986, citado por Behera et al., 2013). Para a produção vegetal, o P é o segundo colocado após o N em importância, de modo que fertilizantes fosfatados são o segundo maior volume em produto químico granulado aplicado no campo e, portanto, o segundo elemento químico amplamente aplicado na Terra (Banik e Day, 1982, citado por Behera et al., 2013);
- b) Promoção de crescimento de plantas e antagonismo a fitopatógeno: bactérias benéficas de vida livre isoladas a partir da rizosfera que são eficientes na promoção da melhoria da fitossanidade ou na produção vegetal, são descritas como promotoras de crescimento vegetal (Suslow e Schroth, 1982, citado por Behera et al., 2013). Uma vasta série de trabalhos sobre bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) relatou a capacidade de solubilizar P inorgânico do solo após

inoculação em solo ou sementes (Gaur e Ostwal, 1972, citado por Behera et al., 2013);

- c) As propriedades mais frequentemente relacionadas com o caráter de promoção do crescimento vegetal são: produção de auxina, fixação de N, antagonismo ao fitopatógeno, cianogênese, solubilização de fosfato (Cattelan et al., 1999);
- d) Produção de ácidos orgânicos: principal mecanismo de solubilização de fosfato mineral é a produção destes ácidos e de fosfatases ácidas que, por sua vez, desempenham um papel importante na mineralização do P orgânico no solo. A produção de ácidos orgânicos pelas BSP tem sido bem documentada. Ácido glucônico e 2 - ácido cetoglucônico parecem ser o agente mais frequente de solubilização de fosfato mineral (Chen et al., 2005).

Embora existam exemplos de inoculantes isolados a partir do ambiente edáfico que conseguem estimular o crescimento e a produtividade das culturas, o seu uso ainda é incipiente na agricultura. O sucesso de uma inoculação específica dependerá da espécie da planta e/ou cultivar. Em se tratando de inoculação no substrato de plantio, as principais características que determinam a eficiência do procedimento estão relacionadas com o tipo de substrato e sua percentagem de umidade, condições de temperatura, bem como o número de agentes biológicos nativos que possam impedir a interação MPCV em torno da planta. Ademais, os inoculantes contêm e/ou são micro-organismos vivos e o modo como são desenvolvidos e a posterior tecnologia de aplicação são fatores que podem afetar o resultado da inoculação nas plantas (Gaskin et al., 2010).

Devido ao potencial de contribuição dos diazotróficos associados às plantas para o crescimento vegetal e ao sucesso da inoculação de simbióticos em soja, tem-se buscado ampliar essa tecnologia de inoculantes e inoculação também para plantas não leguminosas (Moreira et al., 2010).

No Brasil, está sendo testado uma mistura de cinco espécies de diazotróficos (*Gluconoacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*) como um inoculante misto para cana-de-açúcar e outras Poaceae (Reis e Reis, 2009).

Nessa última década foi disponibilizado aos produtores de trigo e milho o inoculante de *Azospirillum brasilense* lançado pela Universidade Federal do Paraná e Embrapa Soja, originado de pesquisas da primeira década dos anos 2000 envolvendo desde a seleção de várias estirpes da bactéria *Azospirillum brasilense* até o desenvolvimento do produto com finalidade de promover o crescimento das plantas via processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN) e produção de diversos fitormônios. Resultados experimentais apontaram para maior crescimento, absorção de água e de nutrientes (Moreira et al., 2010).

A adoção da tecnologia de inoculação com *Azospirillum*, somente para a cultura do milho, pode resultar em uma economia estimada em U\$1 bilhão por safra de acordo com a projeção da EMBRAPA (2009).

A maior parte dos estudos de bactérias diazotróficas associativas está concentrada no gênero *Azospirillum*, provavelmente por influência das pesquisas realizadas pela Dr^a Johanna Döbereiner. No entanto, grande diversidade destas bactérias vem sendo revelada e pouco ainda se conhece sobre o potencial de aplicações de muitas espécies já descritas (Moreira et al., 2010).

Outra novidade é o produto Rizolyptus® inoculante biológico para otimizar o enraizamento de miniestacas de eucalipto. O produto foi criado a partir de uma parceria Bio-Soja e Universidade Federal de Viçosa e a eficiência foi comprovada pela experimentação agrícola realizada ao longo de cinco anos, nos quais foram testadas mais de dois milhões de mudas em dezenas de clones de eucalipto. Dentre outros efeitos benéficos, essas rizobactérias foram capazes de aumentar a produção de brotações em minijardim clonal, incrementando em até 25% o número de miniestacas por minicepa; promoveram maior índice de enraizamento, cujos ganhos médios atingiram 15%; promoveram o desenvolvimento de raízes (37%) e da parte aérea (9%). A inoculação resultou, portanto, em maior velocidade no desenvolvimento das mudas, otimizando a utilização das estruturas do viveiro.

Iniciativas para geração de insumos de base biológica para agricultura também vêm sendo desenvolvidas no Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para a Agricultura (NUDIBA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), como por exemplo, a patente INPI n. 0000220602675461 (Canellas et al., 2002; Marques Jr. et al., 2008; Conceição et al., 2008). No NUDIBA a pesquisa está aliada à geração de tecnologias que visem

o uso de insumos alternativos àqueles que a indústria sintetiza, a fim de estimular ou nutrir a planta utilizando-se de matéria orgânica e/ou suas frações combinadas com micro-organismos promotores de crescimento vegetal que podem ser associados às culturas.

A capacidade dos micro-organismos em solubilizar os fosfatos inorgânicos é conhecida há muito tempo e, desde o início destes estudos, tem-se buscado o desenvolvimento de inoculantes de solubilizadores. Essa é uma tecnologia com grandes possibilidades econômicas, existindo na Austrália e no Canadá produtos utilizando tais micro-organismos como inoculantes: JumpStart e Philom Bios à base de *Penicillium bilaiae*, no Canadá, e na Austrália, o PR-70 Release, produzido pela Bio-Care Technology, utilizando *Penicillium radicum* (EMBRAPA, 2010).

Apesar de algumas tentativas comerciais nessa linha existirem no Brasil, como o BioAtivo produzido pelo Instituto de Fosfato Biológico Ltda, a produção destes biofertilizantes ainda se encontra em um estágio inicial, necessitando-se de mais resultados de pesquisa, tanto na área de isolamento dos micro-organismos mais eficientes quanto na determinação de combinações ideais de isolados de MSP, na fonte de fosfato natural e na fonte de carbono, e finalmente, na confirmação do valor agrônômico desta tecnologia. Uma vez dominada, esta tecnologia pode ter alto impacto na agricultura nacional, permitindo o uso em larga escala de reservas nacionais de fosfato de baixa reatividade, reduzindo a dependência de fertilizantes sintéticos processados (EMBRAPA, 2010).

Entretanto, a imprevisibilidade dos resultados de inoculação tem limitado o uso comercial destes organismos na agricultura. Entre os possíveis fatores desta imprevisibilidade estão incluídos a competitividade do inoculante com a população nativa de micro-organismos, dificuldades na formulação de inoculantes (manutenção da viabilidade, alto número de células e estágio do crescimento), baixa sobrevivência das estirpes inoculadas nos diferentes solos, agentes microbianos adversos, especificidade do inoculante, estágio de desenvolvimento da cultura, entre outros (Boddey e Döbereiner, 1988; Bashan e Holguin, 1997; Olivares et al., 2010).

As restrições ambientais, tecnológicas, de infraestrutura, financeira, recursos humanos, falta de consciência, qualidade e marketing, também contribuem para limitação de uso dos inoculantes.

- Restrições ambientais: demanda sazonal por biofertilizantes, cultivo simultâneo, curto espaço entre uma semeadura/plantio e outra, características do solo como salinidade, acidez, seca, alagamento;

- Restrições tecnológicas: uso de estirpes impróprias, menos eficientes para a produção, a falta de pessoal técnico qualificado, material de boa qualidade, suporte de produção de inoculantes de má qualidade, sem compreender as técnicas microbiológicas básicas e, a curta vida de prateleira de inoculantes;

- Restrições de infraestrutura: falta de equipamentos essenciais, indisponibilidade de instalações adequadas para produção, espaço para laboratório, produção, armazenamento;

- Restrições financeiras: Indisponibilidade de recursos e problemas na obtenção de empréstimos bancários e menos retorno por venda de produtos em pequenas unidades de produção (Mohapatra et al., 2013).

A bioinoculação não apenas compensa o maior custo de fabricação de fertilizantes para a indústria, mas também mobiliza os fertilizantes aplicados ao solo. Sistemas biológicos são, por conseguinte, preferidos aos fertilizantes sintéticos, já que não são somente ambientalmente e economicamente corretos, mas estão envolvidos na melhoria da qualidade do solo e da manutenção da biodiversidade microbiana (Nain et al., 2010).

É importante considerar na preparação de inoculantes a geração de um microambiente mais adequado incluindo proteção física necessária para períodos prolongados de armazenamento e com isso evitar o rápido declínio das bactérias introduzidas. Quando os micro-organismos são direcionados ao plantio a campo, devem ser capazes de resistir a diversidade edáfica e tornar-se disponíveis para as culturas desempenhando o papel de estimular o crescimento vegetal (Bashan, 1998).

Estudos que promovam este conhecimento devem ser apoiados e incentivados visando não só uma agricultura de baixo custo e de baixo impacto ambiental, como também desenvolver o potencial biotecnológico que estes micro-organismos apresentam. Identificar as condições de manejo que possam contribuir para a maximização dos processos que os MPCV realizam é desafio da pesquisa contemporânea (Moreira et al., 2010).

Pesquisadores envolvidos em processos microbiológicos aplicáveis à agricultura acreditam que o sucesso de um micro-organismo introduzido pode

estar mais relacionado com a sua capacidade reprodutiva e estabelecimento populacional em um nicho particular em torno da rizosfera da planta do que com a carga microbiana nos inoculantes aplicados. Micro-organismos introduzidos devem ser capazes de competir com aqueles presentes no solo e sobreviverem frente à predação por protozoários e nematoides ali encontrados. Eles têm que encontrar a fonte de alimentação adequada e condições ambientais para sobreviver. Condições típicas decorrentes do manejo convencional do solo como flutuações no conteúdo de água e uso de fertilizantes ou agrotóxicos, afetam substancialmente a introdução de MPCV no sistema solo-planta (Gaskin et al., 2010).

Devido a todos estes efeitos, os micro-organismos introduzidos podem não persistir durante muito tempo no solo e, conseqüentemente, os efeitos benéficos de um inoculante vistos no campo são frequentemente menores do que os observados sob condições de laboratório. Há também casos em que a aplicação de uma estirpe bacteriana ou fúngica terá melhores efeitos do que uma mistura de MPCV (Gaskin et al., 2010).

Inoculantes são formulados e comercializados na forma física de pó, grânulo ou líquida. Materiais pouco reativos como a turfa são frequentemente utilizados como substrato de manutenção temporária e veículo de transporte, a fim de mantê-los vivos e ainda auxiliar na própria aplicação (Gaskin et al., 2010).

Existem vários métodos para a aplicação de inoculantes no solo. Entre eles os indiretos, tais como inoculação de sementes ou plântulas revestidas ou, ainda, a aplicação direta ao solo. Aplicações diretas no solo são geralmente feitas na base das plantas, em torno da zona de raízes mais finas. Formulações diferentes requerem diferentes métodos de aplicação (Gaskin et al., 2010).

O prazo de validade pode também ser um problema, uma vez que as formulações contêm organismos vivos que devem ser mantidos em local fresco (de preferência refrigerado) e, uma vez misturados, devem ser usados tão rapidamente quanto possível, evitando assim, perda da viabilidade e insucesso na resposta da cultura pós-inoculação (Gaskin et al., 2010).

3. HIPÓTESE

A hipótese desse trabalho é que a seleção *in vitro* de micro-organismos solubilizadores de P com seu uso combinado com ácidos húmicos sobre a rocha fosfatada natural é possível incrementar: (i) a disponibilidade e a absorção de nutrientes via biosolubilização de P; (ii) diminuir a aplicação de fontes sintéticas de P sem perdas de produtividade; (iii) promover o aumento do desenvolvimento de plantas cultivadas por meio destes insumos biológicos, menos prejudiciais ao meio ambiente.

4. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de solubilização de P_i por bactérias, actinobactérias e fungos promotores do crescimento vegetal a fim de estimular processos de biossolubilização do P_i , tendo como objetivos específicos:

- Testar a influência de duas granulometrias de fosfato natural de Araxá (FNA) no processo de biossolubilização por MPCV previamente selecionados como capazes de solubilizar P;
- Avaliar o efeito da introdução de um fungo solubilizador de fosfato em distintos substratos contrastantes quanto à disponibilidade de P-lábil;
- Testar a dinâmica do Ps no tempo frente à inoculação em Argissolo Amarelo;
- Obter resposta de plântulas de milho e tomateiro à bioinoculação;
- Entender a influência do P incorporado e localizado em milho e;
- Avaliar o potencial de MSP na nutrição de P em plantas de milho (efeito do inoculante simples e misto).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. COMPARAÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO *IN VITRO* DE DUAS GRANULOMETRIAS DE FNA POR MPCV

Para o ensaio experimental *in vitro* utilizou-se o meio líquido modificado (Verma et al., 2001) para cultivo dos MSP, constituído de: 10 g L⁻¹ de glicose, 5 g L⁻¹ de cloreto de amônio (NH₄Cl), 1 g L⁻¹ de cloreto de sódio (NaCl), 1 g L⁻¹ de sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO₄.7H₂O), 1,0 g L⁻¹ de FNA (Ca₁₀(PO₄)₆F₂), com concentração média de 339 g kg⁻¹ de P₂O₅ (Vale Fertilizantes, 2011), 1 L de água destilada e ajuste de pH para 7,0.

Os tratamentos foram constituídos por três MSP diferentes previamente selecionados e usados isoladamente ou combinados, além dos controles, sendo um absoluto sem utilização tanto de P como MSP, e o controle sem MSP. Os micro-organismos utilizados, advindos da coleção do NUDIBA foram: uma bactéria do gênero *Serratia* denominada de bactéria 22, uma actinobactéria do gênero *Streptomyces* denominada 15 e um fungo do gênero *Curvularia* F5. Tanto a bactéria como a actinobactéria foram isolados de vermicomposto. Os isolados de bactéria e actinobactéria utilizados neste estudo foram obtidos a partir de vermicomposto, e possuem as seguintes características descritas por Aguiar (2012): *Serratia marcescens* (bactéria 22): colônia com coloração rosa, forma circular, elevação pulvinada, bordo inteiro, superfície lisa e tamanho puntiforme, célula em bastões pequenos e pouco móveis, gram-positiva, solubilizadora de P

inorgânico e zinco, degradadora de celulose, fixadora de nitrogênio e produtora de auxina sem e com triptofano como precursor, advinda de solo de Mata Atlântica (20-40 cm) e, *Streptomyces* sp., Actinobactéria 15: colônia com coloração amarela, isolada a partir da diluição 10^{-4} e, solubilizador de P inorgânico, isolado de vermicomposto de torta de filtro. Conforme Bento (2014), o isolado fúngico foi obtido a partir da superfície de folhas de cana-de-açúcar vas RB 86-7512, sendo designado F5 e, identificado posteriormente, como *Curvularia senegalenses* (a ser confirmada por métodos moleculares).

Estes micro-organismos foram incubados (alíquotas de 20 μ L) em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio líquido DYGS, onde permaneceram 7 dias em agitador orbital (180 rpm; 28^oC), período demandado para um crescimento aproximado de 10^9 células mL⁻¹. A partir do pré-inóculo, 100 μ L dessa suspensão contendo ou não o MSP foi transferido para erlenmeyers de 250 mL, com 50 mL do meio líquido modificado (Verma et al., 2001), seguindo os tratamentos descritos, onde permaneceram, também, 7 dias em agitador orbital (180 rpm; 28^oC).

Todos os tratamentos foram construídos em triplicata. Com exceção do controle absoluto, testaram-se dois tamanhos de partículas distintas do FNA, os retidos em peneira de 100 e 325. Os Quadros 2 e 3 apresentam as características dos materiais retidos nas duas peneiras.

Quadro 2. GCA- Grosso Concentrado Apatítico (100 mesh).

P ₂ O ₅	CaO	Fe ₂ O ₃	SiO ₂	Al ₂ O ₃	BaSO ₄	MgO	Retido 100 #
----- % -----							
35,08	46,23	2,85	4,20	0,38	0,52	0,63	12,20

Composição química (%) e separação física do fosfato natural de Araxá (FNA) de granulometria # = 100, conforme Vale Fertilizantes (2011).

Quadro 3. FCA- Fino Concentrado Apatítico (325 mesh).

P ₂ O ₅	CaO	Fe ₂ O ₃	SiO ₂	Al ₂ O ₃	BaSO ₄	MgO	Retido 100 #
----- % -----							
32,80	41,74	6,88	5,40	0,00	0,52	0,70	20,20

Composição química (%) e separação física do fosfato natural de Araxá (FNA) de granulometria # = 325, conforme Vale Fertilizantes (2011).

Após o período de incubação o meio foi centrifugado (3.200 rpm por 15 min). Depois da separação do “pellet”, o pH final (pH_f) e a concentração de PO₄⁻² solúvel (P_s) no sobrenadante foram mensurados usando o método do fosfato - molibdato de amônio (EMBRAPA, 2009). Foi calculada a concentração de PO₄⁻² solúvel relativa (P_{sr}) = [(100*P_s)/ P_i], em %), onde P_i é dado pela quantidade de PO₄⁻² de cada tamanho de FNA utilizado. A massa seca (MS) do precipitado (biomassa microbiana e P - precipitado) foi mensurada em balança analítica, após filtragem em papel de filtro, seguido de secagem a 50⁰C por 96 horas.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com duas repetições por tratamento. Foram obtidas as médias e seus respectivos desvios padrão, além da utilização da análise de correlação linear de Pearson (*r*). Foi utilizado o pacote estatístico SAEG (Ribeiro Jr. e Melo, 2008).

5.2. AVALIAÇÃO DO FÓSFORO SOLÚVEL (P_s) EM SUBSTRATOS DISTINTOS PELA APLICAÇÃO DE UM FUNGO SOLUBILIZADOR DE P (FSP)

O fungo *Curvularia senegalenses* foi selecionado pela sua alta capacidade solubilizadora de P em condições de laboratório. Uma suspensão de hifas e conídios foi obtida e aplicada na proporção (10% volume/massa) em dois substratos distintos compostos pela camada superficial de um Argissolo Amarelo e vermicomposto de esterco bovino. As características químicas destes substratos podem ser observadas nos apêndices: quadros 14 e 16. Foram usados dois tamanhos de partículas distintas do FNA, as retidas em peneira de 100 e 325 mesh.

O isolado fúngico foi incubado (alíquota de 20 µL) em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio líquido DYGS, no qual permaneceram 7 dias em agitador orbital (180 rpm; 28⁰C). A partir do pré-inóculo, 100 µL dessa suspensão foi transferida para erlenmeyers de 250 mL, com 50 mL do meio líquido DYGS, onde permaneceu crescendo por sete dias, com 2,80x10⁵ UFCs de *Curvularia senegalensis*, seguindo os tratamentos abaixo (Quadro 4).

Quadro 4. Esquema dos tratamentos

Tratamentos ⁽¹⁾	Fatores					
	SOLO	VEB	FNA#325	FNA#100	FUNGO	H ₂ O
	g				mL	
TC SOLO	10,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00
T1	10,00	0,00	0,01	0,00	0,00	3,00
T2	10,00	0,00	0,00	0,01	0,00	3,00
T3	10,00	0,00	0,00	0,00	3,00	0,00
T4	10,00	0,00	0,01	0,00	3,00	0,00
T5	10,00	0,00	0,00	0,01	3,00	0,00
TC VEB	0,00	10,00	0,00	0,00	0,00	3,00
T6	0,00	10,00	0,01	0,00	0,00	3,00
T7	0,00	10,00	0,00	0,01	0,00	3,00
T8	0,00	10,00	0,00	0,00	3,00	0,00
T9	0,00	10,00	0,01	0,00	3,00	0,00
T10	0,00	10,00	0,00	0,01	3,00	0,00

⁽¹⁾TC SOLO = controle solo: substrato formado por Argissolo Amarelo;

⁽¹⁾T1 = S+FNA#325: substrato formado por Argissolo Amarelo com Fosfato Natural de Araxá #325;

⁽¹⁾T2 = S+FNA#100: substrato formado por Argissolo Amarelo com Fosfato Natural de Araxá #100;

⁽¹⁾T3 = S+F: substrato formado por Argissolo Amarelo incubado com solução de *Curvularia senegalenses*;

⁽¹⁾T4 = S+FNA#325+F: substrato formado por Argissolo Amarelo com Fosfato Natural de Araxá #325 incubado com solução de *Curvularia senegalenses*;

⁽¹⁾T5 = S+FNA#100: substrato formado por Argissolo Amarelo com Fosfato Natural de Araxá #100 incubado com solução de *Curvularia senegalenses*;

⁽¹⁾TC VEB = controle VEB: substrato formado por Vermicomposto de Esterco Bovino;

⁽¹⁾T6 = VEB+FNA#325: substrato formado por Vermicomposto de Esterco Bovino com Fosfato Natural de Araxá #325;

⁽¹⁾T7 = VEB+FNA#100: substrato formado por Vermicomposto de Esterco Bovino com Fosfato Natural de Araxá #100.

⁽¹⁾T8 = VEB+F: substrato formado por Vermicomposto de Esterco Bovino incubado com solução de *Curvularia senegalenses*;

⁽¹⁾T9 = VEB+FNA#325+F: substrato formado por Vermicomposto de Esterco Bovino com Fosfato Natural de Araxá #325 incubado com solução de *Curvularia senegalenses*; e

⁽¹⁾T10 = VEB+FNA#100: substrato formado por Vermicomposto de Esterco Bovino com Fosfato Natural de Araxá #100 incubado com solução de *Curvularia senegalenses*.

Foram realizadas avaliações em dois períodos distintos, ou seja, aos 6 e 36 dias após inoculação nas parcelas caracterizadas por tubos de ensaio de 50 mL, incubados a 25^oC. O volume do fungo e de água pura autoclavada utilizada seguiu a seguinte regra: a umidade dos substratos utilizados (solo e/ou vermicomposto) foi ajustada para o máximo permitido de 50% (MAPA, 2009).

O P solúvel em água foi determinado pelo método do fosfato - molibdato de amônio (EMBRAPA, 2009).

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições por tratamento. Os resultados foram avaliados estatisticamente

pela análise da variância realizada de forma independente para cada época de coleta. Foi utilizado o pacote estatístico do SAEG (Ribeiro Jr. e Melo, 2008).

5.3. DINÂMICA DO FÓSFORO SOLÚVEL EM ARGISSOLO AMARELO INOCULADO COM MICRO-ORGANISMO SOLUBILIZADOR DE FÓSFORO

O experimento foi conduzido a partir da inoculação 100 µL de uma suspensão de hifas e conídios desse fungo solubilizador que foi obtida e aplicada na proporção (10% volume/massa) de *Curvularia senegalensis* com $3,70 \cdot 10^5$ UFC mL⁻¹ em um horizonte B de um Argissolo Amarelo coletado em Campos dos Goytacazes no colégio agrícola Antônio Sarlo, cuja análise química encontra-se no apêndice 13, com adição de 50 mg 50 mg dm⁻³ de P, na forma de superfosfato simples (SS) – $2\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Quadro 5).

O Quadro 5 apresenta o esquema experimental utilizado. A incubação foi realizada durante 360 horas de incubação à capacidade de campo e as coletas foram realizadas ao longo do período de incubação: 0, 1, 2, 5, 7, 24, 48, 168 e 360 horas de experimentação, em quatro repetições.

Quadro 5. Esquema de tratamentos para a dinâmica do P-H₂O

Tratamentos ⁽¹⁾	Argissolo cm ³	SS g vaso ⁻¹	Fungo cm ³	H ₂ O cm ³
TCP	00,00	0,032	0,00	17,00
T1	50,00	0,000	0,00	17,00
T2	50,00	0,000	5,00	12,00
T3	50,00	0,032	0,00	17,00
T4	50,00	0,032	5,00	12,00

⁽¹⁾**TCP = Controle positivo:** Superfosfato simples (SS) diluído em água.

⁽¹⁾**T1 = Arg:** Argissolo Amarelo.

⁽¹⁾**T2 = Arg + F:** Argissolo Amarelo combinado com *Curvularia senegalenses* ($3,70 \cdot 10^5$ UFCs).

⁽¹⁾**T3 = Arg + SS:** Argissolo Amarelo acrescido de superfosfato simples (SS).

⁽¹⁾**T4 = Arg + SS + F:** Argissolo Amarelo acrescido de SS combinado com *Curvularia senegalenses* ($3,70 \cdot 10^5$ UFCs).

O isolado fúngico foi incubado (alíquota de 20 µL) em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio líquido DYGS, onde permaneceram 7 dias em agitador orbital (180 rpm; 28^oC). A partir do pré-inóculo, 100 µL dessa suspensão foi transferida para erlenmeyers com meio líquido DYGS e um volume total necessário para aplicação nos tratamentos formulados por tal bioinoculante, onde permaneceu crescendo por sete dias.

A contagem das unidades formadoras de colônias, antes da inoculação do substrato foi feita via placa, após cinco dias de incubação do MSP a 30 °C. Para tal, uma alíquota de 1 mL da solução fúngica foi utilizada para diluições de 10^{-2} a 10^{-4} em meio de cultivo BDA. Escolheu-se a diluição 10^{-4} para contagem, apresentando um resultado de 370.000 colônias por mL de suspensão do bioinoculante aplicada.

Os substratos incubados foram mantidos em copinhos descartáveis de café brancos (unidades experimentais) com volume de 50,0 cm³ durante 360 dias de experimentação.

Ao longo desse período de incubação foram feitas análises de P-H₂O em nove tempos de coleta: 0, 1, 2, 5, 7, 24, 48, 168 e 360 horas.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento. A análise da variância da regressão foi realizada com o auxílio do pacote estatístico do programa computacional Sigmaplot.

5.4. RESPOSTA DAS PLÂNTULAS DE MILHO E TOMATEIRO À BIOINOCULAÇÃO COM SOLUBILIZADORES DE P

O experimento obedeceu a um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Os tratamentos avaliados foram constituídos pela incubação de Argissolo Amarelo com fosfato natural de Araxá (FNA) ou superfosfato simples (SS) com ou sem a inoculação de uma suspensão de $2,33 \times 10^5$ UFCs de *Curvularia senegalensis*, conforme Quadro 6. Aos 30 dias após a semeadura, todos os tratamentos receberam um terço da dose recomendada de SS, eliminando a deficiência visual de fósforo de alguns tratamentos. Foi utilizado o FNA com tamanho padronizado, ou seja, retido em peneira de 325 mesh (#).

Quadro 6. Esquema de tratamentos para semeadura do milho

Tratamentos ⁽¹⁾	Argissolo	SS	F	FNA#325
	dm ³	g vaso ⁻¹	dm ³	g vaso ⁻¹
TC	5,5	0,00	0,000	0,00
T1	5,5	0,00	0,550	0,00
T2	5,5	0,00	0,000	0,84
T3	5,5	0,00	0,550	0,84
T4	5,5	1,72	0,000	0,00

⁽¹⁾**TC = controle negativo (CN):** substrato formado por Argissolo Amarelo acrescido de fertilização solúvel sintética (100% da dose recomendada, segundo Ribeiro, 1999), sendo fonte N, ureia, e, K, cloreto de potássio (Quadros 14 e 15, vide no apêndice), exceto fonte de P;

⁽¹⁾**T1 = F:** substrato acrescido de *Curvularia senegalenses* ($2,33 \cdot 10^5$ UFCs);

⁽¹⁾**T2 = FNA:** substrato acrescido de FNA #325;

⁽¹⁾**T3 = FNA+F:** substrato acrescido de *Curvularia senegalenses* e FNA #325;

⁽¹⁾**T4 = SS:** substrato formado por Argissolo Amarelo acrescido de fertilização solúvel sintética (100% da dose recomendada, segundo Ribeiro, 1999), sendo fonte de P, superfosfato simples (SS), N, ureia, e K, cloreto de potássio (KCl) (Quadros 14 e 15, vide no apêndice).

Quadro 6.1. Esquema de tratamentos para cobertura do milho

Tratamentos ⁽¹⁾	Fatores		
	SS	Ureia	KCl
N ^o	----- g vaso ⁻¹ -----		
Semeadura	1,72	0,19	0,38
1 ^o Cobertura	0,00	0,74	0,00
2 ^o Cobertura	0,00	0,00	0,00
3 ^o Cobertura	0,00	0,00	0,00

⁽¹⁾ Fatores: Fontes de P = superfosfato simples (SS); N = ureia; e K = cloreto de potássio (KCl). Recomendações baseadas em análise de solo e, valores tabelados (Ribeiro, 1999).

Quadro 7. Esquema de tratamentos para semeadura do tomateiro

Tratamentos ⁽¹⁾	Argissolo	SS	F	FNA#325
	dm ³	g vaso ⁻¹	dm ³	g vaso ⁻¹
TC	5,5	0,00	0,000	0,00
T1	5,5	0,00	0,550	0,00
T2	5,5	0,00	0,000	10,06
T3	5,5	0,00	0,550	10,06
T4	5,5	14,44	0,000	0,00

⁽¹⁾**TC = controle negativo (CN):** substrato formado por Argissolo Amarelo acrescido de fertilização solúvel sintética (100% da dose recomendada, segundo Ribeiro, 1999), sendo fonte N, ureia, e, K, cloreto de potássio (Quadros 14 e 15, vide no apêndice), exceto fonte de P;

⁽¹⁾**T1 = F:** substrato acrescido de *Curvularia senegalenses* ($2,33 \cdot 10^5$ UFCs);

⁽¹⁾**T2 = FNA:** substrato acrescido de FNA #325;

⁽¹⁾**T3 = FNA+F:** substrato acrescido de *Curvularia senegalenses* e FNA #325;

⁽¹⁾**T4 = SS:** substrato formado por Argissolo Amarelo acrescido de fertilização solúvel sintética (100% da dose recomendada, segundo Ribeiro, 1999), sendo fonte de P, superfosfato simples (SS), N, ureia, e K, cloreto de potássio (KCl) (Quadros 14 e 15, vide no apêndice).

Quadro 7.1. Esquema de tratamentos para cobertura do tomateiro

Tratamentos ⁽¹⁾	Fatores		
	SS	Ureia	KCl
N ^o	----- g vaso ⁻¹ -----		
Semeadura	14,44	0,25	0,38
1 ^o Cobertura	6,19	0,75	1,14
2 ^o Cobertura	0,00	0,75	1,14
3 ^o Cobertura	0,00	0,75	1,14

⁽¹⁾ Fatores: Fontes de P = superfosfato simples (SS); N = ureia; e K = cloreto de potássio (KCl). Recomendações baseadas em análise de solo e, valores tabelados (Ribeiro, 1999).

A umidade gravimétrica do Argissolo Amarelo foi determinada obtida por meio de dados de matéria úmida (MUV) e, seca (MSV) à estufa de 105° C até peso constante e, massa de água ($M_{\text{água}} = \text{MUV} - \text{MSV}$), onde a porcentagem de água (%_{água}) presente no solo foi obtida pela equação: $\%_{\text{água}} = (\text{MUV} - M_{\text{água}}) \cdot 100 / \text{MUV}$. A %_{água} do solo foi ajustada até ao máximo de 50% de umidade, logo, a quantidade de solução bioinoculante e água, foi ao final, para proporcionar esse ganho máximo ou limite de 50% de umidade contida no solo e permitida segundo EMBRAPA (2009). O experimento foi realizado entre 10 de julho de 2013 a 11 de setembro de 2013, em Campos dos Goytacazes, RJ.

Três sementes de milho híbrido "cultivar DKB 789" e cinco de tomateiro "Santa Clara" foram utilizadas por vaso de 5,5 dm³. Após atingirem a altura de plântulas foi realizado o desbaste permanecendo uma plântula por vaso.

Para a irrigação, manteve-se a umidade do substrato nos vasos em casa de vegetação próxima à capacidade de campo. O substrato utilizado foi um Argissolo Amarelo localizado na Estação Experimental da UENF, no Colégio Estadual Agrícola Antônio Sarlo. As propriedades químicas e físicas do Argissolo estão no apêndice: Quadros 14 e 15.

Neste estudo, uma suspensão de hifas e conídios (10% volume/massa) de *Curvularia senegalensis* foi obtida e aplicada de acordo com os tratamentos esquematizados (Quadro 6, 6.1, 7 e 7.1). O inóculo foi obtido a partir da incubação de uma alíquota de 20 µL em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio líquido DYGS, onde permaneceram 7 dias em agitador orbital (180 rpm; 28°C). A partir do pré-inóculo, 100 µL dessa suspensão foi transferida para erlenmeyers com meio líquido DYGS e um volume total necessário para aplicação nos tratamentos formulados por tal bioinoculante, onde permaneceu crescendo por

sete dias. O volume de *Curvularia senegalenses* aplicado após trituração, centrifugação e, posterior separação do meio DYGS, e de água pura autoclavada utilizada, seguiu a seguinte regra: a umidade do Argissolo Amarelo utilizado como substrato foi ajustada para o máximo permitido de 50% (EMBRAPA, 2009). A contagem das unidades formadoras de colônia, antes da bioinoculação do substrato, foi feita via placa, após cinco dias de incubação do MSP a 30°C. Para tal, uma alíquota de 1 mL da solução fúngica foi utilizada para diluições de 10^{-2} a 10^{-4} em meio de cultivo BDA. Escolheu-se a diluição 10^{-4} para contagem, apresentando um resultado de 233.000 colônias por mL de solução bioinoculante aplicada.

As plantas teste (milho e tomateiro) foram mantidas em vasos de polietileno pretos (unidades experimentais) com volume de $5,5 \text{ dm}^3$ durante 61 dias de experimentação. Ao final de 61 dias após a inoculação (DAI) foram feitas análises biométricas e nutricionais. Foi determinado o volume radicular (VR) das unidades experimentais por meio de uma proveta, vendo-se a variação de um dado volume de água inicial e anotando-se a diferença como o volume radicular em centímetros cúbicos. As raízes foram lavadas até remoção completa dos resíduos de solo e medido a massa fresca e massa seca após massa constante, em estufa de ventilação forçada a 60°C. O material vegetal seco da parte aérea, após a determinação da MSPA, foi moído e passado por peneira de 60 malhas cm^{-2} . Após digestão sulfúrica combinada com peróxido de hidrogênio, foram determinados os teores de N, P, K, Ca e S. Estes multiplicados pela MSPA resultaram nos conteúdos totais de N, P, K, Ca e S. O teor de N foi determinado pelo método de Kjeldahl; o P por colorimetria, após reação com vitamina C e molibdato de amônio. A determinação de K foi realizada por fotometria de chama e os teores de Ca, Mg e S por espectrofotometria de absorção atômica. As análises foram realizadas no Laboratório de Análise de Solos e Fertilizantes da UFRRJ, Campus Leonel Miranda, Campos dos Goytacazes, RJ.

Foi realizada análise de variância dos dados, na qual os fatores qualitativos foram desdobrados em efeitos comparativos entre grupos tratados como padrão de aceitação ou rejeição. Para análise de variância foi aplicado o teste F (Steel e Torrie, 1960). Quando necessário as médias foram comparadas pelo teste de Fisher-LCD em 1% de probabilidade. Foi utilizado o delineamento

experimental inteiramente casualizado com cinco repetições. Foi utilizado o pacote estatístico SAEG (Ribeiro Jr. e Melo, 2008).

5.5. INFLUÊNCIA DO P INCORPORADO E LOCALIZADO EM MILHO

O experimento obedeceu a um delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento constituídos por 0, 20, 40, 60, 80 e 100% da dose recomendada de superfosfato simples (SS) combinado com 100, 80, 60, 40, 20 e 0% da dose recomendada de fosfato natural de Araxá (FNA), na cultura teste milho híbrido "cultivar DKB 789" (Quadro 8).

O Quadro 8 demonstra as quantidades recomendadas de fertilizantes por volume de solo, corrigido na pré-semeadura com calcário dolomítico 1 g kg⁻¹, utilizados nos 30 dias de experimentação. Foi utilizado o FNA retido em peneira de 325 mesh (#).

Quadro 8. Esquema de tratamentos para a semeadura do milho

Tratamentos ⁽¹⁾	Argissolo	SS	FNA#325	Ureia	KCl
	dm ³	g vaso ⁻¹	g vaso ⁻¹	g vaso ⁻¹	g vaso ⁻¹
0	1,0	0,00	0,12	0,04	0,08
20	1,0	0,04	0,10	0,04	0,08
40	1,0	0,09	0,07	0,04	0,08
60	1,0	0,13	0,05	0,04	0,08
80	1,0	0,18	0,02	0,04	0,08
100	1,0	0,22	0,00	0,04	0,08

⁽¹⁾**0 = 0% de SS+100% de FNA:** substrato formado por horizonte B de Argissolo Amarelo acrescido de 100% da fertilização insolúvel natural via FNA (dose recomendada, segundo Ribeiro, 1999), sendo fonte N, ureia, e, K, cloreto de potássio (Quadros 14 e 15, vide no apêndice), exceto fonte de P;

⁽¹⁾**20 = 20% de SS+80% de FNA:** substrato formado por horizonte B de Argissolo Amarelo acrescido de 20% da fertilização solúvel sintética via SS e 80% da fertilização insolúvel natural via FNA (dose recomendada, segundo Ribeiro, 1999), sendo fonte N, ureia, e, K, cloreto de potássio (Quadros 14 e 15, vide no apêndice), exceto fonte de P;

⁽¹⁾**40 = 40% de SS+60% de FNA:** substrato formado por horizonte B de Argissolo Amarelo acrescido de 40% da fertilização solúvel sintética via SS e 60% da fertilização insolúvel natural via FNA (dose recomendada, segundo Ribeiro, 1999), sendo fonte N, ureia, e, K, cloreto de potássio (Quadros 14 e 15, vide no apêndice), exceto fonte de P;

⁽¹⁾**60 = 60% de SS+40% de FNA:** substrato formado por horizonte B de Argissolo Amarelo acrescido de 60% da fertilização solúvel sintética via SS e 40% da fertilização insolúvel natural via FNA (dose recomendada, segundo Ribeiro, 1999), sendo fonte N, ureia, e, K, cloreto de potássio (Quadros 14 e 15, vide no apêndice), exceto fonte de P;

⁽¹⁾**80 = 80% de SS+20% de FNA:** substrato formado por horizonte B de Argissolo Amarelo acrescido de 80% da fertilização solúvel sintética via SS e 20% da fertilização insolúvel natural via FNA (dose recomendada, segundo Ribeiro, 1999), sendo fonte N, ureia, e, K, cloreto de potássio (Quadros 14 e 15, vide no apêndice), exceto fonte de P e;

⁽¹⁾**100 = 100% de SS+0% de FNA:** substrato formado por horizonte B de Argissolo Amarelo acrescido de 100% da fertilização solúvel sintética via SS (dose recomendada, segundo Ribeiro, 1999), sendo fonte N, ureia, e, K, cloreto de potássio (Quadros 14 e 15, vide no apêndice), exceto fonte de P.

O experimento foi realizado entre 28 de abril de 2014 a 27 de maio de 2014 em Campos dos Goytacazes, RJ. Três sementes do milho híbrido foram utilizadas por vaso de 1,0 dm³. Após atingirem a altura de plântulas foi realizado o desbaste permanecendo uma plântula por vaso.

A umidade do Argissolo Amarelo foi mantida próxima à capacidade de campo em todo período trabalhado. Para a irrigação, manteve-se a umidade do substrato nos vasos em casa de vegetação próxima à capacidade de campo. O substrato utilizado foi um Argissolo Amarelo localizado na Estação Experimental da UENF, no Colégio Estadual Agrícola Antônio Sarlo. As propriedades químicas e físicas do Argissolo estão no apêndice: Quadros 14 e 15.

As plantas teste (milho) foram mantidas em vasos de polietileno (unidades experimentais) com volume de 1,0 dm³ durante 30 dias de experimentação. Ao final desse período foram feitas análises biométricas e nutricionais. Foi avaliado a matéria fresca da parte aérea e da raiz, e o volume radicular (VR) pelo método da proveta. Às raízes lavadas para remoção dos resíduos de solo e pesadas para avaliação da massa fresca e, após adquirirem massa constante, em estufa de ventilação forçada a 60°C foi avaliada a massa seca das raízes (MSR) e da parte aérea (MSPA). O material vegetal seco da parte aérea, após a determinação da MSPA, foi moído e passado por peneira de 60 malhas cm⁻². Após digestão sulfúrica combinada com peróxido de hidrogênio foi determinado o teor dos nutrientes conforme descrito no experimento anterior.

Foi realizada a análise da regressão com auxílio do pacote estatístico do programa Sigmaplot.

5.6. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MSP NA NUTRIÇÃO DE P EM PLANTAS DE MILHO (EFEITO DO INOCULANTE SIMPLES E MISTO)

Foram conduzidos dois experimentos independentes denominados de ensaio VI e ensaio VII, respectivamente, nos quais foi utilizado o milho híbrido "cultivar DKB 789" com delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento descritos a seguir:

- **Ensaio VI:**

T0: Controle (sem P e micro-organismos);

T1: 40% da dose recomendada de SS (sem micro-organismos);

T2: 60% da dose recomendada de FNA (sem micro-organismos);

T3: Bactérias (*Serratia marcescens* BAC 22 e *Burkholderia* sp. BAC 14 H);

T4: Fungos (*Curvularia senegalensis* F5 e fungo não identificado F309) e;

T5: Bactérias (*S. marcescens* BAC 22 e *Burkholderia* sp. BAC 14 H) e fungos (*C. senegalensis* F5 e F309).

- **Ensaio VII:**

T1: Controle com 40% da dose recomendada de SS mais 60% da dose recomendada de fosfato natural de Araxá (FNA);

T2: 40% da dose recomendada de SS mais 60% da dose recomendada de FNA combinada com bactérias (*S. marcescens* BAC 22 e *Burkholderia* sp. BAC 14 H);

T3: 40% da dose recomendada de SS mais 60% da dose recomendada de FNA combinada com fungos (*C. senegalensis* F5 e F309);

T4: 40% da dose recomendada de SS mais 60% da dose recomendada de FNA combinada com bactérias (*S. marcescens* BAC 22 e *Burkholderia* sp. BAC 14 H) e fungos (*C. senegalensis* F5 e F309);

T5: 40% da dose recomendada de SS mais 60% da dose recomendada de FNA combinada com bactérias (*S. marcescens* BAC 22 e *Burkholderia* sp. BAC 14 H) mais ácido húmico;

T6: 40% da dose recomendada de SS mais 60% da dose recomendada de FNA combinada com fungos (*C. senegalensis* F5 e F309) mais ácido húmico;

T7: 40% da dose recomendada de SS mais 60% da dose recomendada de FNA combinada com bactérias (*S. marcescens* BAC 22 e *Burkholderia* sp. BAC 14 H) e fungos (*C. senegalensis* F5 e F309).

No Quadro 9 observam-se as quantidades aplicadas, junto à raiz das plantas (na forma localizada) das fontes de N, P e K (m/v) e da suspensão de ácidos húmicos e micro-organismos (v/v) utilizados. O substrato foi corrigido na pré-semeadura com calcário dolomítico 1 g kg⁻¹. Foi utilizado o FNA retido em peneira de 325 mesh (#) com concentração de P de 328 g kg⁻¹ de P₂O₅.

Quadro 9. Quantidades aplicadas dos insumos de acordo com os tratamentos propostos na semeadura do milho

Bioprodutos ⁽¹⁾	ARG	SS	FNA	AH	BAC	F	Ureia	KCl
	dm ³	g vaso ⁻¹	g vaso ⁻¹	mg C L ⁻¹	-----	dm ³ -----	g vaso ⁻¹	g vaso ⁻¹
Quantidade	1,00	0,09	0,07	20,00	0,10	0,10	0,04	0,08

⁽¹⁾Onde: ARG = Horizonte B de Argissolo Amarelo; SS = Superfosfato Simples; FNA = Fosfato Natural de Araxá; AH = Ácidos Húmicos isolados de torta de filtro; BAC = Bioinoculantes bacterianos (aproximadamente $1,0 \times 10^9$ células mL⁻¹ da *S. marcescens* BAC 22 e *Burkholderia* sp. BAC 14 H em mistura); F = Bioinoculantes fúngicos (aproximadamente $3,0 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ do *C. senegalensis* F5 e F309 em mistura); Ureia = fonte de N; e KCl = cloreto de potássio – fonte de K; de acordo com a recomendação de Ribeiro et al. (1999) para o substrato Argissolo Amarelo (Quadros 14 e 15, vide apêndice).

O volume dos insumos biológicos aplicados na forma líquida respeitou o limite de água capaz de umidificar todo substrato contido no vaso de 1 dm³, mantendo-se próximo à capacidade de campo. Após a aplicação dos tratamentos, a umidade do substrato foi mantida próxima à capacidade de campo, durante todo o período experimental. Os ensaios foram realizados em casa de vegetação, entre novembro e dezembro de 2014, período característico de temperaturas e luminosidade mais alta em Campos dos Goytacazes, RJ.

Sementes de milho híbrido "cultivar DKB 789" germinadas em bandejas com areia e, após germinação, estas foram selecionadas de acordo com altura e o vigor e transplantadas para vasos contendo 1 dm³ de substrato formado por Argissolo Amarelo descrito no experimento anterior. Para a irrigação, manteve-se a umidade do substrato nos vasos em casa de vegetação próxima à capacidade de campo.

Os ácidos húmicos foram isolados de vermicomposto de torta de filtro, no qual foi seco em estufa de ventilação forçada a 60 °C, até alcançar massa constante. Os AH foram isolados usando-se NaOH 0,1 mol L⁻¹ (1:20 m/v) sob atmosfera de N₂. Após agitação por 16 horas, o material foi centrifugado a 1.037g por 30 minutos. O sobrenadante foi coletado e o pH do extrato foi imediatamente ajustado para 1,5 com HCl 6 mol L⁻¹. Depois de 16 horas, a fração de ácidos fúlvicos foi sifonada e descartada. O material remanescente (precipitado de ácidos húmicos) foi solubilizado em NaOH 0,1 mol L⁻¹ e centrifugado a 1.037g por 15 minutos e o sobrenadante descartado. A dissolução e a re-precipitação dos ácidos húmicos foram repetidas por mais duas vezes. A seguir, o precipitado de ácidos húmicos foi solubilizado e permaneceu em HF+HCl 5 % por 48 horas, visando a remoção de resíduos de minerais de argila silicatada, sendo a seguir centrifugado a 1.037 g. Os ácidos húmicos foram lavados com 200 mL de HCl

0,01 mol L⁻¹, centrifugados a 1.037 g. A seguir, o precipitado de ácidos húmicos foi lavado com água destilada até teste negativo para Cl⁻ usando-se AgNO₃ 0,1 mol L⁻¹ e, depois, transferiu-se para membranas de diálise de 10 mL (cut-off 1 KDa, Thomas Sci.). Após a diálise, até a obtenção de condutividade elétrica igual à da H₂O destilada, os AH foram liofilizados e armazenados em dessecador, para posterior utilização, como solução.

Os micro-organismos solubilizadores de P (MSP) foram previamente selecionados em ensaios conduzidos *in vitro*. Estes apresentaram elevada capacidade de solubilização de P em meio sólido e subsequentemente em meio líquido modificado (Verma et al., 2001) pela introdução do fosfato natural de Araxá (FNA) como fonte de fósforo (resultados desta tese nos Ensaio 5.1 e 5.2). Os isolados microbianos utilizados para produção dos inóculos mistos bacterianos e mistos fúngicos constam no próximo Quadro: 10.

Para preparo dos inóculos, os isolados microbianos utilizados foram incubados em meio DYGS líquido para obtenção do pré-inóculo, a partir de estoque em meio sólido inclinado sob óleo de parafina estéril ou de placas contendo meio BDA, respectivamente para as bactérias e os fungos. A biomassa obtida com uma alça de platina foi transferida para um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio líquido DYGS e incubada por 48 horas (bactéria) e 96 horas (fungo) em agitador orbital a 30 °C e 180 rpm. Subsequentemente, uma alíquota de 100 µL do meio de crescimento foi transferida para erlenmeyers contendo 100 mL do mesmo meio líquido DYGS, sendo incubada nas mesmas condições do pré-inóculo.

Quadro 10. Micro-organismos solubilizadores de P altamente eficientes, previamente selecionados em estudos *in vitro* e utilizados no presente ensaio.

Micro-organismo Utilizado	Posição Taxonômica	Código da Estirpe	Origem	Fonte
Bactéria	<i>Serratia marcescens</i>	BAC 22	Solo (20-40 cm) Mata Atlântica	Aguiar, 2012
Bactéria	<i>Burkholderia</i> sp.	BAC 14H	Vermicomposto Esterco bovino	Bento, 2014
Fungo	<i>Curvularia senegalensis</i>	F 5	Vermicomposto	Bento, 2014
Fungo	F 309	F 309	Vermicomposto	Bento, 2014

O volume da suspensão de MSP aplicado era tal que a umidade final do Argissolo Amarelo utilizado como substrato foi ajustada para o máximo permitido de 50% (MAPA, 2009). As bactérias crescidas em meio DIGYS líquido foram

centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos para obtenção de um pellet microbiano e em seguida resuspensas em água estéril com ajuste espectrofotométrico de densidade óptica equivalente a 1,0 a 460 nm de comprimento de onda, o que corresponde a aproximadamente 10^8 células mL⁻¹. A contagem das unidades formadoras de colônia, antes da bioinoculação do substrato, foi feita via placa, após cinco dias de incubação do MSP a 30°C. Para tal, uma alíquota de 1 mL da solução fúngica foi utilizada para diluições de 10^{-2} a 10^{-4} em meio de cultivo BDA. Escolheu-se a diluição 10^{-4} para contagem manual, apresentando um resultado de 300.000 colônias por mL.

As plantas teste (milho híbrido "cultivar DKB 789") foram mantidas em vasos de polietileno brancos (unidades experimentais) com volume de 1,0 dm³ durante 30 dias de experimentação. Ao final desse período foram feitas análises biométricas e nutricionais. O sistema radicular foi separado da parte aérea, lavados em água corrente até completa remoção dos resíduos de solo. Foi determinado a matéria fresca da parte aérea e da raiz e o volume radicular (VR). Este último medido por meio do deslocamento da água em uma proveta graduada e expresso em centímetros cúbicos. Em seguida, o material vegetal foi levado em estufa de circulação forçada e seco a 60°C até aquisição de massa constante. A massa seca da raiz (MSR) e a matéria seca da parte aérea (MSPA) determinadas em uma balança analítica e expressas em gramas. Após a determinação da MSPA, o material vegetal foi moído e submetido a peneiramento de 60 malhas cm⁻², e após digestão sulfúrica combinada com peróxido de hidrogênio, a composição nutricional foi determinada conforme descrito em experimento anterior. Foi realizada análise de variância dos dados, na qual os fatores qualitativos foram desdobrados em efeitos comparativos entre grupos tratados como padrão de aceitação ou rejeição. Para análise de variância foi aplicado o teste F (Steel e Torrie, 1960), sendo que quando fosse detectado efeito significativo, o teste de Fisher-LCD em 5% seria utilizado para a comparação das médias. O ensaio experimental foi desenhado ao acaso e consistiu de quatro (atributos biométricos) ou três parcelas (atributos nutricionais) por tratamento. Foi realizada a análise da variância com auxílio do programa SAEG (Ribeiro Jr. e Melo, 2008).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. COMPARAÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO *IN VITRO* DE DUAS GRANULOMETRIAS DE FNA POR MPCV

No quadro 11 são apresentados os resultados dos valores finais de pH e o conteúdo de P em solução resultantes da avaliação do potencial de solubilização de fósforo de 25 micro-organismos (12 bactérias e 13 fungos) em meio líquido na presença de fosfato de rocha de Araxá (7 dias de incubação). Os resultados apresentados evidenciam uma relação clara entre o abaixamento do pH e o aumento da concentração de fósforo no meio de cultura, sugerindo a extrusão de prótons e principalmente dissociação de ácidos orgânicos em próton e seu sal correspondente como mecanismo principal para solubilização do fosfato de rocha de Araxá. No grupo das bactérias os valores de pH final do meio variaram entre 3,96 e 3,21 com teores de P entre 9,8 e 25,04 mg. L⁻¹ (9,6 a 25,04 % do P total presente na rocha fosfatada). Para o grupo dos fungos, a atividade biossolubilizadora foi ainda mais expressiva, os valores de pH final variaram entre 3,46 e 2,14, os teores de P entre 19,47 e 49,17 mg. L⁻¹, representando um percentual de remobilização de P da rocha de 10,88 a 33,91. Como resultado desta seleção foram destacados os isolados bacterianos BAC 14H, BAC 07BB e BAC 22, sendo este último escolhido para os estudos subsequentes em função da sua afiliação taxonômica definida (*Serratia marcescens*). No grupo dos fungos

destacaram-se os isolados F 116, F 306 e F5, sendo o último selecionado para os estudos subsequentes e classificado como *Curvularia* sp. Nos estudos subsequentes foi também utilizada uma actinobactéria isolado AC 15, com elevado potencial de solubilização de P (dados não mostrados), a qual baseada foi classificada como *Streptomyces* sp.

A partir dos ensaios de seleção outros estudos foram conduzidos. No primeiro deles, o efeito de duas granulometrias do fosfato natural de Araxá (FNA) foi avaliado. Os resultados obtidos indicaram que a granulometria não influenciou de forma significativa ($p < 0,05$) os níveis de Ps (Quadro 12). Assim, o aumento da superfície específica em frações granulométricas de menor diâmetro não contribuiu para maior liberação de P do FNA nas presentes condições experimentais.

Quadro 11. Médias e respectivos desvios padrão dos atributos avaliados na solubilização *in vitro* da granulometria 325 do FNA por MSP.

TRAT ⁽¹⁾	pH _i	pH _f	P _i	P _s	P _{sr}
	-----		- mg de PO ₄ ²⁻ L ⁻¹ -		- % -
BAC 41 B	7	3,41 + 0,01	145	13,96 + 1,36	9,62 + 0,94
BAC 10 A	7	3,34 + 0,02	145	15,32 + 0,99	10,56 + 0,68
BAC 16 DB	7	3,74 + 0,02	145	16,80 + 1,20	11,59 + 0,83
BAC 11 C	7	3,82 + 0,02	145	9,80 + 0,30	6,76 + 0,21
BAC 02 DB	7	3,21 + 0,03	145	19,27 + 2,17	13,29 + 1,49
BAC 07 BB	7	3,38 + 0,02	145	22,93 + 0,73	15,81 + 0,50
BAC 04 RF	7	3,91 + 0,02	145	15,37 + 0,29	10,60 + 0,20
BAC 10 DB	7	3,60 + 0,02	145	21,03 + 0,70	14,50 + 0,48
BAC 04 L	7	3,80 + 0,02	145	20,57 + 0,88	14,18 + 0,61
BAC 14 H	7	3,33 + 0,01	145	25,04 + 0,62	17,27 + 0,43
BAC 10 E	7	3,96 + 0,02	145	14,96 + 0,63	10,31 + 0,44
BAC 22	7	3,80 + 0,01	145	21,99 + 1,50	15,00 + 1,41
F 18	7	3,46 + 0,05	145	19,47 + 0,34	13,43 + 0,24
F 54	7	2,58 + 0,03	145	34,19 + 1,24	23,58 + 0,85
F 93	7	3,00 + 0,05	145	28,31 + 0,75	19,52 + 0,51
F 116	7	2,14 + 0,04	145	49,17 + 0,95	33,91 + 0,65
F 123	7	2,89 + 0,03	145	33,59 + 1,03	23,17 + 0,71
F 131	7	2,93 + 0,01	145	26,49 + 0,82	18,27 + 0,56
F 160	7	3,30 + 0,03	145	15,78 + 0,67	10,88 + 0,46
F 226	7	2,86 + 0,01	145	35,68 + 0,89	24,61 + 0,61
F 236	7	2,59 + 0,06	145	43,70 + 3,78	30,14 + 2,61
F 249	7	2,68 + 0,06	145	41,20 + 0,51	28,42 + 0,35
F 271	7	2,97 + 0,04	145	26,18 + 0,89	18,05 + 0,61
F 309	7	2,80 + 0,01	145	41,61 + 0,73	28,70 + 0,50
F 5	7	2,57 + 0,21	145	43,62 + 6,87	30,00 + 4,24

⁽¹⁾ Onde: Nos tratamentos do ensaio experimental *in vitro* utilizou-se do meio líquido modificado (Verma et al., 2001) para cultivo destes MSP e, com exceções ou adições entre parênteses: BAC = bactérias não identificadas (com fonte de P e MSP); BAC 22 # 325 = bactéria 22 (com fonte de P e MSP); F = fungos não identificados (com fonte de P e MSP); F 5 # 325 = fungo 5 (com fonte de P e MSP). Todos os tratamentos foram construídos em duplicata. Testou-se um tamanho de partícula do FNA: retida em peneira de 325 mesh (#). ⁽²⁾ Atributos avaliados: pH_i = pH inicial; pH_f = pH final; P_i = concentração de PO₄²⁻ inicial (mg de PO₄²⁻ L⁻¹) do FNA; P_s = concentração de PO₄²⁻ solúvel (mg de PO₄²⁻ L⁻¹) e; P_{sr} = concentração de PO₄²⁻ solúvel relativa (%).

Quadro 12. Efeito da granulometria do FNA sobre atributos ⁽¹⁾ relacionados ao processo de solubilização de P pelos MSP.

Granulometria	pH _f	P _s	P _{sr}	MS
---- mesh ----	-----	mg de PO ₄ ²⁻ L ⁻¹	----- % -----	----- g -----
Peneira de 100	4,29 ^{ns} ± 1,51	21,04 ^{ns} ± 16,23	14,63 ^{ns} ± 10,98	1,88 ^{ns} ± 0,97
Peneira de 325	4,15 ^{ns} ± 1,50	23,64 ^{ns} ± 18,42	15,50 ^{ns} ± 12,05	1,99 ^{ns} ± 1,20

⁽¹⁾ Atributos avaliados: pH_f = potencial hidrogeniônico final; P_s = concentração de PO₄²⁻ solúvel (mg de PO₄²⁻ L⁻¹); P_{sr} = concentração de PO₄²⁻ solúvel relativa (%) e; MS = massa seca do precipitado (biomassa microbiana e P - precipitado). ^{ns} = teste T não significativo (P<0,05) aplicado sobre as médias dos tratamentos contendo MSP.

Normalmente, o mecanismo de solubilização é relacionado à produção de ácidos e à consequente diminuição do pH (Chuang et al., 2007). Efetivamente, foi observada uma correlação positiva entre a solubilização e a concentração de H⁺ (pH (pH_i – pH_f) vs P_s: $r = 0,924$ e, Delta pH vs P_s (%): $r = 0,989$, visível na Figura 1).

Houve uma relação inversa entre o pH do meio e a quantidade de P_s. Esta diminuição significativa do pH pode ter ocorrido em razão do consumo de glicose pelos MSP resultando na produção de ácidos orgânicos (AOs) tal como descrito por Yuan e colaboradores (2005). Presume-se que a diminuição nos valores de pH esteja associada ao aumento da acidez oriunda da dissociação dos ácidos orgânicos no meio, durante o crescimento inicial dos MSP (Quadro 13).

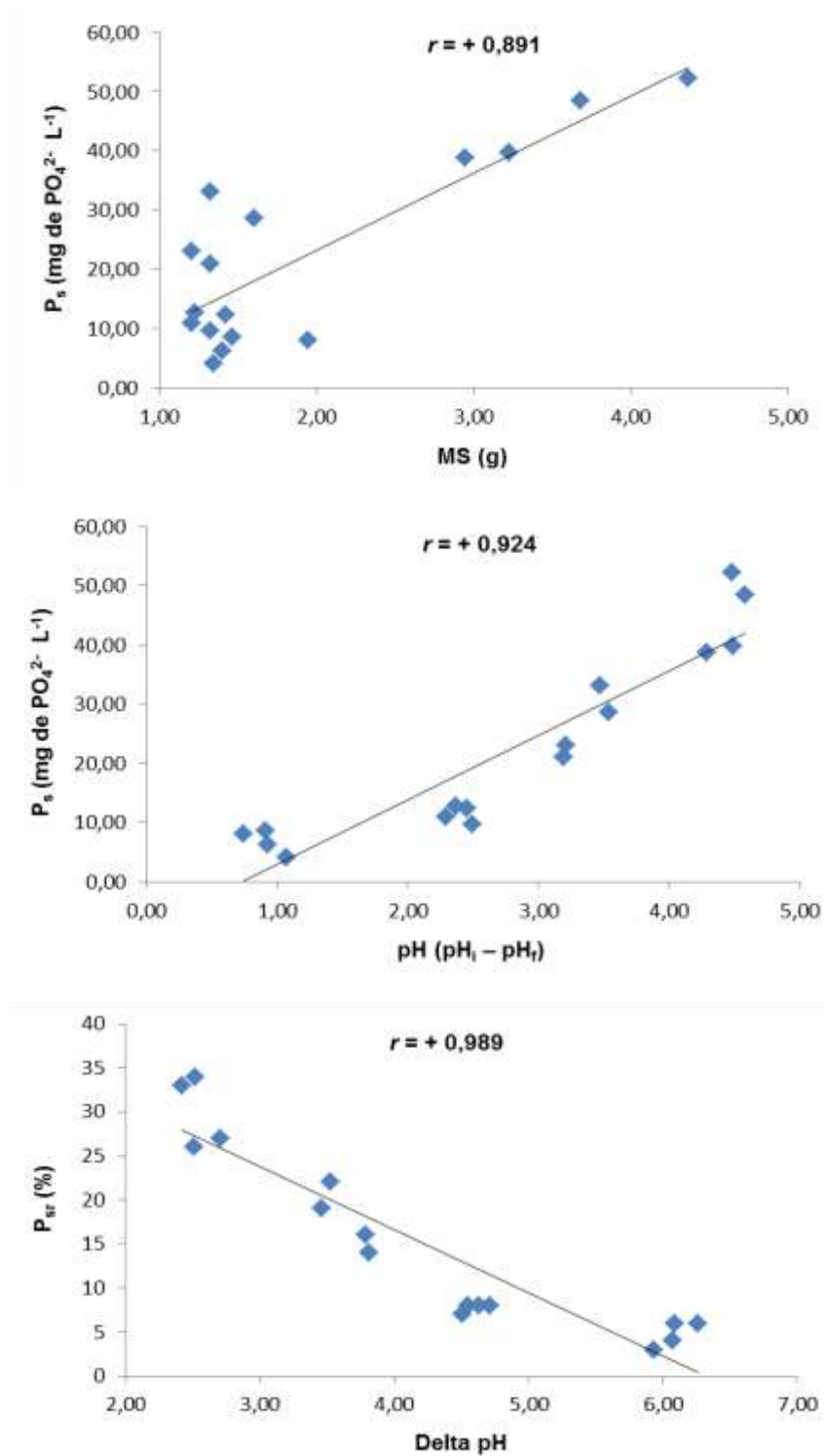


Figura 1. Coeficiente de correlação linear de Pearson (r) entre alguns atributos testados: a= P_s vs MS, b= P_s vs pH e c= P_{sr} vs Delta pH. Onde: MS = massa seca do precipitado (biomassa microbiana e P - precipitado) (g); P_s = concentração de PO_4^{2-} solúvel (mg de $PO_4^{2-} \cdot L^{-1}$); pH = potencial hidrogeniônico; pH_i = potencial hidrogeniônico inicial; pH_f = potencial hidrogeniônico final e; P_{sr} = concentração de PO_4^{2-} solúvel relativa (%). Correlação forte positiva: ($r = 0,8 \leq r < 1$, encontrados nos atributos testados).

Quadro 13. Médias e respectivos desvios padrão dos atributos avaliados na biossolubilização *in vitro* de duas granulometrias de FNA.

TRAT ⁽¹⁾	pH _i	pH _f	P _i	P _s	P _{sr}	MS
	-----		- mg de PO ₄ ²⁻ L ⁻¹ -		- % -	- g -
CA	7	5,88 ± 0,08	0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
C # 325	7	6,18 ± 0,12	145	8,27 ± 0,44	6,00 ± 0,00	1,70 ± 0,34
C # 100	7	6,00 ± 0,10	154	5,15 ± 1,50	3,50 ± 0,71	1,37 ± 0,04
BAC 22 # 325	7	3,80 ± 0,01	145	21,99 ± 1,50	15,00 ± 1,41	1,26 ± 0,08
BAC 22 # 100	7	3,50 ± 0,05	154	30,91 ± 3,17	20,50 ± 2,12	1,46 ± 0,20
AC 15 # 325	7	4,61 ± 0,14	145	10,27 ± 0,08	7,50 ± 0,71	1,26 ± 0,08
AC 15 # 100	7	4,59 ± 0,06	154	12,52 ± 0,26	8,00 ± 0,00	1,32 ± 0,14
F 5 # 325	7	2,57 ± 0,21	145	43,62 ± 6,87	30,00 ± 4,24	3,31 ± 0,52
F 5 # 100	7	2,52 ± 0,01	154	45,98 ± 8,80	30,00 ± 5,66	3,79 ± 0,81

⁽¹⁾ Onde: Nos tratamentos do ensaio experimental *in vitro* utilizou-se do meio líquido modificado (Verma et al., 2001) para cultivo destes MSP e, com exceções ou adições entre parênteses: CA = controle absoluto (sem fonte de P e MSP); C # 325 e C # 100 = controle (sem MSP); BAC 22 # 325 e BAC 22 # 100 = bactéria 22 (com fonte de P e MSP); AC 15 # 325 e AC 15 # 100 = actinomiceto 15 (com fonte de P e MSP); F 5 # 325 e F 5 # 100 = fungo 5 (com fonte de P e MSP). Todos os tratamentos foram construídos em duplicata. Com exceção do controle absoluto, testaram-se dois tamanhos de partículas distintos do FNA: retidas em peneira de 325 mesh (#) e 100 mesh (#). ⁽²⁾ Atributos avaliados: pH_i = pH inicial; pH_f = pH final; P_i = concentração de PO₄²⁻ inicial (mg de PO₄²⁻ L⁻¹) do FNA; P_s = concentração de PO₄²⁻ solúvel (mg de PO₄²⁻ L⁻¹); P_{sr} = concentração de PO₄²⁻ solúvel relativa (%) e; MS = massa seca do precipitado (biomassa microbiana e P - precipitado) (g).

Os AOs podem ser liberados como resultado da assimilação de carboidratos e atuar na complexação do cátion do fosfato inorgânico para liberar Ps (Whitelaw et al., 1999). No entanto, segundo Xu et al. (1989), concentrações de açúcares menores que 2,5%, como as do presente trabalho, não induziram o processo metabólico da acidogênese.

É possível observar ainda na Figura 1 a correlação positiva entre o acúmulo de biomassa microbiana (MS) e P_s (MS vs P_s: $r = 0,891$, $p < 0,05$). Estes dados gráficos são contrários àqueles encontrados por Barroso e Nahas (2008).

O tratamento controle apresentou valores finais de pH mais altos entre 5,9 a 6,3. Já no tratamento com fungo (F5) foi observada uma redução mais pronunciada nos valores de pH, os quais variaram entre 2,5 e 2,8, enquanto que no tratamento com a bactéria (BAC22) os valores de pH oscilaram entre 3,5 e 3,8 (Quadro 13). Esses valores de pH foram similares àqueles encontrados por Souchie e Abboud (2007). Os fungos demonstraram crescimento mais abundante no meio líquido com maior atividade biossolubilizadora, como demonstrado também nos ensaios de seleção (Quadro 11). Resultados semelhantes foram encontrados por Souchie et al. (2005), que relataram maior capacidade de solubilização de fosfatos para os fungos comparados às bactérias, atribuída à

maior produção de biomassa com consequente redução de pH (Souchie e Abboud, 2007).

O tratamento contendo o isolado F5 de *Curvularia* sp., solubilizou acima de 50 mg de $\text{PO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$ ($P_{sr} = 34 \%$). No meio de incubação contendo a actinobactéria AC15, o pH final foi maior do que observado para fungos e bactérias, oscilando entre 4,5 e 4,8 e foram encontrados valores de P_s entre 13 e 10 mg de $\text{PO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$, respectivamente (Quadro 13).

A acidificação é na maioria dos casos o principal mecanismo envolvido na solubilização de P (Marra et al., 2011; Marra et al., 2012). No entanto, existem relatos que apresentaram falta de correlação entre o P_s e o pH do meio tais como os trabalhos de Xie et al. (2009) e Chaiarn e Lumyong (2009).

A oxidação da glicose em AOs pela glicose desidrogenase e enzimas desidrogenases do ácido glucônico resulta em acidificação em torno da célula, promovendo um ambiente eficiente para solubilização de P por bactérias Gram-negativas (Rodríguez e Fraga, 1999). O uso de glicose como fonte de carbono favorece a produção de AOs e contribui para o incremento na solubilização de P (Marra, 2012).

6.2. AVALIAÇÃO DO FÓSFORO SOLÚVEL (P_s) EM DISTINTOS SUBSTRATOS PELA APLICAÇÃO DE UM FSP

O pH tem papel fundamental na disponibilidade do P no solo. A aplicação combinada de isolados de fungos e do FNA resultou em um incremento discreto, porém significativo do pH em relação aos tratamentos isolados com fungo, FNA ou controle aos 6 dias após a incubação (DAI) (Figura 2). No entanto, estas variações não refletiram em diferenças significativas no P_s no período (Figura 3). Curiosamente variações não significativas do pH aos 36 dias foram acompanhadas por diferenças no P_s indicando que as conhecidas correlações inversas altamente significativas entre queda do pH e acúmulo de P_s obtidas em condições de laboratório não se reproduzem em sistemas mais complexos como a solução do solo.

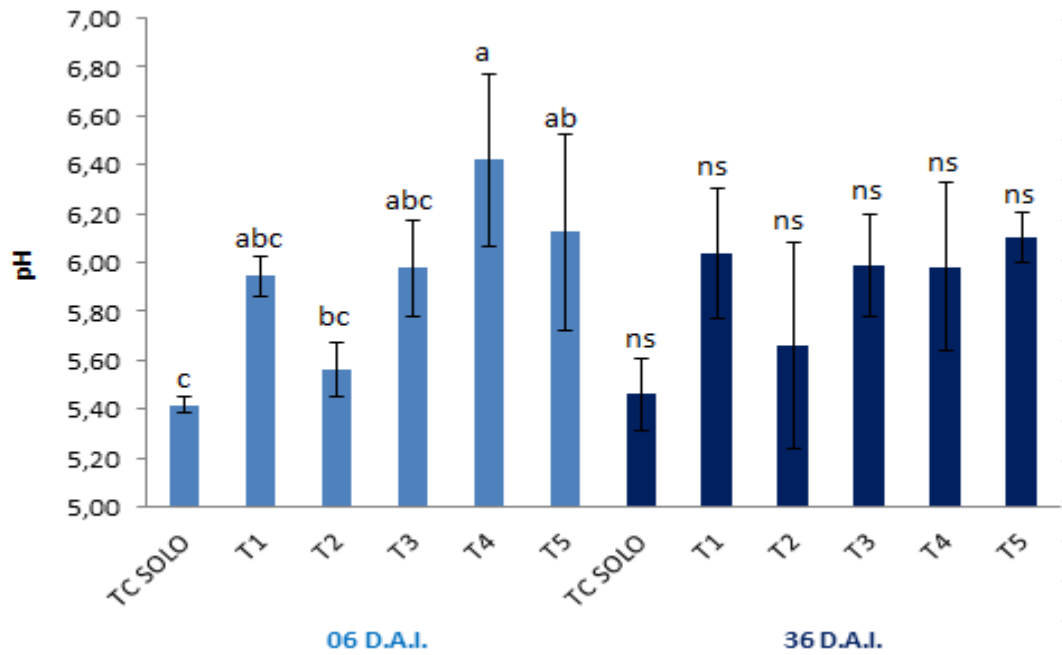


Figura 2. Potencial hidrogeniônico (pH) no substrato do solo, em seis e trinta e seis dias após a incubação (DAI). Onde: TC SOLO: controle do solo; T1: S+FNA#325; T2: S+FNA#100; T3: S+F; T4: S+FNA#325+F; T5 = S+FNA#100+F. Coeficientes de variação: pH (06 DAI)= 4,06% e pH (36 DAI)= 4,63%.

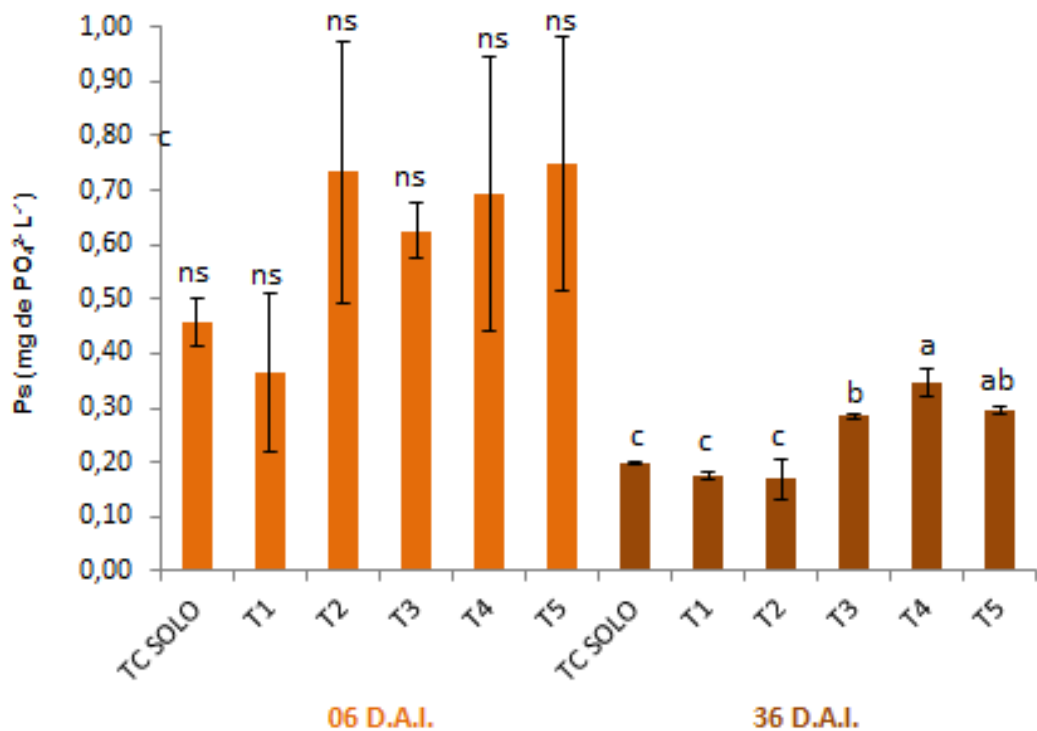


Figura 3. Fósforo Solúvel (Ps) no substrato do solo, em seis e trinta e seis dias após a incubação (DAI). Onde: TC SOLO: controle do solo; T1: S+FNA#325; T2: S+FNA#100; T3: S+F; T4: S+FNA#325+F; T5 = S+FNA#100+F. Coeficientes de variação: Ps (06 DAI) = 30,32% e Ps (36 DAI) = 7,75%.

Aos 36 DAI observou-se incremento significativo do Ps nos tratamentos T3, T4 e T5 de 43, 72 e 47%, respectivamente, em comparação com TC SOLO, evidenciando claramente o efeito da aplicação do fungo no solo com respeito a solubilização de P do FNA. A comparação T1 x T4 e T2 x T5 evidenciou a importância da combinação do fungo com FNA, com respectivos incrementos T1 x T4= 97% e T2 x T5= 75% do Ps. Interessante destacar a capacidade do isolado fúngico em aumentar a disponibilidade de P a partir dos minerais presentes no solo, com aumento de Ps em 43% para TC SOLO x T3 (Figura 3). Neste caso pode-se especular dois papéis para os efeitos de bioaugmentação do substrato solo com o fungo *Curvularia* sp., sendo o mais evidente aquele relacionado com a capacidade de solubilização de P oriundo na matriz mineral presente no Argissolo amarelo utilizado, outro advém das conversões de P-orgânico em P-inorgânico de frações da matéria orgânica estabilizada presente no substrato ou mesmo em processos de reciclagem das estruturas fúngicas aplicadas ao substrato, que contribuíram assim para aumento de P-lábil em solução.

O solo detém inúmeras espécies químicas – um sistema complexo, no qual até escalas milimétricas podem influenciar em sua composição. Quando é realizada a fertilização fosfatada inicialmente ocorre a formação de fosfatos mais solúveis e, que com o passar do tempo, se tornam menos solúveis, menos lábeis (Tisdale et al., 1985).

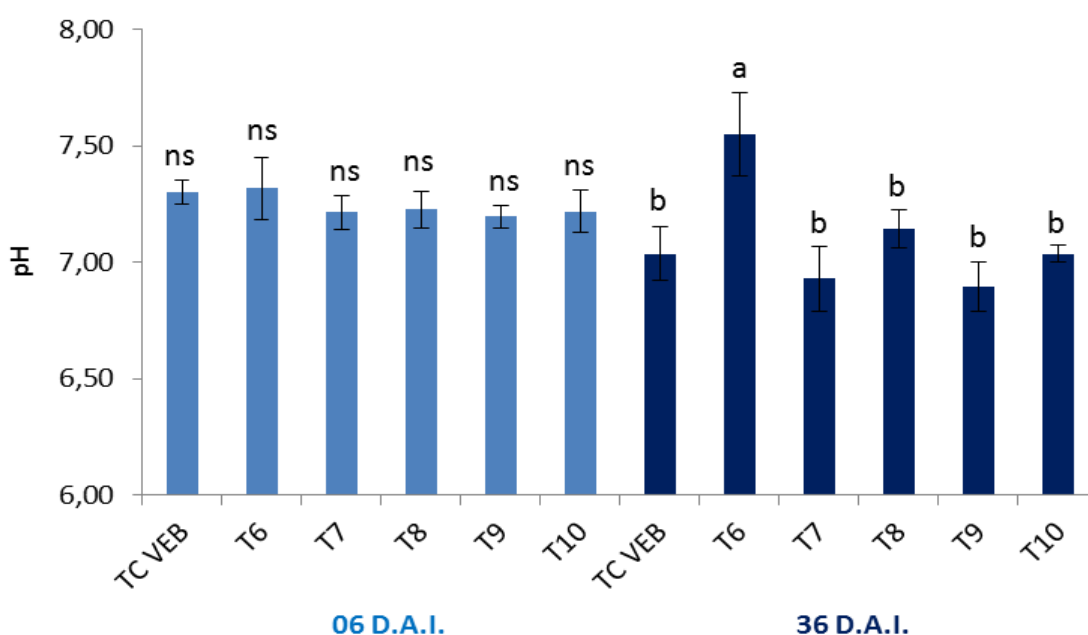


Figura 4. Potencial hidrogeniônico (pH) no substrato VEB, em seis e trinta e seis dias após a incubação (DAI). Onde: TC VEB: controle VEB; T6: VEB+FNA#325; T7: VEB+FNA#100; T8: VEB+F; T9: VEB+FNA#325+F; T10 = VEB+FNA#100+F. Coeficientes de variação: pH (06 DAI)= 1,16% e pH (36 DAI)= 1,67%.

As diferenças discretas, porém, significativas no pH observadas para o substrato solo não ocorreram no caso do vermicomposto, provavelmente em função do elevado poder tamponante do material (Figura 4), exceto para o T6, no qual foi observado o aumento de 0,5 unidade \log_{10} no pH.

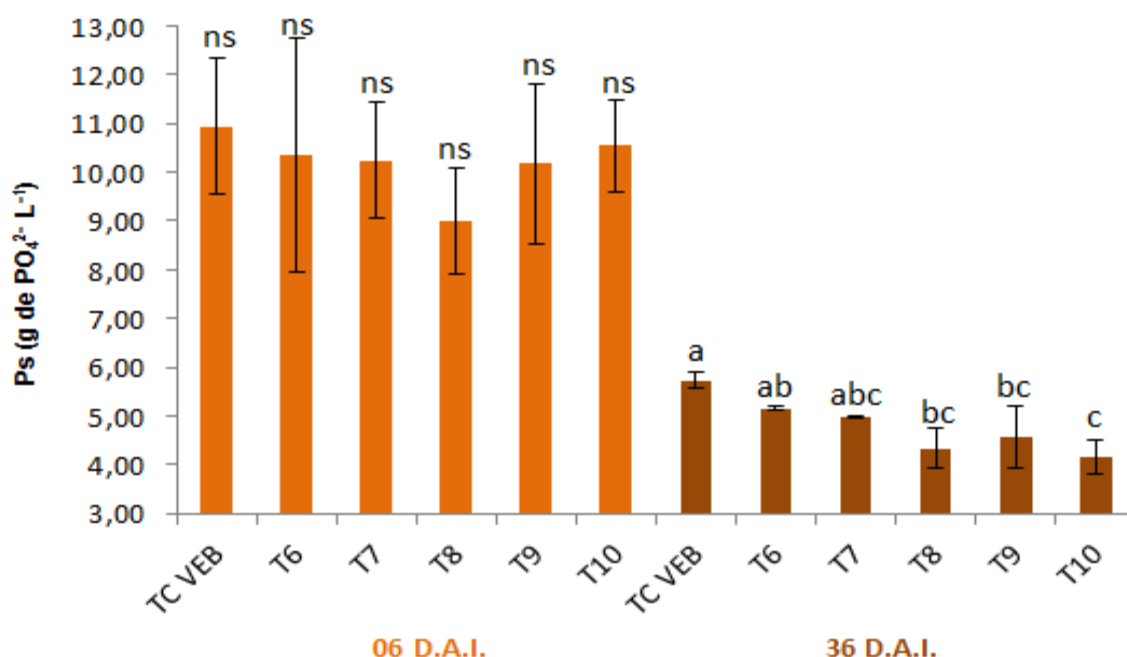


Figura 5. Fósforo Solúvel (Ps) no substrato VEB, em seis e trinta e seis dias após a incubação (DAI). Onde: TC VEB: controle VEB; T6: VEB+FNA#325; T7: VEB+FNA#100; T8: VEB+F; T9: VEB+FNA#325+F; T10 = VEB+FNA#100+F. Coeficientes de variação: Ps (06 DAI)= 14,87% e Ps (36 DAI)= 7,16%.

Não foram observadas diferenças significativas no Ps quando o vermicomposto foi utilizado como substrato da mesma forma que o pH em função da inoculação aos 6 DAI. Resultados contrastantes para Ps foram visíveis em 36 DAI, no qual foi verificada uma redução no Ps em solução para todos os tratamentos inoculados com o fungo, isto é: T8, T9 e T10, de 24, 21 e 27%, respectivamente, em comparação com TC VEB (Figura 5). Esta constatação poder ser explicada por uma provável mobilização de P na biomassa fúngica, melhor adaptada às condições de crescimento neste substrato rico em matéria orgânica. Esta inversão do efeito de incremento de P-lábil em solução aquosa poderia ainda ser justificada pelo elevado conteúdo de P deste material, como também encontrado por Busato et al. (2012), de alguma forma inibindo o potencial solubilizador de P do fungo introduzido e da comunidade microbiana.

Estudos apontam que em condições de P menos solúvel, menos “lábil”, os micro-organismos ativam o PHO-box, um regulador multigênico, que controla enzimas fosfatases, permitindo que bactérias, por exemplo, absorvam P mesmo em condições físico-químicas desfavoráveis à sua disponibilidade, acumulando-o em sua biomassa. Finalizando o ciclo de vida microbiano, este P agora orgânico, será mineralizado e disponibilizado às plantas ou aos demais micro-organismos inseridos no solo – processo denominado de mineralização biológica do P e, aparentemente, importantíssimo para os seres vivos em condições de extrema deficiência desse elemento vital (Gyaneshwar et al., 2002), como é o caso dos solos tropicais altamente intemperizados como o Argissolo empregado neste estudo (Quadros 14 e 15, no apêndice).

6.3. DINÂMICA DO Ps NO TEMPO EM ARGISSOLO AMARELO INOCULADO COM FUNGO SOLUBILIZADOR DE FÓSFORO

No presente trabalho, uma fonte de P solúvel foi aplicada e a variação do P lábil extraível com água foi analisada ao longo do tempo de incubação. Foi confirmado o fato de que quanto maior a taxa de liberação de P pela fonte aplicada mais prejudicial será o efeito do tempo de contato com o solo sobre sua disponibilidade em solução (Tisdale et al., 1985, Novais et al., 2007) (Figura 6 e 7). Isto é especialmente crítico para o Argissolo testado, já que a predominância de óxidos de ferro e alumínio na fração argila, os quais fixam o P em solução em formas bi a tridentadas ligadas covalentemente (Novais e Smyth, 1999) e, portanto, indisponíveis para as plantas.

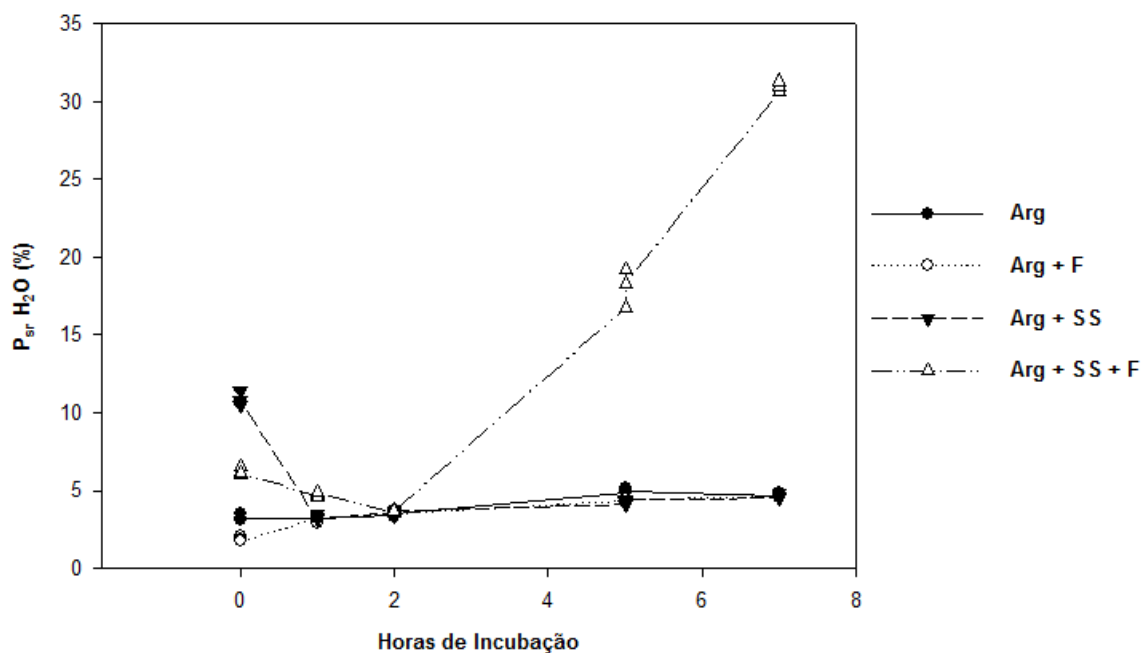


Figura 6. P_{sr} H₂O: Fósforo solúvel relativo em água (%) no substrato analisado, de 0 a 7 horas de incubação. Onde, Arg = T1: Argissolo Amarelo; Arg + F = T2: Argissolo Amarelo combinado com *Curvularia senegalenses* ($3,70 \times 10^5$ UFCs); Arg + SS = T3: Argissolo Amarelo acrescido de superfosfato simples (SS) e; Arg + SS + F = T4: Argissolo Amarelo acrescido de SS combinado com *Curvularia senegalenses* ($3,70 \times 10^5$ UFCs), representam os diferentes tratamentos testados.

A partir de duas horas de incubação o tratamento T4 (Arg + SS + F), apresentou valores crescentes de P_s e, P_{sr} até sete horas de incubação (Figura 6 e 7). A partir desse tempo, não houve detecção de P_s pelo método utilizado (EMBRAPA, 2009) em todos os tratamentos, exceto o TCP (Figura 6) (controle positivo que foi o SS diluído em H₂O somente), o que demonstra a modulação da concentração de P em solução pela introdução do fungo solubilizador de fósforo no substrato (Figura 6 e 7) durante as 7 primeiras horas de incubação com uma solução de P. Estes resultados observados para um substrato muito intemperizado e pobre em nutrientes (Moreira et al., 2006, Padmavathiamma et al., 2008), principalmente o P (Quadros 14 e 15), devem ser melhores explorados e compreendidos para um manejo mais sustentável do fósforo na agricultura.

Também em relação ao TCP, nota-se que esse tipo de solo tem a capacidade de reter até oito vezes mais o P lábil em média e em relação a todos os tratamentos por tempo daquele P na forma de SS aplicado inicialmente. E isso acontece já nos primeiros minutos de incubação nesse teste, sendo 80% adsorvido em formas menos lábeis e não extraíveis por H₂O (Figura 6). Resultado semelhante foi observado em Gonçalves et al. 1985, que descreveram uma

adsorção de até 75% do P inicial adicionado em menos de meia hora de contato com solos do tipo do Argissolo, reconhecidamente argilosos.

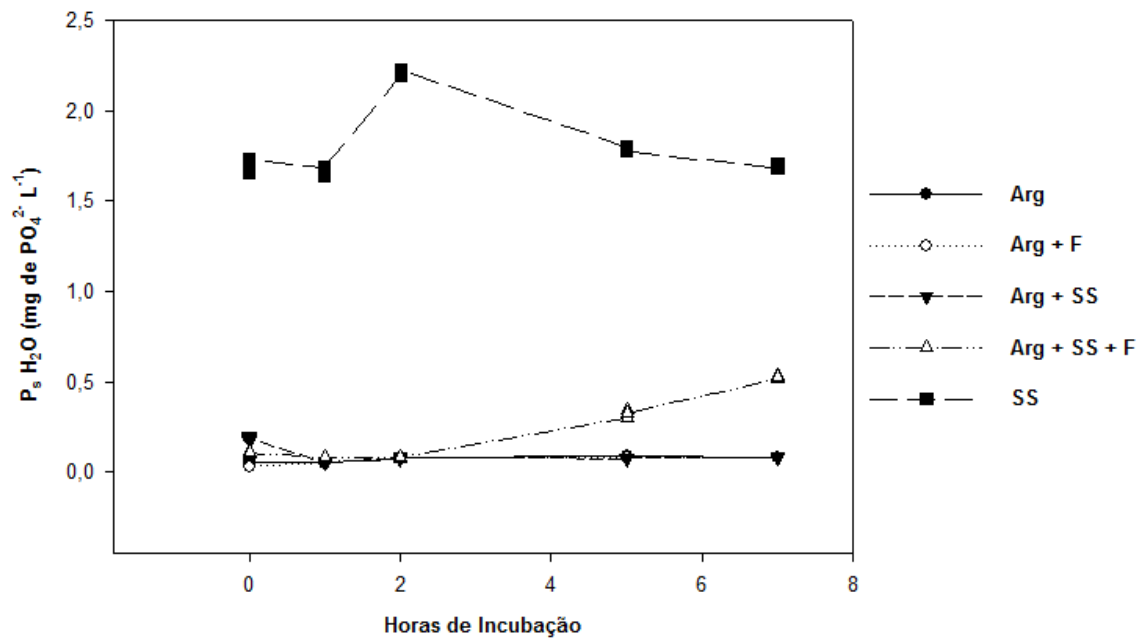


Figura 7. P_s H₂O: Fósforo solúvel em água (mg de PO₄²⁻ L⁻¹) no substrato analisado, de 0 a 7 horas de incubação. Onde, Controle positivo = TCP: Superfosfato simples (SS) diluído em água. Arg = T1: Argissolo Amarelo; Arg + F = T2: Argissolo Amarelo combinado com *Curvularia senegalenses* (3,70*10⁵ UFCs); Arg + SS = T3: Argissolo Amarelo acrescido de superfosfato simples (SS) e; Arg + SS + F = T4: Argissolo Amarelo acrescido de SS combinado com *Curvularia senegalenses* (3,70*10⁵ UFCs), representam os diferentes tratamentos testados.

Nos solos tropicais ácidos e em elevado estágio de intemperismo, o P inorgânico encontra-se principalmente nas formas de fosfatos de ferro e alumínio, mais difíceis de serem solubilizadas via mineralização biológica (Antoun, 2012). Representa um desafio para pesquisa a adoção de tecnologias que possam converter estas formas de P em formas lábeis para serem aproveitadas pelas culturas, aumentando a recuperação pelas plantas. Os valores para aproveitamento do fertilizante estão em torno de 5 a 20% do P aplicado em um ano agrícola (Antoun, 2012). No presente estudo, a bioaugmentação com MSP aplicados no substrato pode modular a dinâmica do P e contribuir com até 30% de aumento na disponibilidade do P em solução pela solubilização de formas insolúveis, mobilização transitória ou adsorção na biomassa introduzida, reduzindo a magnitude de conversão de P-lábil em não lábil e por consequência, aumentando sua disponibilidade para as plantas.

6.4. RESPOSTA DE PLÂNTULAS DE MILHO E TOMATEIRO À BIOINOCULAÇÃO

Tanto no milho como no tomateiro os atributos biométricos analisados – biomassa da parte aérea e do sistema radicular, volume desta raiz e o acúmulo de macronutrientes na parte aérea (N, P, K, Ca, Mg e S) para o tratamento com a aplicação de superfosfato simples (T4) na dose recomendada foram significativamente superiores aos outros tratamentos pelo fato do P estar prontamente disponível (Figuras 8, 9, 10 e 11).

As respostas para milho quanto à aplicação do fungo previamente como solubilizador de P na presença da rocha foram negativas para o acúmulo de MSPA e VR, e positivas para MSR com relação ao controle (TC). O fungo parece contribuir positivamente para o acúmulo de matéria seca das raízes, enquanto que o FNA parece influenciar negativamente (Figura 8) na comparação com plantas controle negativo (T0).

Já em tomateiro (Figura 9), respostas positivas e significativas da aplicação do fungo e sua combinação com FNA foram obtidas quanto ao acúmulo de MSPA, MSR e VR. A resposta relativa de T2 e T3 em relação à recomendação de fertilização com fonte solúvel de P é de 44 e 48%, respectivamente para a cultura do tomate. Ao contrário, para milho, essa eficiência cai pela metade, sendo 28 e 22%, respectivamente, em T2 e T3, em acúmulo de matéria seca da parte aérea (Figuras 8 e 9). Para VR, os resultados demonstram que todos os tratamentos em relação a T4 tiveram menor volume radicular.

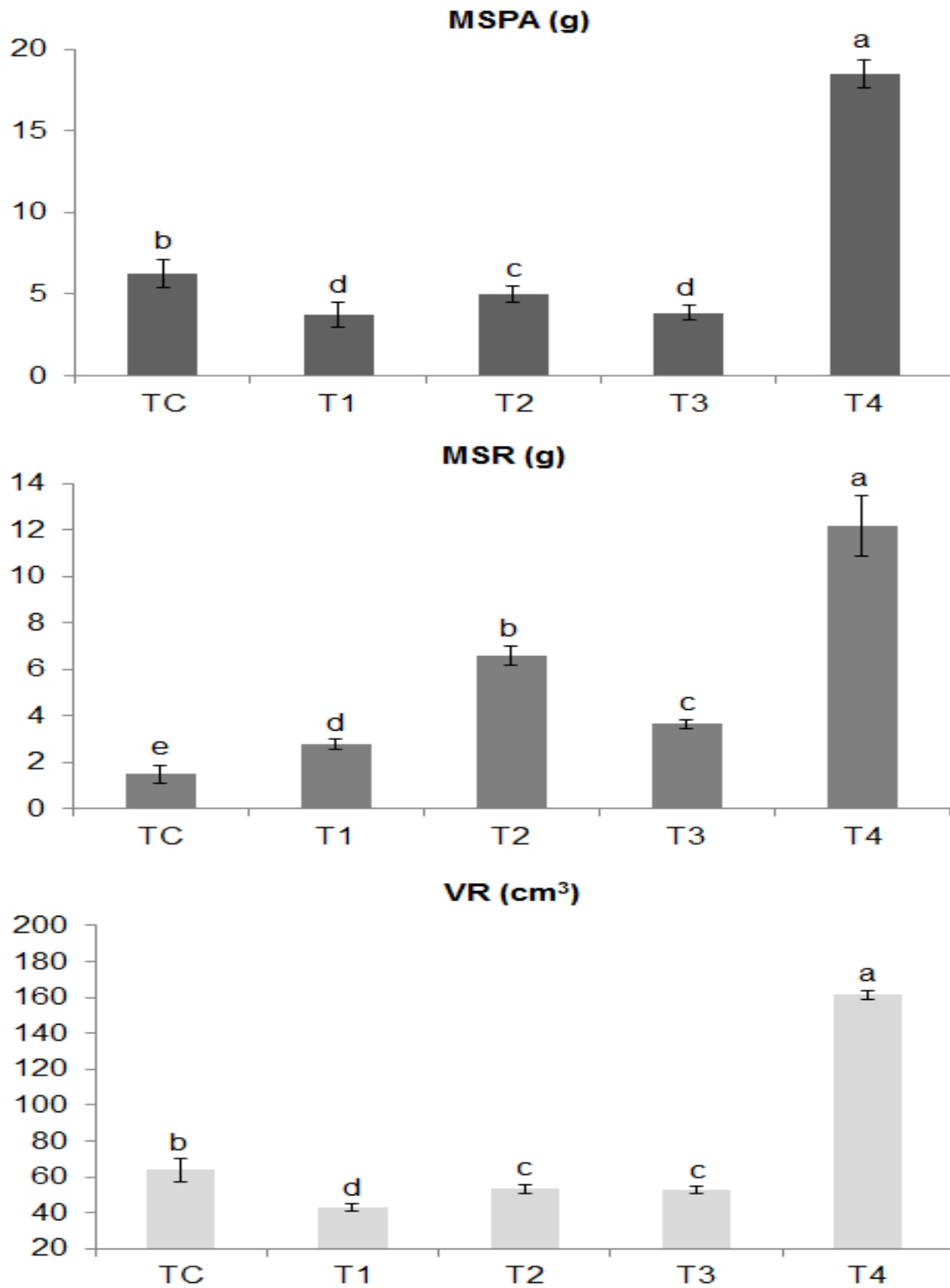


Figura 8. Biometria da parte aérea: MSPA: matéria seca da parte aérea (g) e, do sistema radicular: MSR: matéria seca da raiz e VR: volume radicular do Milho, aos 61 dias de experimentação. Onde: TC: controle negativo (CN), T1: CN+F, T2: CN+FNA, T3: CN+FNA+F e T4: CN+SS. Coeficientes de variação: MSPA= 9,62 %, MSR= 12,02 %, e VR= 4,69 %.

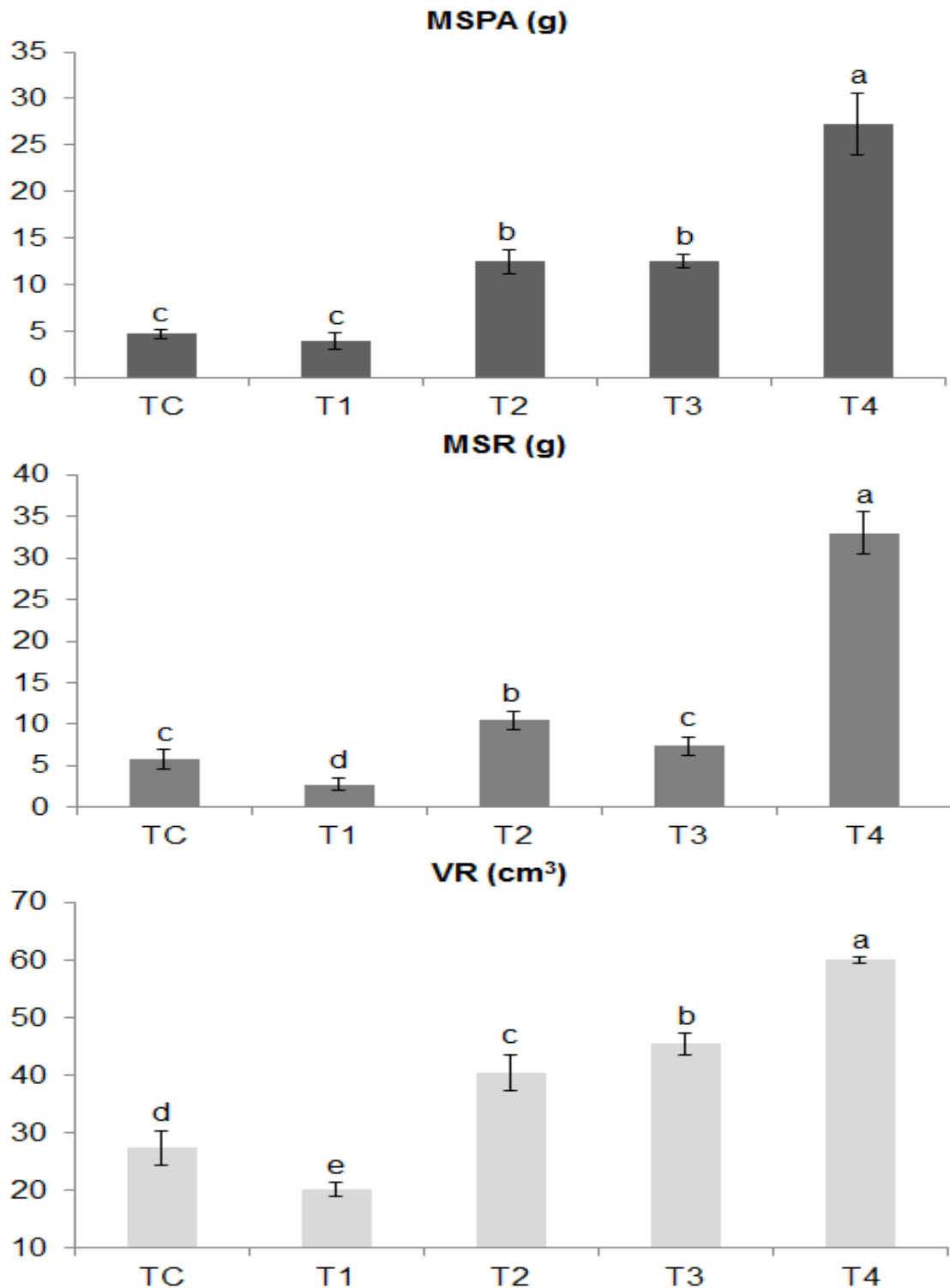


Figura 9. Biometria da parte aérea: MSPA: matéria seca da parte aérea (g) e, do sistema radicular: MSR: matéria seca da raiz e VR: volume radicular do Tomateiro, aos 61 dias de experimentação. Onde: TC: controle negativo (CN), T1: CN+F, T2: CN+FNA, T3: CN+FNA+F e T4: CN+SS. Coeficientes de variação: MSPA= 13,87 %, MSR= 12,18 %, e VR= 5,76 %.

Para as características de biomassa acumulada na parte aérea e raiz (Figura 8 e 9) e o conteúdo de macronutrientes (Figuras 9 e 10) das plantas na presença da suspensão fúngica no substrato com ou sem FNA (T1 e T3) fica

evidente que a inoculação produziu efeitos negativos para as condições experimentais em plantas de milho, visto que foram obtidos incrementos menores ou semelhantes estatisticamente de TC e T2. Este isolado foi obtido da filosfera de cana-de-açúcar e estudos prévios de inoculação não evidenciaram nenhuma resposta deletéria ao crescimento de plantas (dados não mostrados). A resposta de certos bioinoculantes depende do estágio de desenvolvimento da planta, como observado por Olivares et al. (2010), com plantas de milho sob condições a campo e o aperfeiçoamento da resposta a inoculação por este fungo deve ser melhor avaliada em outros estudos.

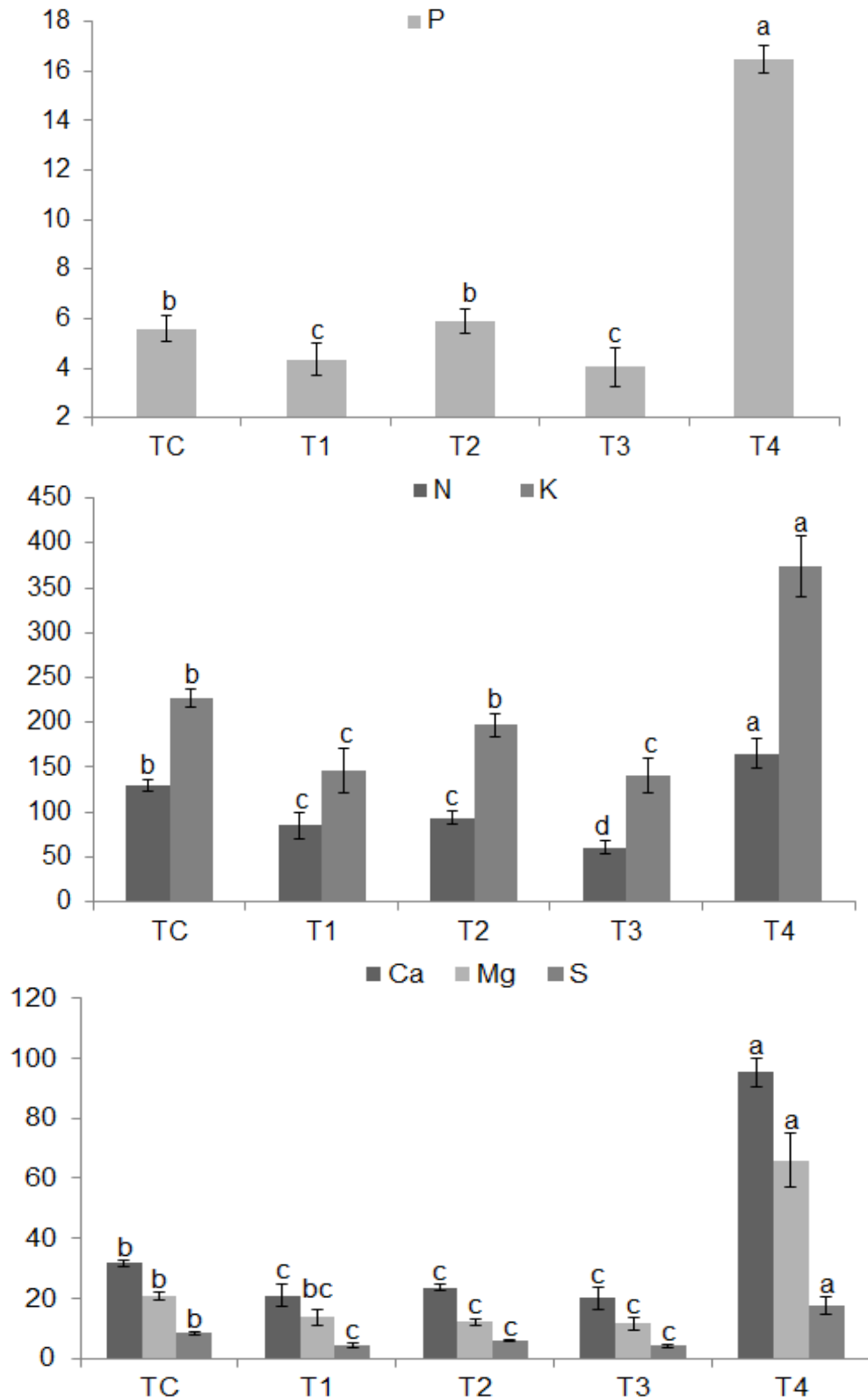


Figura 10. Conteúdo de macronutrientes primários: N: nitrogênio, P: fósforo e K: potássio e, macronutrientes secundários: Ca: cálcio, Mg: magnésio e S: enxofre do Milho, em mg planta⁻¹, aos 61 dias de experimentação. Onde: TC: controle negativo (CN), T1: CN+F, T2: CN+FNA, T3: CN+FNA+F e T4: CN+SS. Coeficientes de variação: N= 10,69%, P= 8,35%, K= 10,10%, Ca= 8,55%, Mg= 17,79% e S= 16,51%.

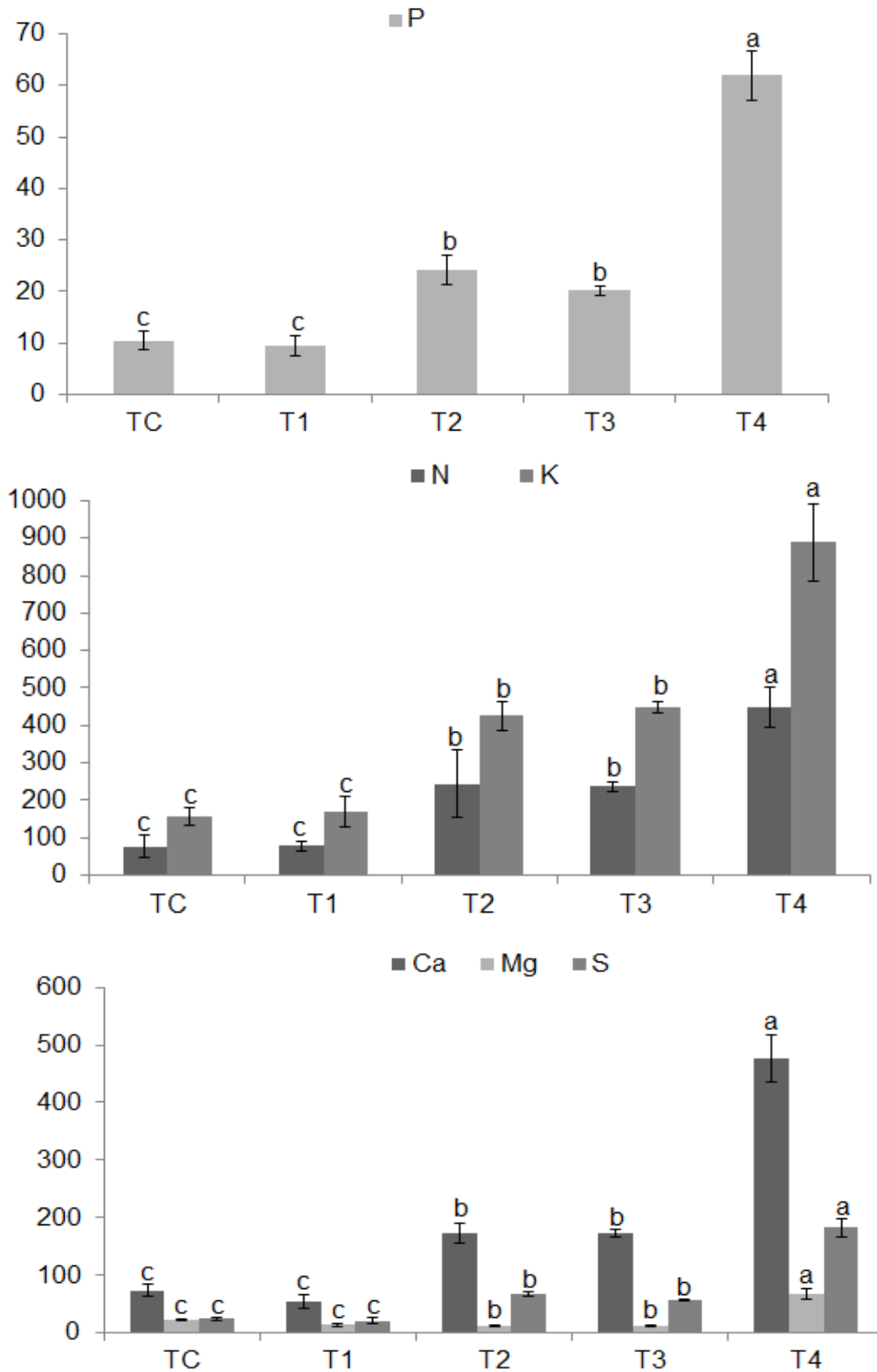


Figura 11. Conteúdo de macronutrientes primários: N: nitrogênio, P: fósforo e K: potássio e, macronutrientes secundários: Ca: cálcio, Mg: magnésio e S: enxofre do Tomateiro, em mg planta⁻¹, aos 61 dias de experimentação. Onde: TC: controle negativo (CN), T1: CN+F, T2: CN+FNA, T3: CN+FNA+F e T4: CN+SS. Coeficientes de variação: N= 23,18%, P= 11,05%, K= 12,76%, Ca= 11,00%, Mg= 11,90% e S= 11,37%.

De forma geral, o acúmulo de nutrientes nas plantas de milho e tomateiro, foi superior quando o substrato para crescimento foi T4, seguido de T2. Considerando o T4 como 100% de incremento médio, T2 (CN+FNA) propiciou 56,41, 52,76, 24,79, 18,38, 35,88 e 33,96%, em incrementos nas plantas de milho do conteúdo de nitrogênio (N), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), fósforo (P) e enxofre (S), respectivamente; enquanto nas plantas de tomate, T2 propiciou 47,92, 54,39, 36,31, 38,87, 18,38 e 36,32%, em incrementos nas plantas de tomate do conteúdo de K, N, Ca, P, Mg e S, respectivamente (Figuras 10 e 11), de acordo com a sequência de importância e os valores de referência desses elementos por cultura (Ribeiro, 1999).

Os resultados de conteúdo de P e a análise do volume de raiz e relação raiz/parte aérea para o milho e o tomate indicam que os tratamentos que promoveram maior crescimento radicular, maior distribuição de raízes no substrato, foram os que as plantas apresentaram maior conteúdo de P e, quando a relação R/PA é alta (Figuras 12 e 13).

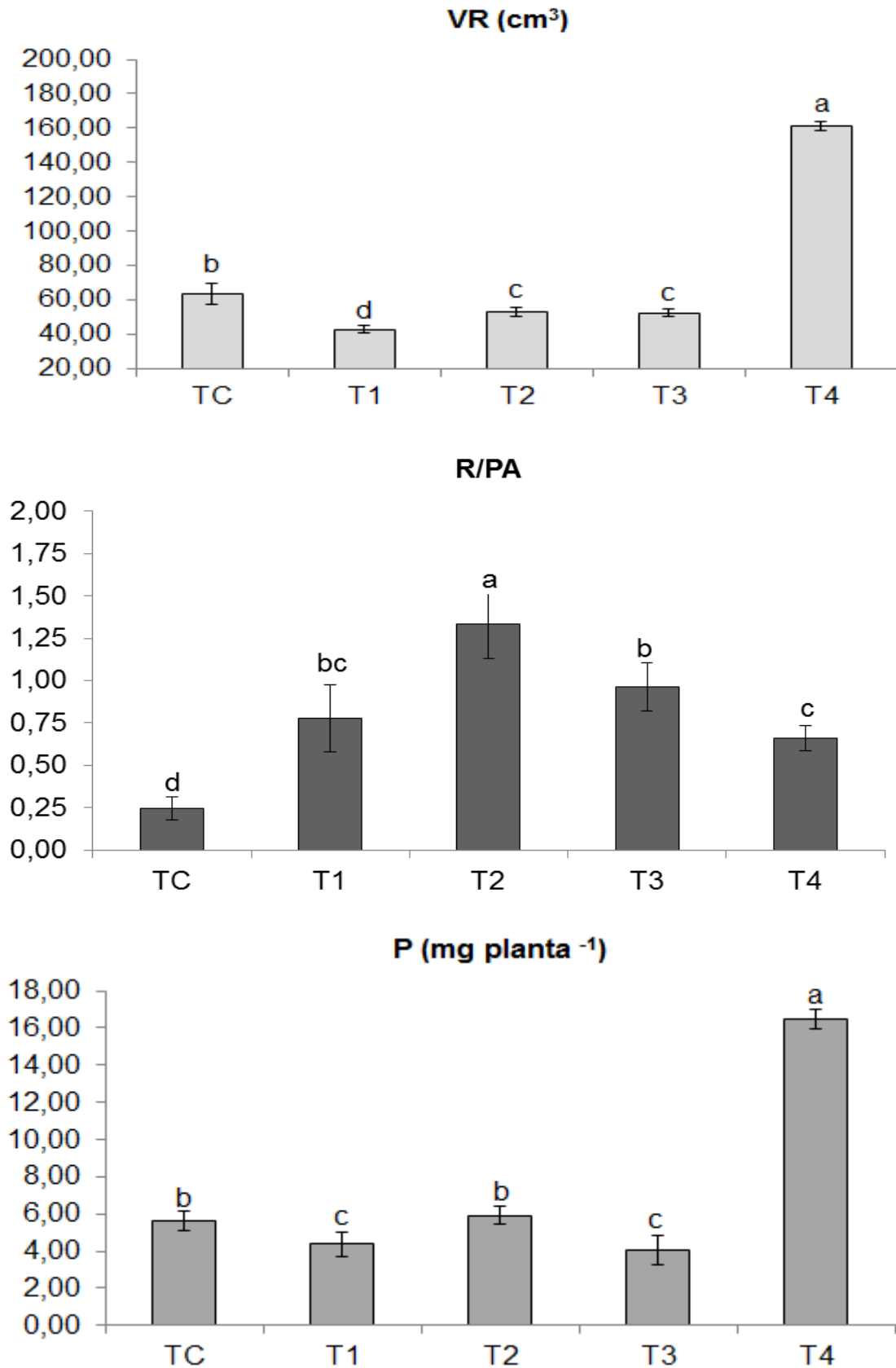


Figura 12. Biometria e conteúdo de P: VR: volume de raiz (cm³), R/PA: relação raiz/parte aérea e, P: conteúdo de fósforo da parte aérea (mg planta⁻¹) do Milho aos 61 dias de experimentação. Onde: TC: controle negativo (CN), T1: CN+F, T2: CN+FNA, T3: CN+FNA+F e T4: CN+SS. Coeficientes de variação: VR= 4,69%, R/PA= 18,80% e P= 8,35%.

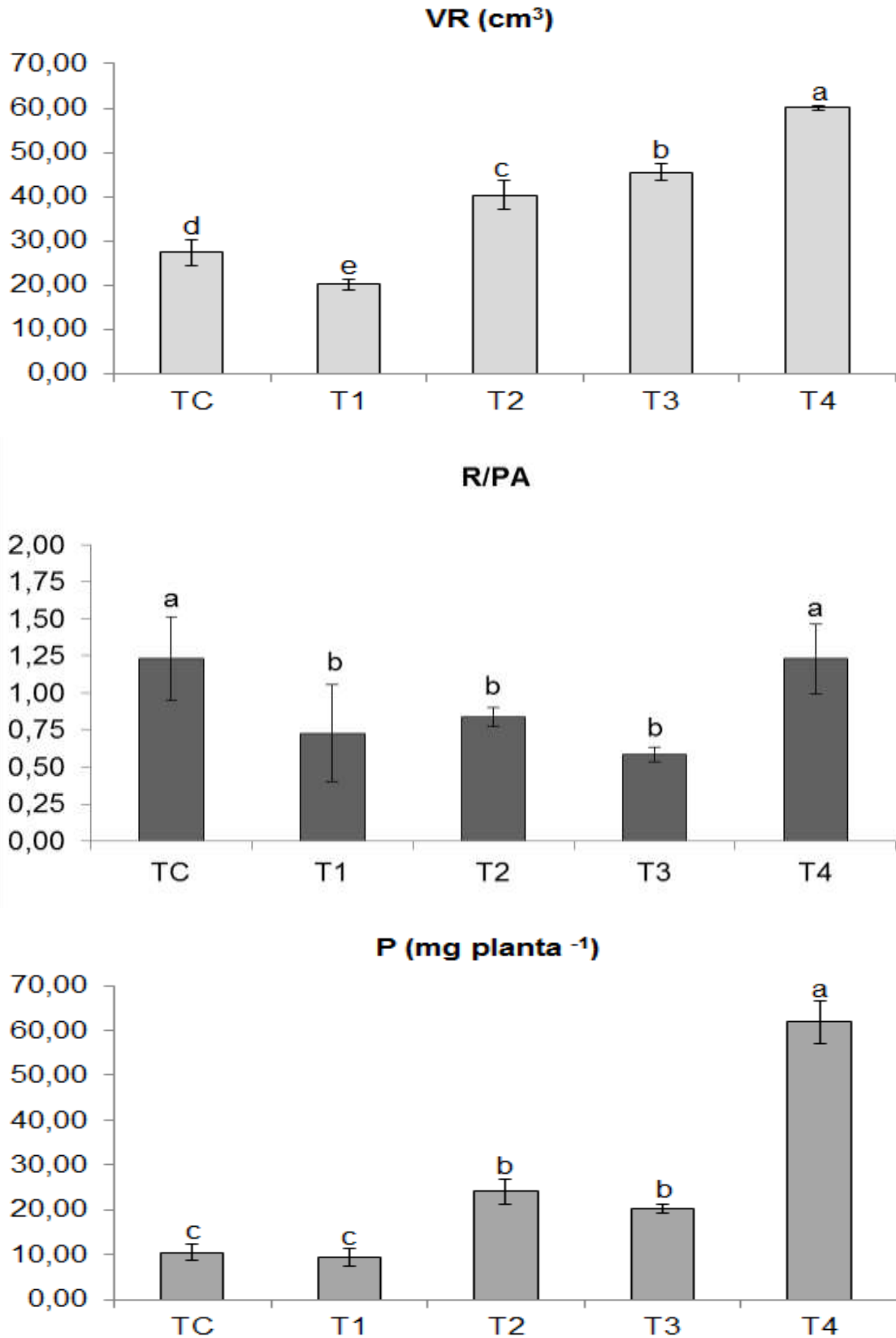


Figura 13. Biometria e conteúdo de P: VR: volume de raiz (cm³), R/PA: relação raiz/parte aérea e, P: conteúdo de fósforo da parte aérea (mg planta⁻¹) do Tomateiro aos 61 dias de experimentação. Onde: TC: controle negativo (CN), T1: CN+F, T2: CN+FNA, T3: CN+FNA+F e T4: CN+SS. Coeficientes de variação: VR= 5,76%, R/PA= 24,14% e P= 11,05%.

6.5. INFLUÊNCIA DO P INCORPORADO E LOCALIZADO EM MILHO

Neste ensaio, a dose de P recomendada para a cultura do milho foi suprida nos diferentes tratamentos pelo incremento da aplicação do P na forma de superfosfato simples (SFS) e a redução correspondente na dose de P na forma de fosfato natural de Araxá (FNA), de sorte que o P total para todos os tratamentos era o mesmo, variando apenas a proporção entre formas prontamente solúveis (industrialmente aciduladas) e pouco solúveis. Estas proporções relativas de SFS e FNA foram testadas em duas formas de aplicação de P no substrato (incorporado e localizado). O efeito das diferentes proporções de SFS-FNA e da localização P sobre o crescimento das plantas foi mostrado nas Figuras 14 e 15. Tal como esperado para solos ricos em sesquióxidos de ferro e alumínio, a interação do P incorporado no substrato aumenta a interação com a superfície da fração argila, resultando na adsorção do P e redução da disponibilidade de P na solução do solo. Consequentemente, as taxas de respostas da planta a doses crescentes de P-solúvel são menores. Contrariamente, a aplicação localizada do P-fertilizante com doses crescentes de SFS aumentou a resposta da planta para todos os parâmetros biométricos avaliados (Figuras 14 e 15). Assim, a aplicação localizada de doses crescentes de P-solúvel claramente proporcionou respostas incrementais mais positivas para todos os atributos biométricos analisados em relação à aplicação por incorporação em volume total do fertilizante no substrato (Figuras 14 e 15). A aplicação localizada de P reduz a interface contato entre as fontes de P (Gonçalves et al., 1985; Fernandes, 2006) e o complexo sortivo do solo capaz de fixá-lo, tornando relativamente mais disponível para as plantas (Novais e Smyth, 1999).

Outro aspecto relevante deste ensaio resulta da possibilidade da substituição parcial das demandas nutricionais na forma de P-solúvel como SFS e sua substituição parcial por FNA, sem comprometimento da produtividade da cultura do milho. Nos diferentes tratamentos relacionados à proporção relativa entre SFS: FNA, as características biométricas das plantas de milho foram superiores nos tratamentos contendo alta proporção percentual de SFS:FNA (100: 00 %, 80: 20 %, 60: 40 %). Contrariamente, baixas proporções percentuais de SFS em relação a FNA (0: 100 %, 20:80 %) resultaram em menores respostas da planta. Para estudos subsequentes envolvendo aplicação de micro-organismos

solubilizadores de P, foi selecionado o tratamento das 40:60 % (SFS:FNA). Embora esta proporção seja considerada subótima para plantas de milho, considera-se que na presença de MSP selecionados, a solubilização do P oriundo do FNA possa contribuir mais efetivamente para o P-disponível para planta, resultando em maior eficiência econômica e ecológica para aplicação de fontes solúveis e de baixa solubilidade de P. Ademais, esta proporção resultou em efeitos positivos na massa radicular, similares aos obtidos para taxas de aplicação mais elevadas de SFS na forma localizada (Figura 15). Assim, considerando que o desenvolvimento das raízes é um fator importante para melhorar a exploração do volume de solo, associado à importância econômica e ecológica da redução da dose de superfosfato simples, a proporção de 40:60 % (SFS:FNA) foi adotada, esta recomendada em aplicação localizada no substrato Argissolo Amarelo para estudos subsequentes envolvendo a exploração do potencial de MSP e substâncias húmicas.

A literatura aponta que quanto mais reativo for o fosfato aplicado, mais prejudicial será o efeito do tempo de contato com o solo sobre sua disponibilidade para as plantas (Novais et al., 2007). A combinação de fontes de P com diferentes solubilidades representa uma estratégia de manejo interessante na medida em que minimiza o efeito deletério do tempo de contato da matriz solo com fontes de P altamente solúveis. A combinação de proporções relativas de fontes com diferentes reatividades reduz a rápida imobilização de P pelo solo e incrementa os níveis de P disponíveis em solução no curso do tempo. Esta estratégia deve levar em consideração as demandas P e a exigência relativa nas diferentes fases do ciclo ontogênico da planta.

Importante ressaltar que os programas de melhoramento para variedades de milho selecionam genótipos em condições de alta fertilidade do solo, resultando em plantas com elevada exigência de nutrientes para obtenção de altas produções (Fernandes, 2006). Esta base genética de seleção deve ser revista, pois não é favorável ao incremento do uso de insumos biológicos em sistemas de produção que fornecem nutrientes em taxas mais baixas, maior eficiência de uso, ecologicamente mais corretos e o menor custo por unidade do produto.

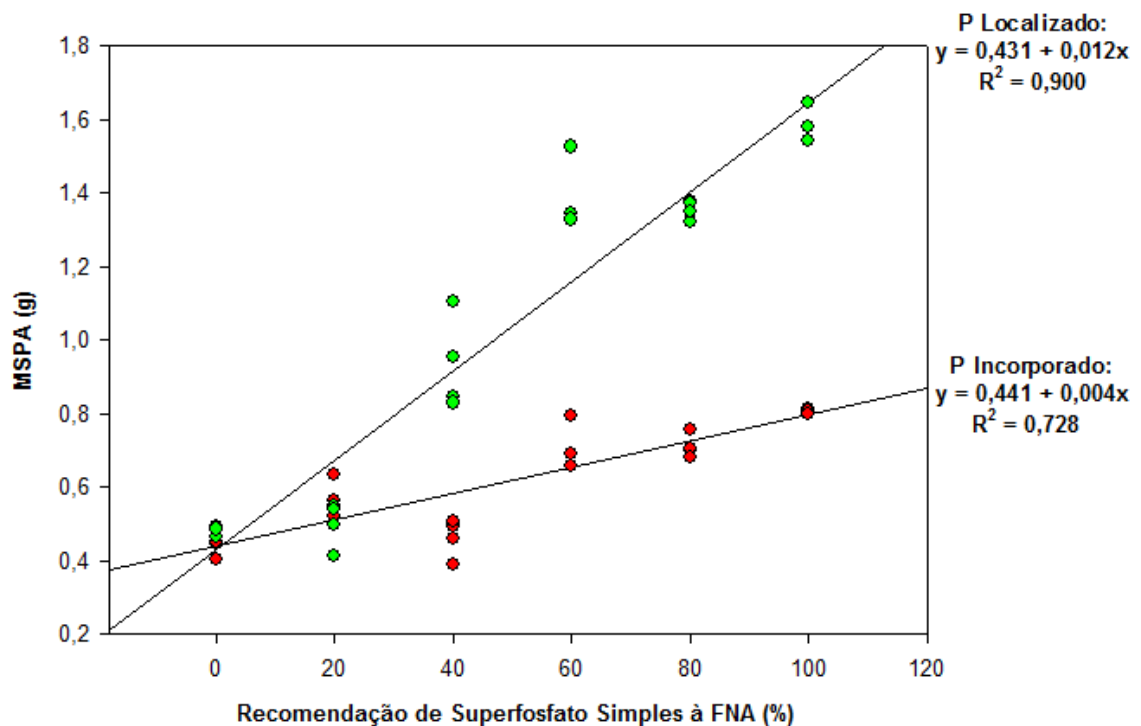
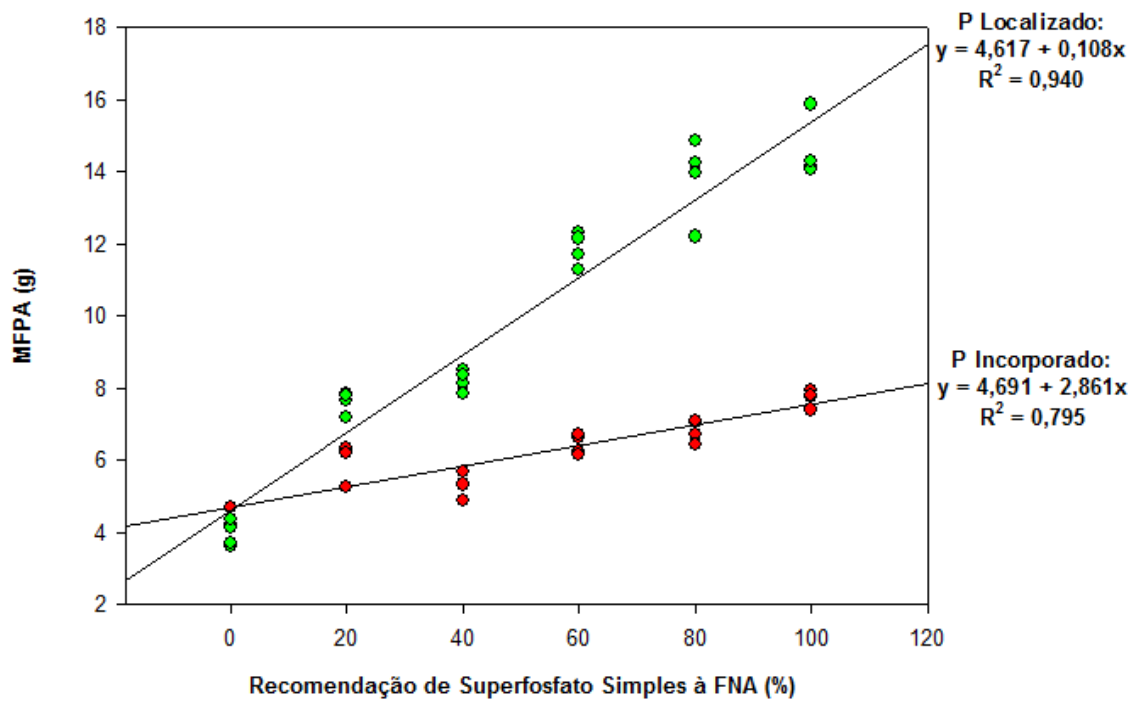


Figura 14. MFPA e MSPA: matéria fresca e seca da parte aérea (g) de milho sob fertilização fosfática incorporada e localizada no substrato, aos 30 dias de experimentação. Onde: 0, 20, 40, 60, 80 e 100% da recomendação com superfosfato simples combinado a 100, 80, 60, 40, 20 e 0% da recomendação com fosfato natural de Araxá (FNA).

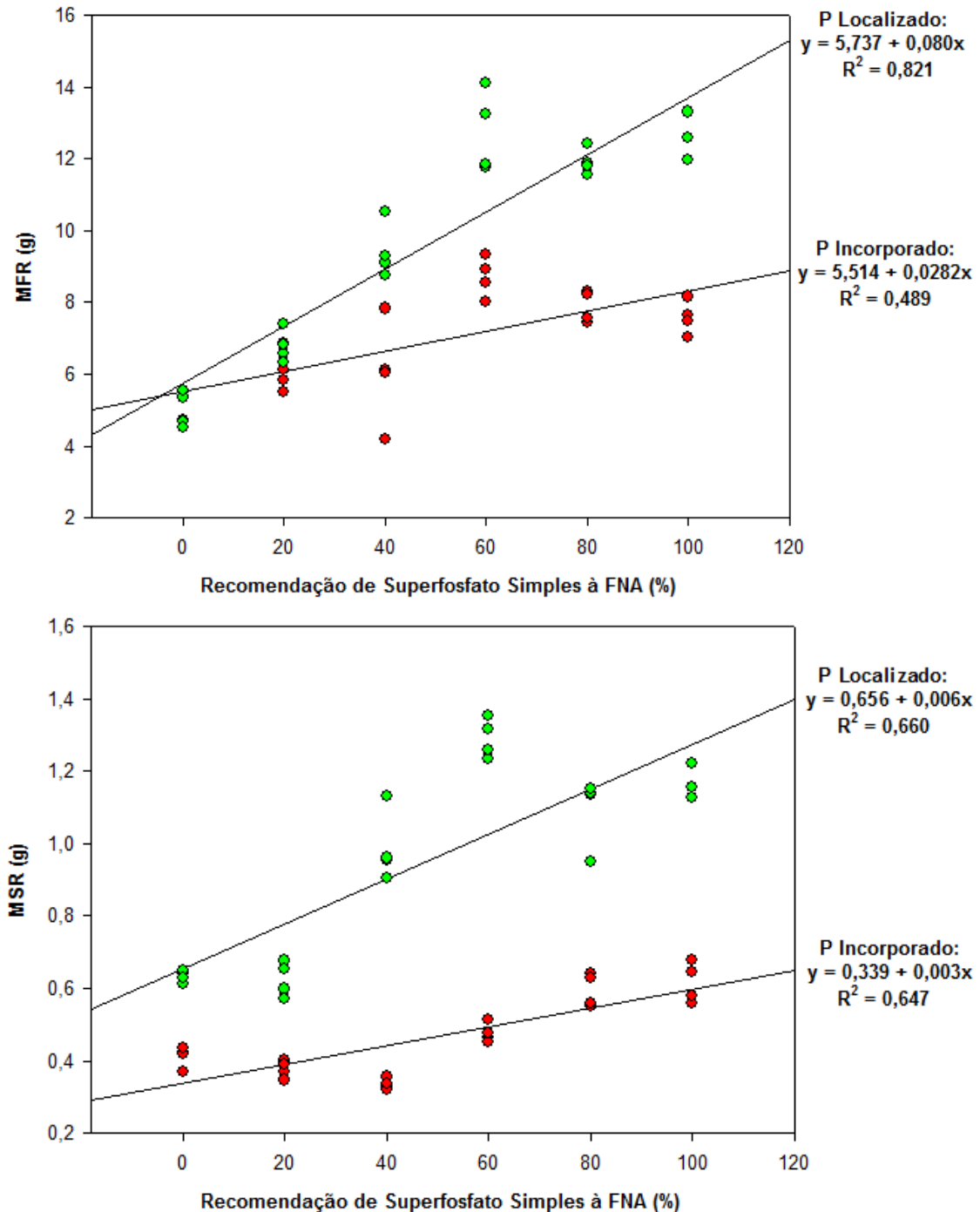


Figura 15. MFR e MSR: matéria fresca e seca da raiz (g) de milho sob fertilização fosfática incorporada e localizada no substrato, aos 30 dias de experimentação. Onde: 0, 20, 40, 60, 80 e 100% da recomendação com superfosfato simples combinado a 100, 80, 60, 40, 20 e 0% da recomendação com fosfato natural de Araxá (FNA).

O crescimento das raízes expresso como volume radicular foi igualmente sensível ao aumento da disponibilidade de P solúvel tanto pelo efeito das proporções crescentes de P na forma de superfosfato simples, como também pela aplicação localizada de P (Figura 16), resultando em maiores conteúdos de P tanto na parte aérea como na raiz (Figuras 18 e 19). Além de minimizar a

interação do P-solúvel com a fração argila do solo, a aplicação localizada pode ter favorecido uma rápida absorção radicular do P e adequada compatibilização com as demandas iniciais da planta, favorecendo os incrementos de biomassa da raiz e parte aérea (Figura 18 e 19).

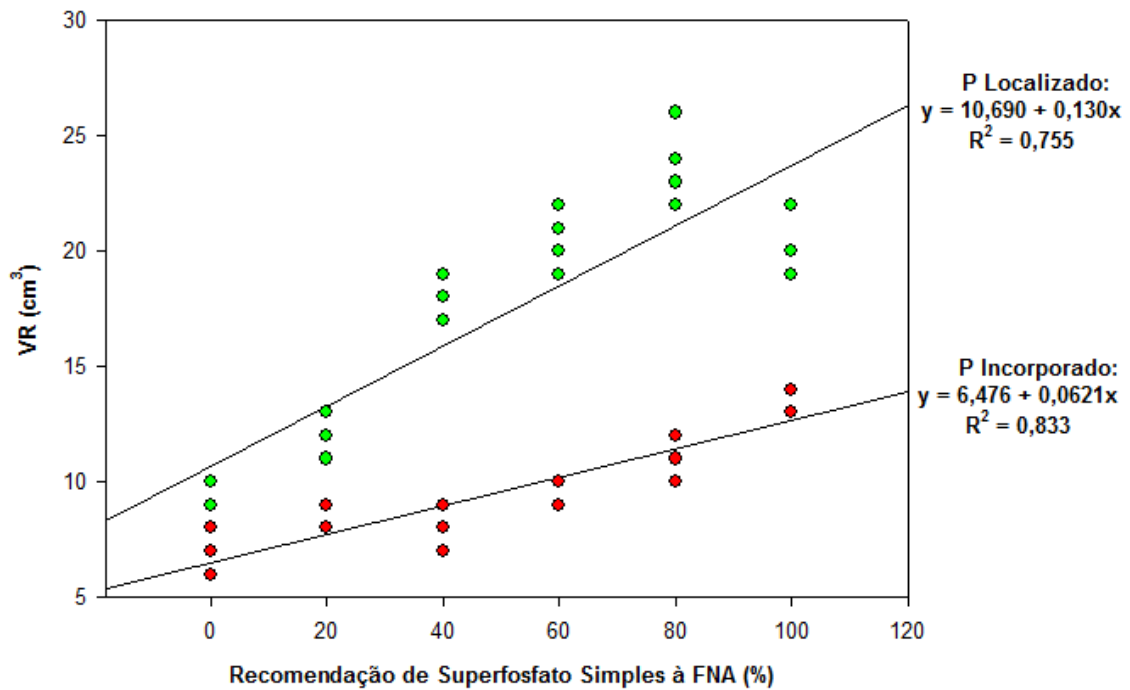


Figura 16. VR: volume de raiz (cm³) de milho sob fertilização fosfática incorporada e localizada no substrato, aos 30 dias de experimentação. Onde: 0, 20, 40, 60, 80 e 100% da recomendação com superfosfato simples combinado a 100, 80, 60, 40, 20 e 0% da recomendação com fosfato natural de Araxá (FNA).

O crescimento radicular é fortemente afetado pela disponibilidade de nutrientes. À medida que aumenta a disponibilidade de nutrientes no solo, as raízes proliferam. Plantas cultivadas sem limitações de nutrientes e água alocam mais recurso para a parte aérea do que para as raízes, e essa mudança nos padrões de alocação, principalmente do fósforo, muito móvel no tecido vegetal, resulta em maior produtividade (Bloom et al., 1993; Taiz e Zeiger, 2013), o que pode ser notado pela observação da Figura 17, onde com os aumentos de dose de superfosfato simples em relação à fosfato natural de Araxá implicam na redução da relação raiz/parte aérea (R/Pa), principalmente no tratamento P-localizado.

No caso da aplicação não localizada, em função da baixa disponibilidade de P em solução (dreno solo), o atributo R/Pa para P-incorporado permanece quase que constante, a limitada absorção, afeta o transporte de P para a parte aérea e resulta em partição desequilibrada de matéria seca entre raiz e parte

aérea. Dessa maneira, as raízes crescem proporcionalmente mais do que a parte aérea (Figura 17). Quando nutrientes como N e P limitam o crescimento vegetal, as raízes transformam-se em forte dreno de carboidratos, causando maior limitação ao crescimento da parte aérea do que da raiz, o que aumenta a razão entre a massa de raiz e parte aérea. A concentração de P na parte aérea teria um papel central na regulação da taxa de absorção de P por unidade de raiz, na partição de biomassa entre raiz e parte aérea e na taxa de crescimento relativo da planta (Fernandes, 2006).

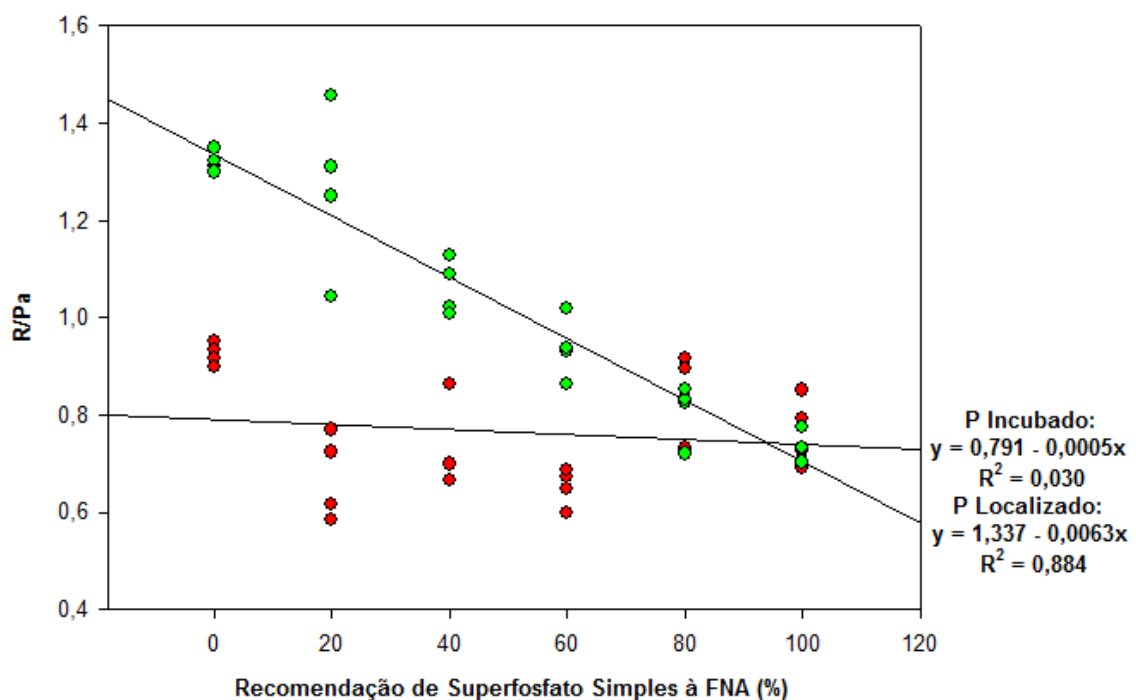


Figura 17. R/Pa: razão matéria seca da raiz: matéria seca da parte aérea de milho sob fertilização fosfática incorporada e localizada no substrato, aos 30 dias de experimentação. Onde: 0, 20, 40, 60, 80 e 100% da recomendação com superfosfato simples combinado a 100, 80, 60, 40, 20 e 0% da recomendação com fosfato natural de Araxá (FNA).

Por comparação entre as formas de aplicação, P-localizado resultou em maiores conteúdos de P na biomassa de milho como expresso para o CPPA e CPR (Figuras 18 e 19) para todas as combinações de razão crescente de superfosfato simples e decrescente de fosfato de rocha de Araxá. É reconhecido que em poucos minutos, o P em solução pode ser adsorvido e, com o passar de poucas horas, indisponibilizado pela fixação em solos intemperizados e argilosos (neste estudo e em Gonçalves et al., 1985). Assim, o P incorporado em todo perfil está muito susceptível a reações químicas que o torna indisponível, resultando em baixas respostas à aplicação do P-fertilizante.

As diferenças foram mais marcantes para o acúmulo de P na biomassa radicular (Figura 18) e ficaram evidentes a partir da incorporação de 40% de superfosfatos simples no total de P aplicado (Figura 19). O incremento da dose de P prontamente solúvel na quantidade total de P fornecido com fontes combinadas resultou em incrementos crescentes com resposta linear para as duas formas de aplicação, tanto na parte aérea como nas raízes das plantas de milho. Claramente, as taxas de incremento foram mais pronunciadas quando o P foi aplicado na forma localizada, resultando em maiores concentrações de P-lábil em solução, prontamente disponíveis para absorção e translocação para parte aérea em fase do ciclo (30 dias após a germinação) de elevada demanda de P (Malavolta et al., 1997).

Nos tratamentos com maiores proporções da insolúvel de P (FNA), a reatividade e conseqüente solubilização do P depende da geração de acidez em processos químicos e bioquímicos naturais no solo. Esta dependência explica o fato da aplicação de P localizada produzir maior biomassa e acúmulo de P com relação à aplicação em volume total, pois os processos de acidificação na rizosfera são mais efetivos e quando associados ao menor contato do fertilizante com a matrix do solo (dreno de P), resultam em respostas de crescimento vegetal mais significativas. A acidificação Remete-se ao fato de que a fonte insolúvel de P: FNA, muito menos reativa, depende de acidez para sua disponibilização como fonte de P solúvel, por isso há grande diferença entre ser a fonte de acidez do solo ou planta (rizosfera), visto que de modo preferencial, este P é direcionado ao dreno solo ou planta, respectivamente. A acidificação proporcionada pela raiz, junto às partículas do FNA, incrementa a dissolução favorecendo a planta, e por outro lado, a queda do pH do solo, tem como dreno exclusivo do P liberado, o próprio solo (Novais et al., 2007).

Em virtude das fortes reações de adsorção de P nos coloides minerais de carga variável, a adubação fosfatada tem eficiência muito baixa nas regiões tropicais, registrando-se uma recuperação pelas culturas de 5 a 20% do P aplicado em um ano agrícola. Deve-se registrar que, nos atuais ritmos de exploração, as reservas conhecidas de apatita de baixo custo de mineração para fabricação de fertilizantes fosfatados, para o atual padrão de consumo, devem esgotar-se dentro de 60 a 80 anos (Fernandes, 2006).

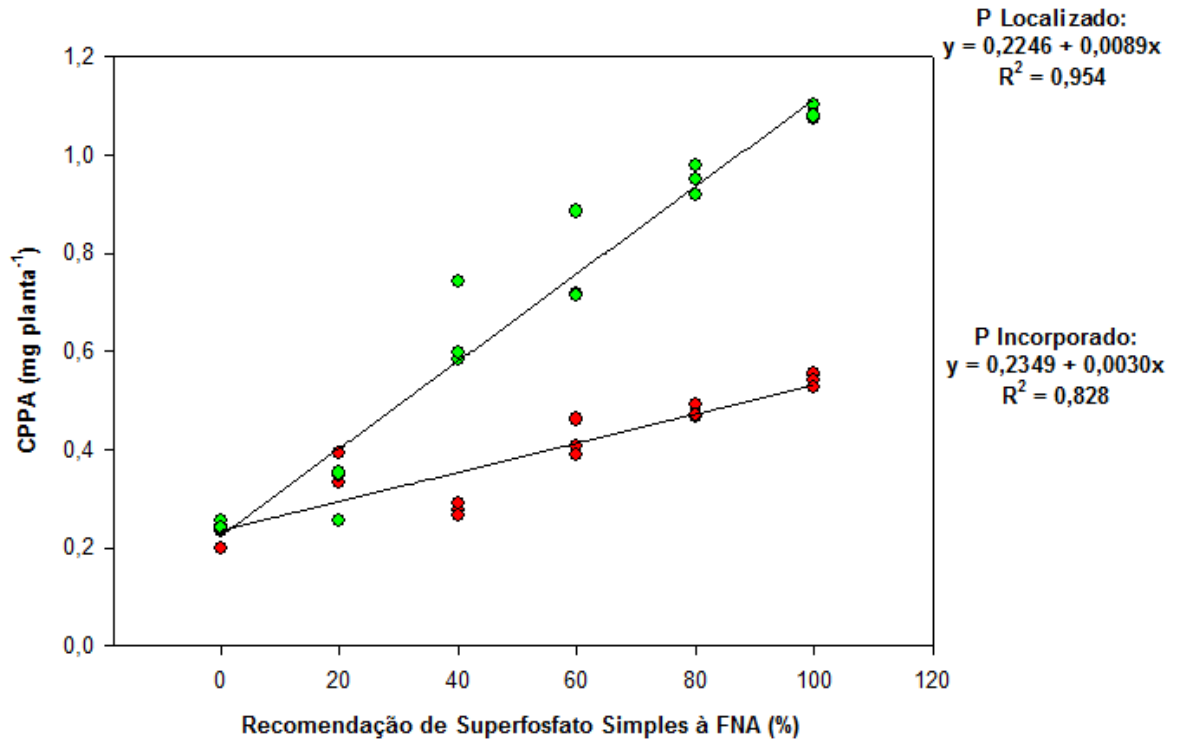


Figura 18. CPPA: conteúdo de fósforo da parte aérea de milho sob fertilização fosfática incorporada e localizada no substrato, aos 30 dias de experimentação. Onde: 0, 20, 40, 60, 80 e 100% da recomendação com superfosfato simples combinado a 100, 80, 60, 40, 20 e 0% da recomendação com fosfato natural de Araxá (FNA).

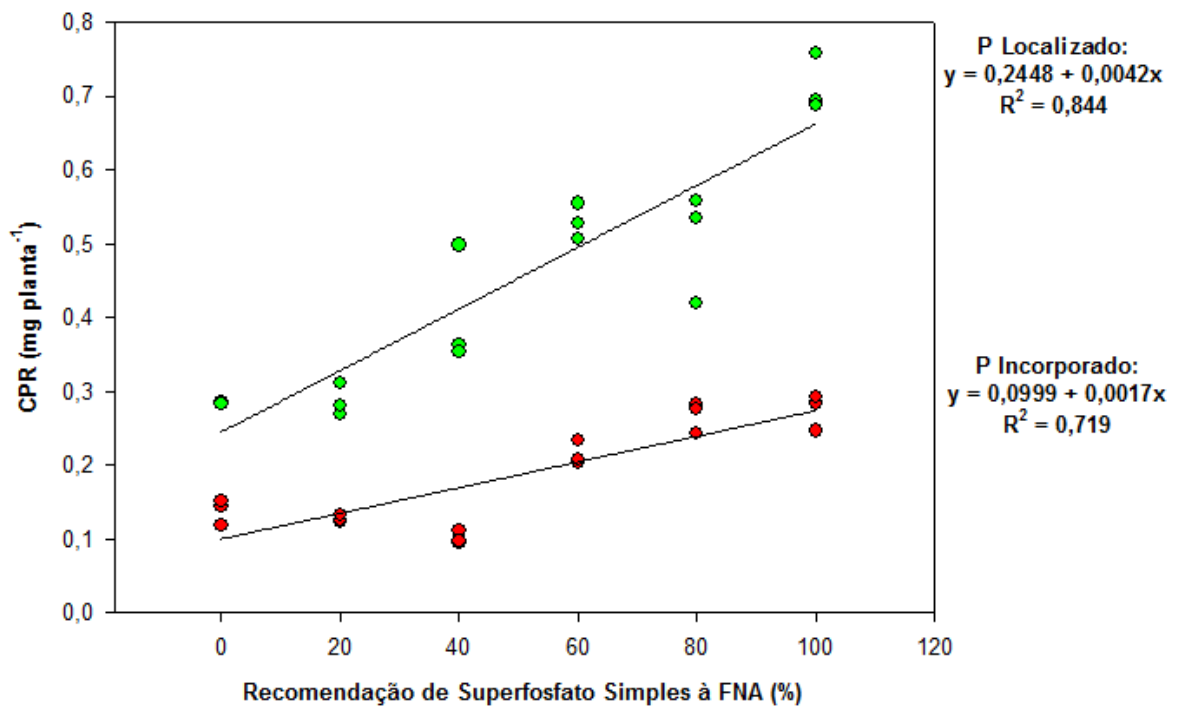


Figura 19. CPR: conteúdo de fósforo da raiz de milho sob fertilização fosfática incorporada e localizada no substrato, aos 30 dias de experimentação. Onde: 0, 20, 40, 60, 80 e 100% da recomendação com superfosfato simples combinado a 100, 80, 60, 40, 20 e 0% da recomendação com fosfato natural de Araxá (FNA).

Estudos relacionados à melhoria de eficiência de uso de P envolvem o manejo de fontes, doses, formas de aplicação, intensificação de processos microbianos e novas tecnologias de bioinoculação e sua compatibilização com as demandas da planta. As figuras 20 e 21 mostram o *status* das plantas de milho com P aplicado de forma incorporada e localizada, respectivamente, após os 30 dias de experimentação.



Figura 20. P aplicado de forma incorporada, em todo perfil do substrato das plantas de milho.



Figura 21. P aplicado de forma localizada, próximo às raízes das plantas de milho.

6.6. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MSP NA NUTRIÇÃO DE P EM PLANTAS DE MILHO

No presente ensaio objetivou-se avaliar o efeito do fosfato natural de Araxá (FNA) aplicado de forma localizada e micro-organismos solubilizadores previamente selecionados na nutrição fosfatada e crescimento inicial de plantas de milho. Pela observação da figura 22A, pode concluir que a aplicação de micro-organismos solubilizadores e a sua combinação apresentaram acumulação de massa seca de parte aérea entre 80 a 85% inferiores ao tratamento que recebeu uma fonte solúvel de P (T1). Verifica-se ainda que a inoculação mista com *Serratia marcescens* estirpe BAC22 e *Burkholderia* sp. estirpe BAC14H apresentou os menores valores para MSPA, diferindo inclusive do controle não inoculado (T0), aplicação de FNA (T2), aplicação do fungo (T4) e sua combinação com bactérias (T5). Esta ausência de resposta e inoculação com bactéria pode ser parcialmente explicada pela deficiência de P no substrato e pela menor habilidade das bactérias solubilizarem P contido na fração mineral do substrato. Ademais, outros fatores edafoclimáticos podem contribuir para respostas

negativas à aplicação de bactéria (Boddey e Döbereiner, 1988; Bashan e Holguin 1997; Olivares et al., 2010 e Gaskin et al., 2010).

O tratamento T1 apresentou o maior acúmulo de massa seca das raízes. No entanto, plantas inoculadas com a combinação dos fungos *Curvularia senegalensis* F5 e o isolado F309 apresentaram respostas positivas e significativas com relação ao tratamento que recebeu FNA e plantas controle, com 35% e 25% superior em MSR e VR, respectivamente. (Figura 22B). Estes resultados apontam para um claro efeito biomineralizador no sistema solo-planta na ausência de FNA e a possibilidade de melhoria desta atividade na direção da redução de dependência de fontes de P solúveis. Além disso, seguindo a tendência dos resultados de MSR, o tratamento com os fungos estimulou também um maior volume radicular (VR) (Figura 22C), sendo inferiores ao tratamento com superfosfato simples.

Os tratamentos inoculados com a mistura de bactérias e sua combinação com fungos não estimularam o acúmulo de biomassa e volume radicular, não diferindo estatisticamente das plantas controle. A demanda energética da planta, principalmente submetida a populações aumentadas de micro-organismos introduzidos como bioinoculantes, associada à deficiência de P no substrato podem ter contribuído para as respostas observadas.

Plantas com a nutrição fosfatada mais adequada e sem limitações de outros nutrientes apresentam um maior crescimento radicular, após absorção deste P solúvel localizado, o que repercutiu em maior ganho de matéria seca da parte aérea em relação ainda à matéria seca de raiz. Logo, a menor razão raiz/parte aérea (R/PA), o que aponta para níveis nutricionais mais favoráveis das plantas em T1 (Figura 23), sendo confirmado pelo maior conteúdo de fósforo da parte aérea (CPPA) ao conteúdo de fósforo da raiz (CPR), logo CPPA a CPR.

Plantas jovens supridas com fósforo com disponibilidade imediata desenvolvem sistemas radiculares com pelos mais ativos (raízes pilíferas de pós-germinação), tanto na absorção de fosfato (Figura 23 e 24), quanto na absorção de nitrogênio (Figura 25) e demais nutrientes, o que resulta em uma translocação de P mais rápida para a parte aérea explicando a maior relação CPPA/CPR (Figura 23) (Grant et al., 2001; Alves et al., 2002; Silva e Delatorre, 2009; Taiz e Zeiger, 2013), contrariamente aos tratamentos inoculados sem fonte de P via fertilização.

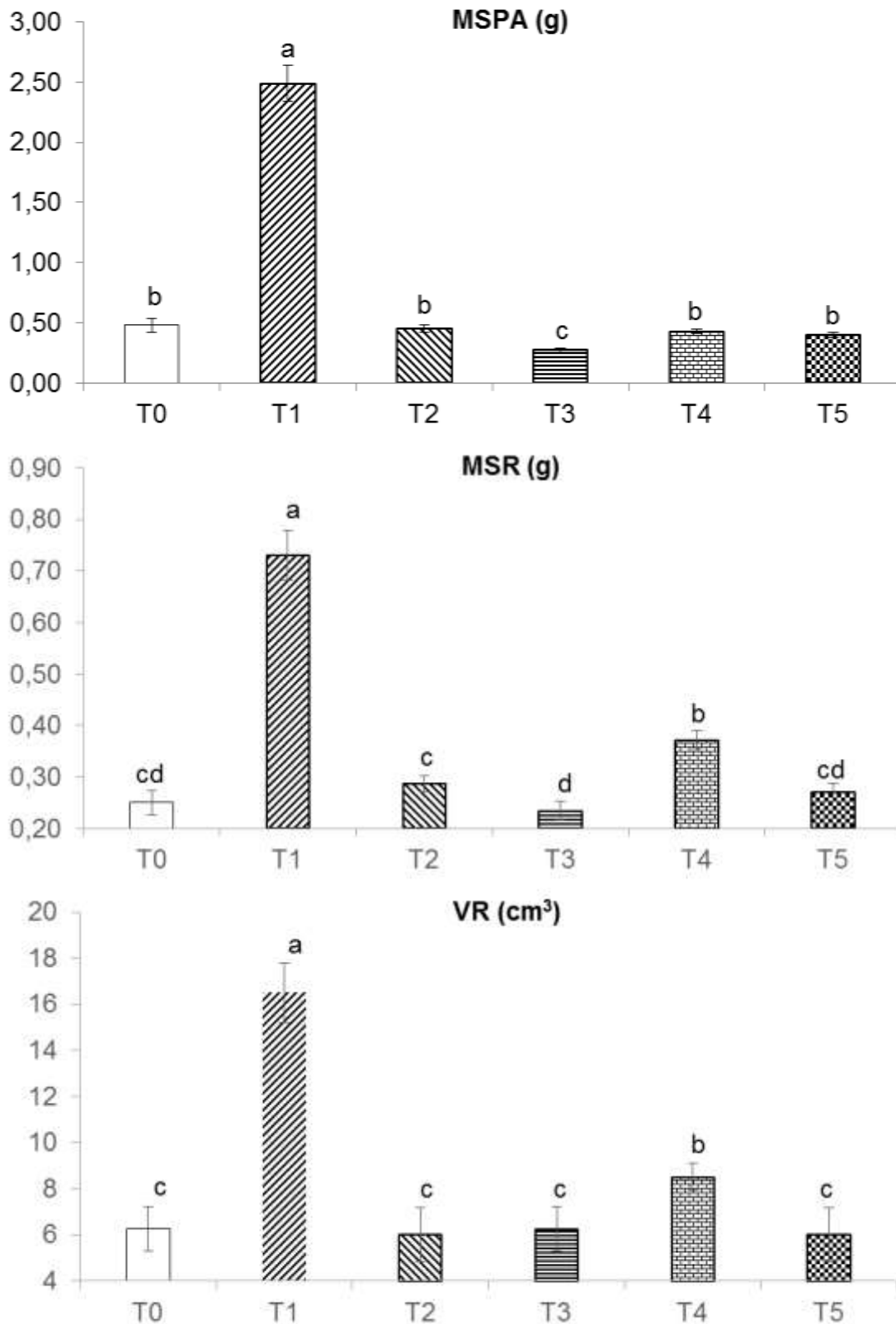


Figura 22. Biometria da parte aérea: MSPA (A): matéria seca da parte aérea (g) e, do sistema radicular: MSR (B): matéria seca da raiz e VR (C): volume radicular do Milho, aos 30 dias de experimentação. Onde: T0: (-), T1: 0,4SS, T2: 0,6FNA, T3: Bs e T4: Fs e T5: Bs+Fs. Coeficientes de variação: MSPA= 9,46 %, MSR= 7,62 %, e VR= 13,03 %.

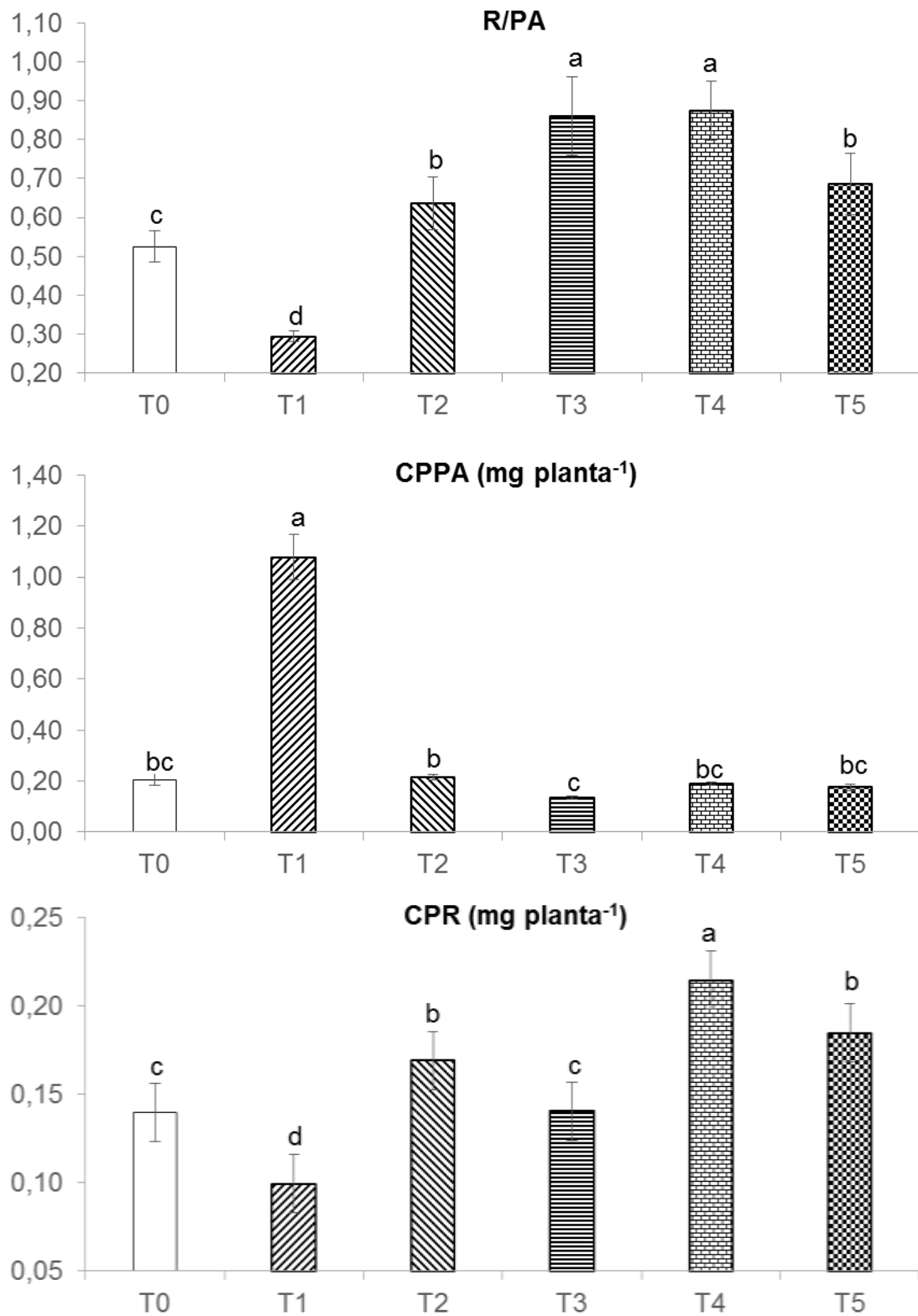


Figura 23. Biometria e conteúdo de P: R/PA: relação raiz/parte aérea, CPPA e CPR: conteúdo de P da parte aérea e da raiz do milho, respectivamente, aos 30 dias de experimentação. Onde: T0: (-), T1: 0,4SS, T2: 0,6FNA, T3: Bs e T4: Fs e T5: Bs+Fs. Coeficientes de variação: R/PA= 10,46 %, CPPA= 11,78 %, e CPR= 6,77 %.

Tanto o conteúdo de fósforo da parte aérea e total (CPPA e CPT), quanto o conteúdo de nitrogênio da parte aérea (CNPA), (Figuras 23 e 25, respectivamente) foram superiores em plantas de milho que receberam fertilização sintética solúvel – T1, consequência da maior biomassa do sistema radicular, que neste caso, resultou em maior aproveitamento da fonte de N aplicada (Figura 25) em cobertura, logo, aumentando-se a disponibilidade de nutrientes “acessíveis” pela planta no substrato, as raízes proliferam (Figura 22) (Primavesi, 2002; Alves et al., 2002; Silva e Delatorre, 2009), aproveitando ainda mais os nutrientes na rizosfera., o que não acontece com os tratamentos microbianos, tendo em vista a ausência de uma fonte de P exógena.

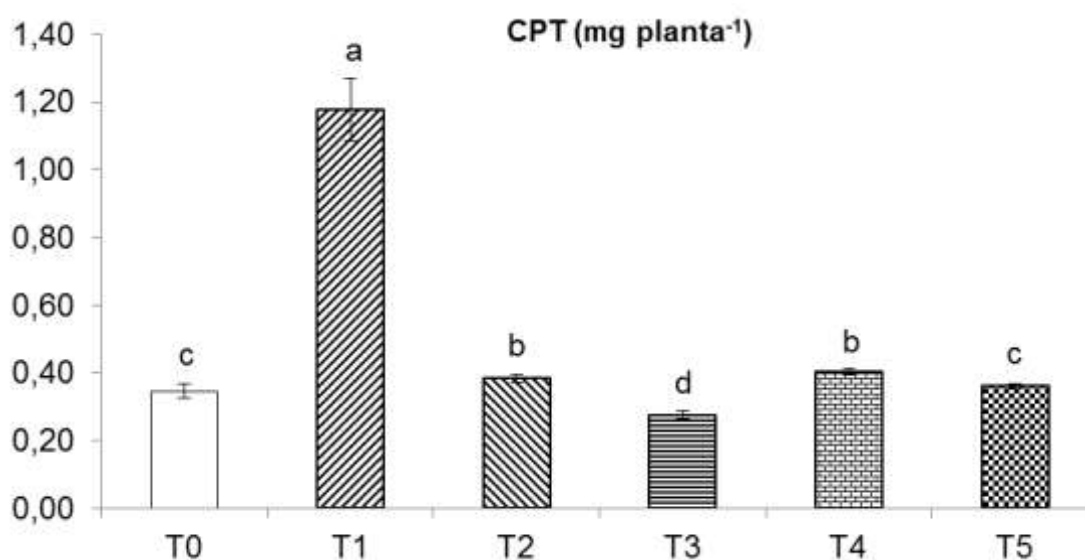


Figura 24. Conteúdo de P: CPT: conteúdo de P total do milho, aos 30 dias de experimentação. Onde: T0: (-), T1: 0,4SS, T2: 0,6FNA, T3: Bs e T4: Fs e T5: Bs+Fs. Coeficiente de variação: CPT= 9,28 %.

A solubilização do FNA em T2 (Figura 24) por micro-organismos nativos contidos no substrato Argissolo Amarelo se refletiu diretamente no CPT, quando comparou a T1 (controle).

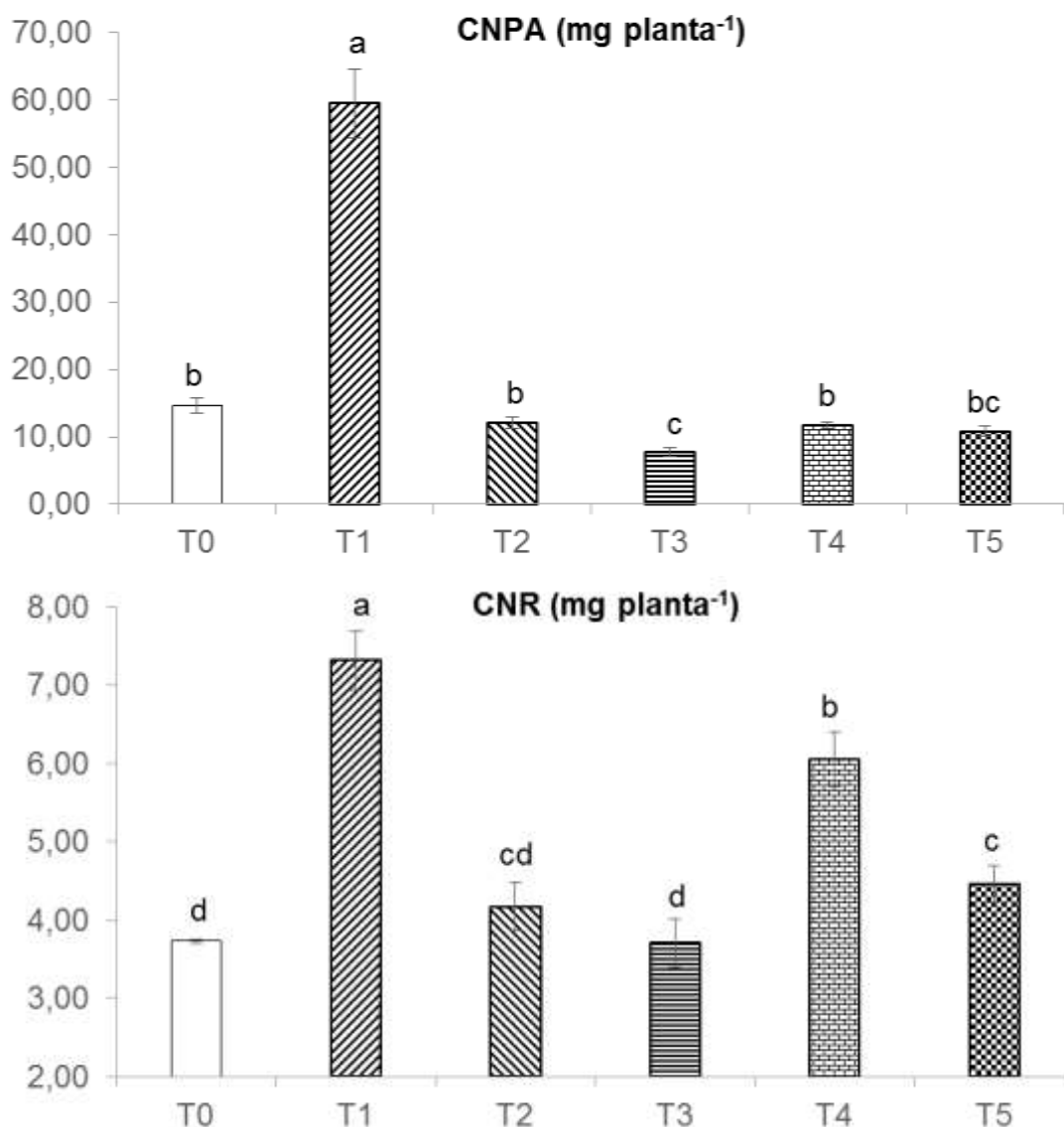


Figura 25. Conteúdo de N: CNPA e CNR: conteúdo de N da parte aérea e da raiz do milho, respectivamente, aos 30 dias de experimentação. Onde: T0: (-), T1: 0,4SS, T2: 0,6FNA, T3: Bs e T4: Fs e T5: Bs+Fs. Coeficientes de variação: CNPA= 11,30 % e CNR= 5,37 %.

O conteúdo de P radicular (CPR) (Figura 23) das plantas inoculadas com a combinação de fungos solubilizadores de fósforo (FSP) em T4 e a combinação de fungos e bactérias (BSP+FSP em T5), na ausência de qualquer fonte de P aplicada ao substrato promoveram maiores acúmulos de macronutriente, superior ainda a T1, confirmando a superioridade da inoculação com fungos solubilizadores de P.

As taxas de liberação de P pela ação dos micro-organismos são reconhecidamente lentas em relação ao uso de fontes de P solúveis. O tratamento com SFS (T1), observa-se maior CPPA e menor CPR dentre todos os

tratamentos (Figura 23), função da rápida absorção do P-solúvel e translocação para a parte aérea, ao contrário de T4 e T5. Ensaio utilizando fontes mais solúveis e umidade dentro da capacidade de campo resultam na translocação eficiente de nutrientes para a parte aérea em detrimento da acumulação nas raízes, principalmente em se tratando do P, este móvel no tecido vegetal (Bloom et al., 1993).

O conteúdo de nitrogênio radicular (CNR) seguiu a tendência do CNPA em relação aos diferentes tratamentos. Em respostas observadas de maneira geral, visto que tratamentos que induziram maior VR, a partir da disponibilidade de P – “nutriente de arranque” - naturalmente presente no Argissolo, tiveram por conseguinte maior absorção de N via ureia – T1 seguido de T4 – fato que pode explicar a importância dos fungos promotores de crescimento testados e responsivos (Figuras 25). Como se sabe, fontes de P aplicadas favorecendo o dreno/planta colaboraram com um crescimento rápido e intenso das raízes (Taiz e Zeiger, 2013).

Os resultados obtidos para o tratamento T3 apontam que nas condições experimentais propostas, as bactérias solubilizadoras de fósforo (BSP) não estimularam o crescimento inicial e o acúmulo de nutrientes em plantas de milho no primeiro (Figuras 22 a 25) terço de ciclo fenológico da planta. Esse grupo microbiano tem atividade biomineralizadora inferior aos fungos quanto à disponibilidade de P em ensaios anteriores *in vitro*.

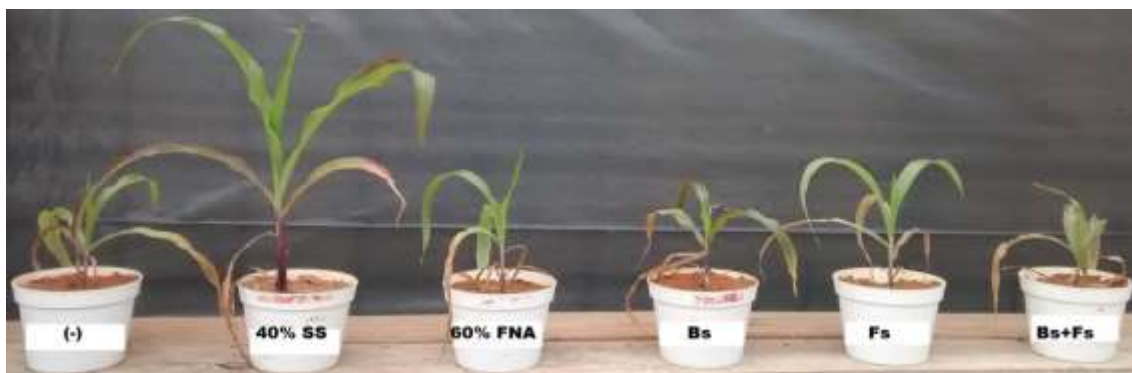


Figura 26. Bioinoculação simples de Argissolo Amarelo em milho: Da esquerda para direita: Tratamentos T0 a T5.

Na figura 26 pode-se observar a representação visual média da resposta da parte aérea para os diferentes tratamentos, sendo T2 (60% de fosfato natural

de Araxá), o tratamento mais inferior, como visto nos dados de MSPA - diferenciados estatisticamente pelo teste de Fisher-LCD em 5% (Figura 21) - seguidos de T0 (controle) = T3 (BSP) = T4 (FSP) = T5 (BSP+FSP) < T1 (40% da recomendação de P_2O_5 para cultura do milho com aplicação de superfosfato simples).

6.7. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MSP EM COMBINAÇÃO COM ÁCIDOS HÚMICOS E FNA NA NUTRIÇÃO FOSFÁTICA DE PLANTAS DE MILHO

No presente ensaio objetivou-se avaliar o efeito do fosfato natural de Araxá (FNA) combinado com micro-organismos solubilizadores previamente selecionados como biomineralizadores (Figura 32, no apêndice) na presença ou não de ácidos húmicos na nutrição fosfatada e no crescimento inicial de plantas de milho.

A proporção predefinida de 40% da dose recomendada de SS mais 60% da dose recomendada de FNA aplicados de forma localizada foi escolhida a partir dos resultados do ensaio experimental 6.5, representando uma estratégia para a redução das taxas de aplicação de P oriundo de fontes sintéticas solúveis.

Dentre os tratamentos avaliados observa-se que a tecnologia de inoculação mista (dois grupos microbianos promotores de crescimento) combinada com ácidos húmicos (AH) (T7) promoveram incrementos significativamente maiores em MSPA e MSR nas plantas de milho na comparação com os outros tratamentos e especialmente o tratamento em que as plantas não foram inoculadas ou foi aplicado AH (Figura 27). Interessante ressaltar que a inoculação conjunta envolvendo fungos e bactérias solubilizadoras de P só foi efetiva na presença de AH. Os incrementos de MSPA e MSR no tratamento (T7) foram respectivamente 17 e 22 % superiores com relação ao tratamento (T1), que recebeu a mesma proporção de P combinada na forma de 40% da dose recomendada de SS mais 60% da dose recomendada de FNA. Estes resultados indicam que a aplicação de MSP na presença de AH, provavelmente resulte na maior disponibilidade de P na fração lábil do complexo de troca iônica do solo ou maior absorção de P no sistema radicular, resultando em incrementos significativos de biomassa.

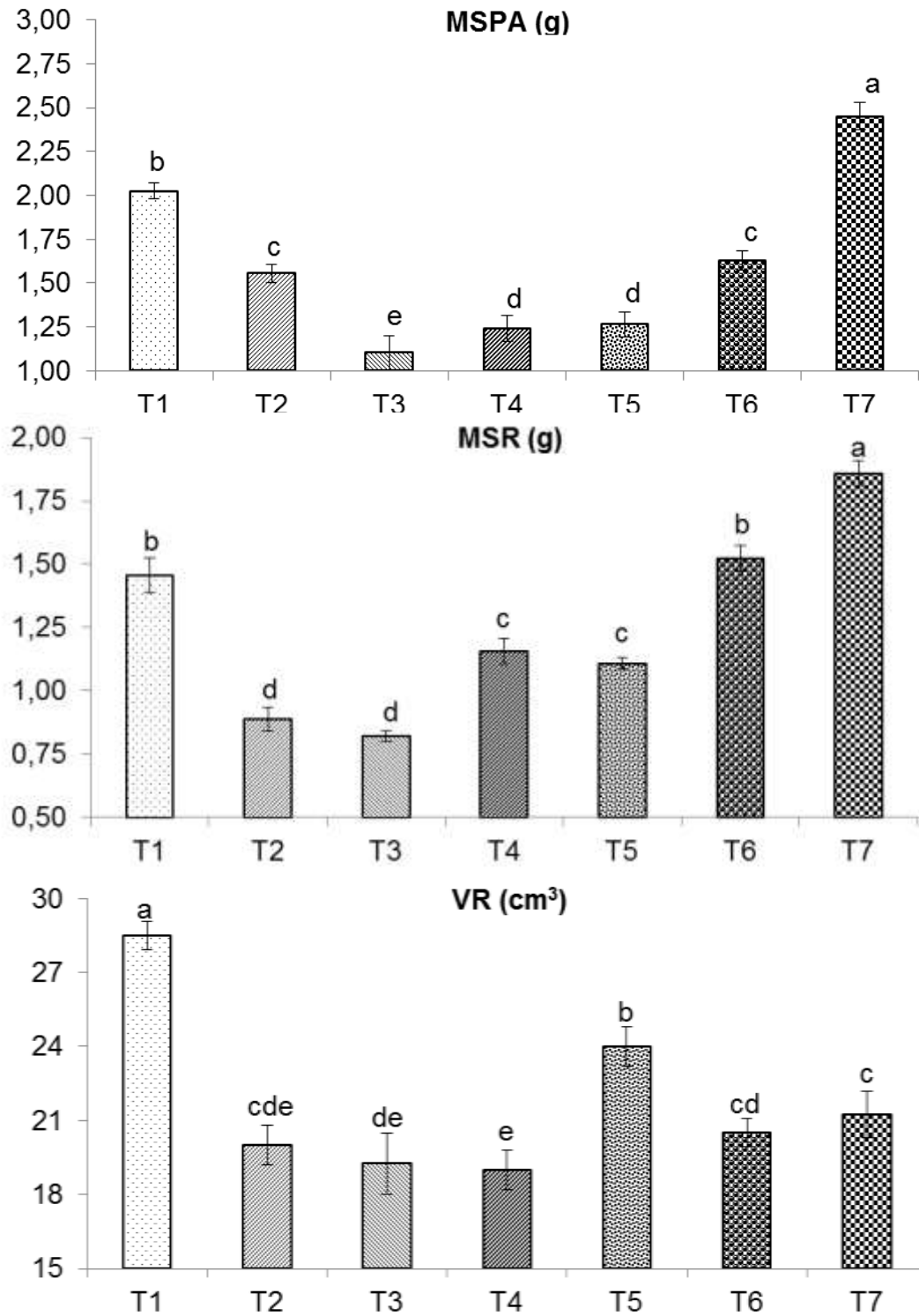


Figura 27. Biometria da parte aérea: MSPA: matéria seca da parte aérea (g) e, do sistema radicular: MSR: matéria seca da raiz e VR: volume radicular do Milho, aos 30 dias de experimentação. Onde: T1: 0,4SS+0,6FNA, T2: 0,4SS+0,6FNA+Bs, T3: 0,4SS+0,6FNA+Fs, T4: 0,4SS+0,6FNA+Bs+Fs, T5: 0,4SS+0,6FNA+Bs+AH, T6: 0,4SS+0,6FNA+Fs+AH e T7: 0,4SS+0,6FNA+Bs+Fs+AH. Coeficientes de variação: MSPA= 3,88 %, MSR= 4,05 %, e VR= 4,08 %.

O tratamento T7 promoveu o incremento do acúmulo de P e as características de crescimento na biomassa das plantas em relação aos outros tratamentos (Figuras 27, 28 e 29), resultando em melhor desempenho inicial do milho. Os efeitos positivos sobre o desenvolvimento inicial das plantas de milho podem conferir maior adaptabilidade às condições posteriores de crescimento devido ao aumento das reservas e das possibilidades de captação de água, luz e nutrientes (Giro, 2008; Baldotto et al., 2011).

Considerando que quanto maior relação R/PA pode resultar da menor disponibilidade de nutrientes às plantas (Silva e Delatorre, 2009), foi visto que combinações biotecnológicas resultantes dos tratamentos T4 e T5 sugerem uma incompatibilidade entre as demandas da planta para crescimento e a disponibilidade de P no substrato, resultando em biomassas menores na parte aérea com impactos no seu desenvolvimento inicial e biomassas radiculares relativamente maiores como demonstram as razões: MSR/MSPA de T4 e T5 (Figura 26). Estas observações estão em acordo com os conteúdos inferiores de P e N (Figuras 28 e 30) em raízes e na parte aérea das plantas de milho aos 30 dias de experimentação e da biomassa total para o CTP (Figura 29).

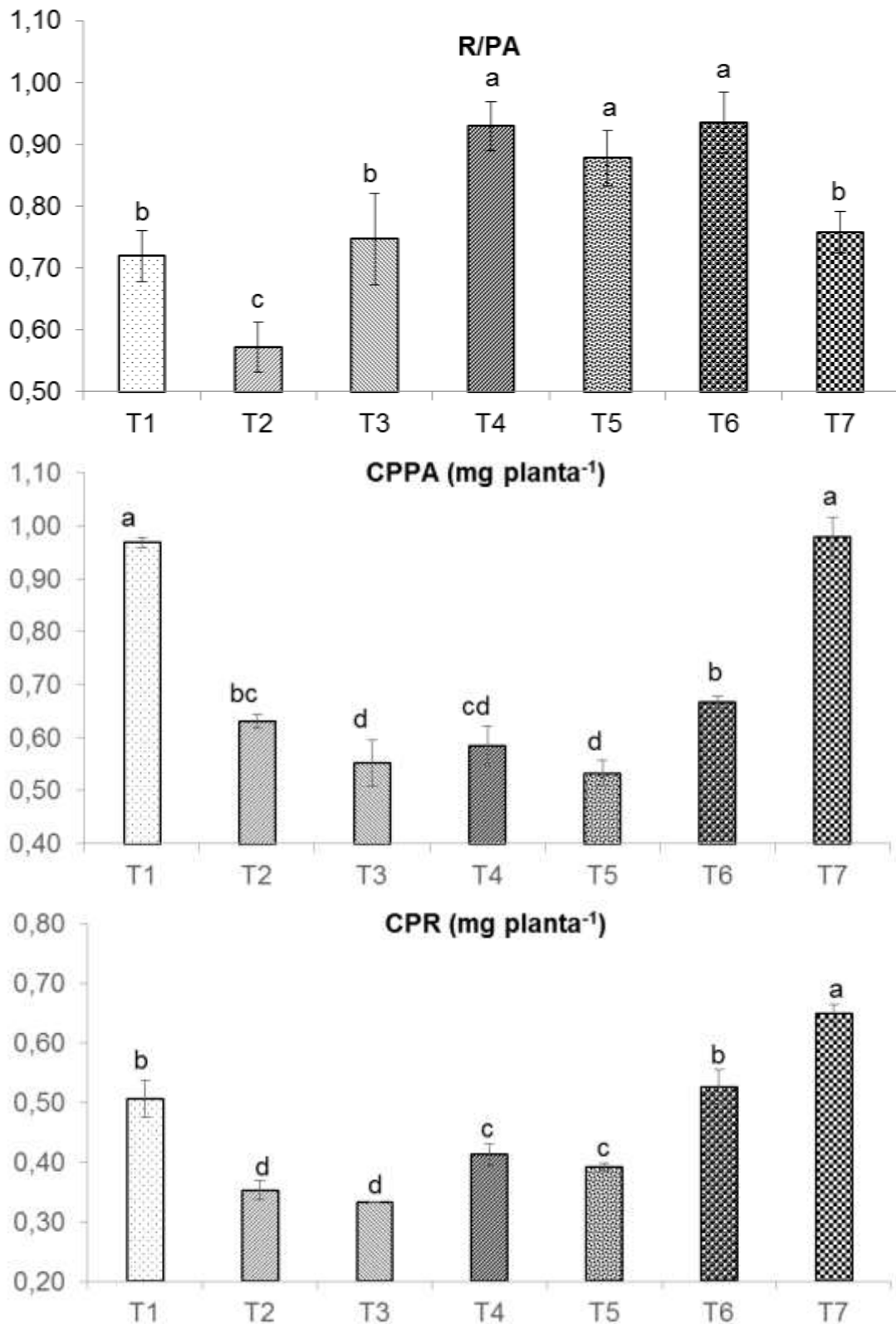


Figura 28. Biometria e conteúdo de P: R/PA: relação raiz/parte aérea, CPPA e CPR: conteúdo de P da parte aérea e da raiz do milho, respectivamente, aos 30 dias de experimentação. Onde: T1: 0,4SS+0,6FNA, T2: 0,4SS+0,6FNA+Bs, T3: 0,4SS+0,6FNA+Fs, T4: 0,4SS+0,6FNA+Bs+Fs, T5: 0,4SS+0,6FNA+Bs+AH, T6: 0,4SS+0,6FNA+Fs+AH e T7: 0,4SS+0,6FNA+Bs+Fs+AH. Coeficientes de variação: R/PA= 5,96 %, CPPA= 4,35 %, e CPR= 4,62 %.

Dentre os mecanismos operantes relacionados às respostas positivas da aplicação dos ácidos húmicos, pode destacar seus efeitos bioativos largamente reportados, associados à reconhecida indução do aumento da quantidade de ácidos orgânicos exsudados de raízes de milho tratadas com AH (Nwoke et al., 2008; Li et al., 2009). O incremento de ácidos orgânicos na rizosfera de plantas fertilizadas com fontes de P na forma de FNA e aplicados de forma localizada abaixo das sementes pode resultar em incremento da solubilização de P e biodisponibilidade para as plantas. Somado ao efeito protetor de ácidos húmicos sobre micro-organismos, poderiam resultar em incremento da eficiência solubilizadora sobre o FNA (Puente et al. 2009; Bashan et al. 2012). Ademais, a presença de matéria orgânica estabilizada solúvel no ambiente de mineralização da rocha fosfatada pode reduzir a adsorção do P à fração argila (Guppy et al., 2005).

De acordo com Hue (1991) e Bolan et al. (1994), ácidos orgânicos reduzem a sorção de P na seguinte ordem: ácidos tricarbóxicos mais eficientes que dicarbóxicos e estes mais eficientes que monocarbóxicos, resultado das trocas de OH^- pelo ânion PO_4^{3-} . Portanto, os micro-organismos e exsudados radiculares na presença de AH podem remobilizar P da superfície das partículas reativas dos solos como relatado por Hoberg et al. (2005) e He et al. (2002), tornando-o biodisponível em solução.

O fenômeno de dessorção de P por ânions orgânicos é amplamente aceito como um mecanismo para aumentar a disponibilidade de P na rizosfera, e isto ocorre na superfície do solo por permuta do ligante (Sato e Comerford, 2006; Bashan et al., 2012). No entanto, a concentração destes ácidos orgânicos/sais é relativamente baixa em Argissolos, podendo ser precipitados com os cátions livres (por exemplo, Al^{3+} , Fe^{3+} e Ca^{2+}), adsorvidos na superfície de minerais e/ou utilizados como fontes de carbono pelos micro-organismos (Jones et al., 2003).

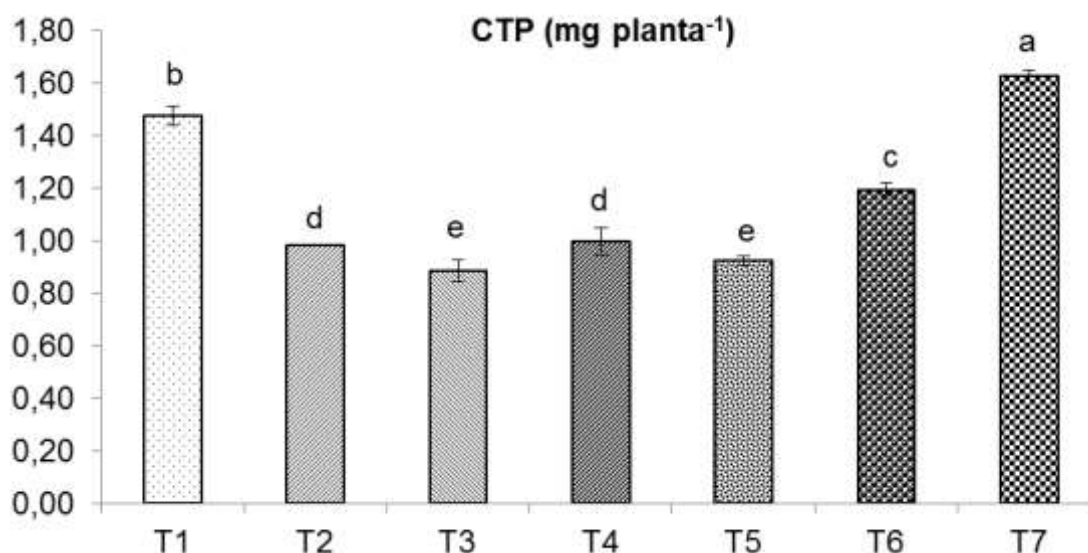


Figura 29. Conteúdo de P: CPT: conteúdo de P total do milho, aos 30 dias de experimentação. Onde: T1: 0,4SS+0,6FNA, T2: 0,4SS+0,6FNA+Bs, T3: 0,4SS+0,6FNA+Fs, T4: 0,4SS+0,6FNA+Bs+Fs, T5: 0,4SS+0,6FNA+Bs+AH, T6: 0,4SS+0,6FNA+Fs+AH e T7: 0,4SS+0,6FNA+Bs+Fs+AH. Coeficiente de variação: CPT= 4,49 %.

É evidente pelas respostas de crescimento inicial (Figura 27 e 28), particularmente no grupo de tratamentos com AH e os maiores volumes de raiz (VR) e, acúmulo de N e P nas plantas de milho (Figuras 28, 29 e 30) a importância da combinação MSP e substâncias húmicas.

Os mecanismos propostos para explicar estas respostas positivas podem resultar da maior disponibilidade de P-lábil, já que os ácidos húmicos aumentam a solubilidade de P e impedem que ele seja imobilizado no solo. Além disso, em ambiente edáfico com baixa concentração de P, as plantas modificam seus processos metabólicos para manter o uso eficiente desse macronutriente, induzindo mudanças na composição lipídica da membrana plasmática e aumentando a atividade do transportador de P no tecido radicular (Arnaud et al., 2014; Erro et al., 2012; Hufnagel et al., 2014).

Outro mecanismo envolve a acidificação dos grupos funcionais de origem orgânica exsudados das plantas e micro-organismos, acidificando a rizosfera e ativando ainda mais as H⁺ - ATPases de membrana plasmática (Baldotto et al., 2011), o qual favorece a disponibilização de P não lábil do FNA, melhorando a absorção também daqueles aplicados via fertilização (N, por exemplo), comparando T7 em relação a T1, nos CPPA, CPR e CTP (Figura 28 e 29), bem como CNR (Figura 30), superior também ao controle.

Jindo et al. (2015) comprovaram também que os ácidos húmicos mudam a distribuição das espécies de P nas folhas, produzindo formas orgânicas prontamente disponíveis sob menor concentração de P no substrato e concomitantemente induzem a síntese de transportadores P de alta afinidade nas células das raízes - um mecanismo adaptativo de resposta à baixa nutrição fosfática. Tal bioatividade pode explicar o maior acúmulo significativo de matéria seca e nutrientes nas plantas tratadas (T7) (Figuras 27 a 31).

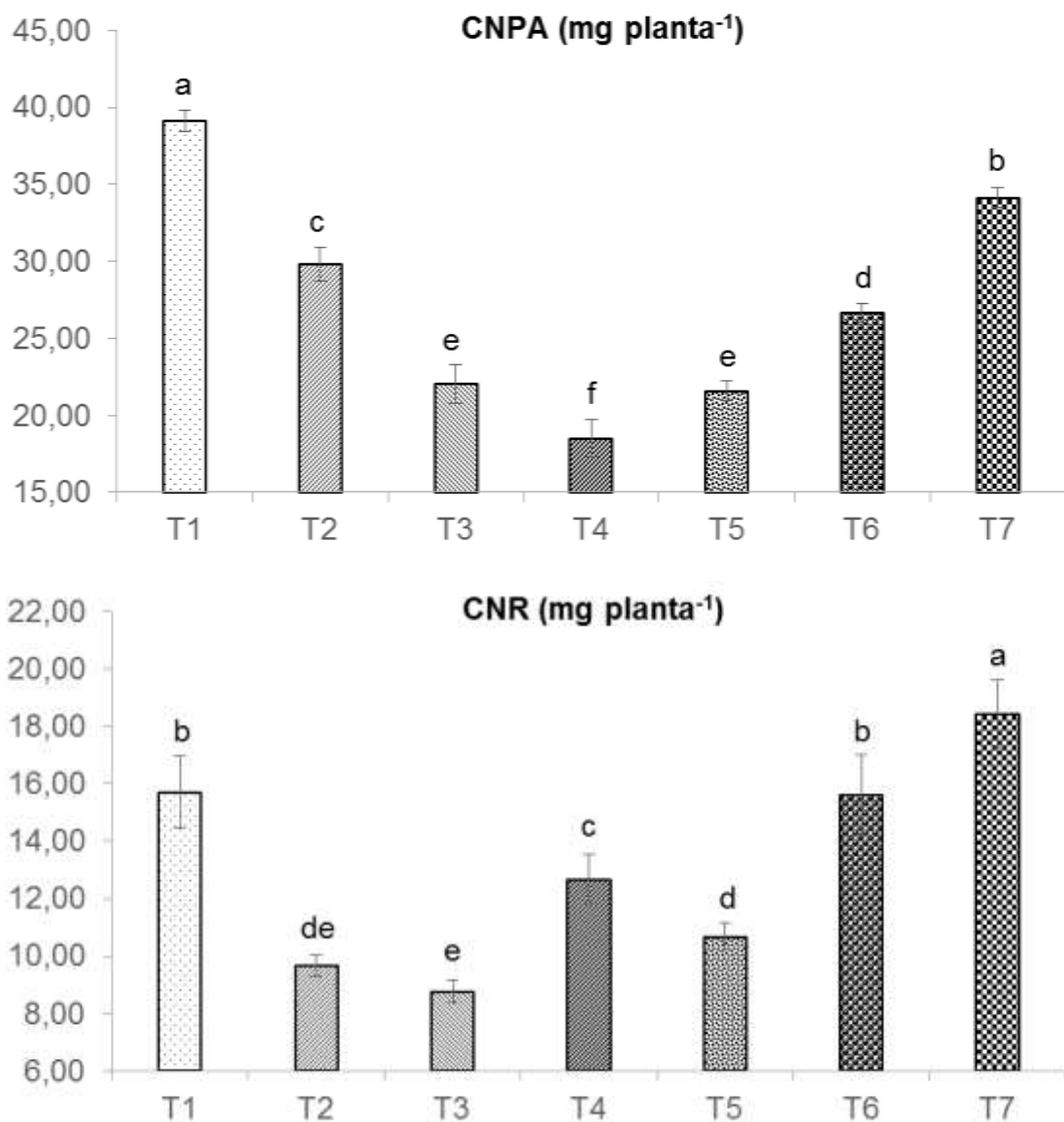


Figura 30. Conteúdo de N: CNPA e CNR: conteúdo de N da parte aérea e da raiz do milho, respectivamente, aos 30 dias de experimentação. Onde: T1: 0,4SS+0,6FNA, T2: 0,4SS+0,6FNA+Bs, T3: 0,4SS+0,6FNA+Fs, T4: 0,4SS+0,6FNA+Bs+Fs, T5: 0,4SS+0,6FNA+Bs+AH, T6: 0,4SS+0,6FNA+Fs+AH e T7: 0,4SS+0,6FNA+Bs+Fs+AH. Coeficientes de variação: CNPA= 3,49 % e CNR= 7,56 %.

Ácidos húmicos têm atividade parecida com a de hormônios vegetais (p.ex.: auxina) que promovem o crescimento vegetal (Figura 26) e, concomitantemente, aumentam a absorção de nutrientes (Figuras 28, 29 e 30) (Vaughan e Malcolm, 1985; Chen e Aviad, 1990; Nardi et al., 2002).

Podem atuar também no aumento da população de micro-organismos benéficos introduzidos em planta e, conseqüentemente, no incremento desses efeitos (Marques Júnior, 2006), além de não interferirem negativamente no crescimento dos micróbios, estimulando a colonização da microbiota nativa (Conceição et al., 2009), como em T1, por exemplo.

Os ácidos húmicos agem sobre a H^+ -ATPases de membrana plasmática, que promovem incremento de sua atividade e por conseqüência abaixamento do pH apoplástico, o qual dispara uma ação orquestrada de afrouxamento das fibrilas de celulose da parede e incremento da pressão de turgescência pelo movimento de entrada de água no vacúolo celular, resultando em expansão celular e, por conseguinte, (Hager et al., 1991) explica a promoção do desenvolvimento radicular.

Alterações na arquitetura das raízes são percebidas pela indução de um número maior de raízes laterais, evidenciado pelo aumento do número de sítios de mitose e na proporção de raízes finas, já demonstrado para plântulas de milho (Canellas et al., 2002; Zandonadi et al., 2007) e *Arabidopsis* (Dobbss et al., 2007). Estas alterações anatômicas e bioquímicas podem beneficiar o estabelecimento de MPCV nas raízes pelo aumento do número de pontos de infecção (Cerigioli, 2006). A ação promotora de crescimento vegetal e acúmulo de nutrientes nas plantas pelos AH aplicados em baixas doses se dá através da fragmentação supraestrutural deste no ambiente acidificado da rizosfera, gerando subunidades potencialmente capazes de alterar o metabolismo celular, ativando H^+ ATPases da membrana plasmática de células de raiz (Piccolo, 2001; Façanha et al., 2002; Canellas et al., 2006). Canellas e Olivares (2014) revisaram as ações fisiológicas das substâncias húmicas como promotoras desse crescimento vegetal.

Baldotto et al. (2011) ressaltam o papel dos ácidos orgânicos na disponibilizando P de um substrato contendo uma fonte de P insolúvel em água, e de que forma funciona a dinâmica do fosfato natural de rocha neste meio de cultivo até sua absorção pela planta.

A absorção e o acúmulo do P, ao lado de um maior crescimento e maior massa vegetal, podem ser conseguidos pela combinação de fosfato natural com ácidos orgânicos. Tal utilização agrônômica pode ser atribuída a um aumento da solubilidade, dessa aplicação conjunta. Supõe-se que este aumento da solubilização pode ser causado pelo fornecimento de prótons pelos ácidos orgânicos, complexação de Ca^{2+} por ligantes orgânicos (Baldotto et al., 2011).

Quanto ao conteúdo dos macronutrientes (N e P) analisados nos dois compartimentos vegetais: Parte aérea e raiz (Figuras 28, 29 e 30), as combinações dadas por T7 seguido por T6, apresentaram igualdade ou superioridade estatística em relação a T1, com destaque o sistema radicular. Estes resultados apontam para o potencial desta abordagem biotecnológica, ressaltando que as taxas de liberação de P para a solução do solo são mais lentas, necessitando complementação com uma fonte de P solúvel para respostas produtivas maiores.

Como visto em ensaios antecedentes a partir de 36 dias após a incubação do *Curvularia senegalensis* em substrato com baixa fertilidade natural de P, observou-se um incremento significativo do P em solução – P solúvel em H_2O , evidenciando claramente o efeito da aplicação do fungo combinado com FNA no solo em função de um tempo de ação em médio prazo do bioinoculante.



Figura 31. Bioinoculação mista de Argissolo Amarelo em milho: Da esquerda para direita: Tratamentos T1 a T7.

Representação visual das respostas médias de plantas de milho em resposta a aplicação combinada de FNA e SS e mesmas proporções e fontes de P na presença de bactéria, fungos e suas combinações, com e sem ácidos

húmicos. Aliada a análise estatística da MSPA (Figura 27), a Figura 31 demonstra que os melhores tratamentos seguiram a ordem crescente: T3 (0,4SS+0,6FNA+Fs) < T4 (0,4SS+0,6FNA+Bs+Fs) = T5 (0,4SS+0,6FNA+Bs+AH) < T2 (0,4SS+0,6FNA+Bs) = T6 (0,4SS+0,6FNA+Fs+AH) < T1 (0,4SS+0,6FNA) < T7 (0,4SS+0,6FNA+Bs+Fs+AH).

RESUMO E CONCLUSÕES

A recuperação do fósforo (P) pelas raízes das plantas é muito baixa na maioria dos solos do Brasil, resultado da rápida adsorção específica pela fração mineral. A melhoria da eficiência do uso de P envolve o manejo de fontes, doses, formas de aplicação e, ainda, a compatibilização com as demandas da planta. A redução da taxa de aplicação de fertilizantes fosfatados altamente solúveis mantendo-se patamares de produtividade vegetal representa uma estratégia a ser trabalhada para manejo mais sustentável dos sistemas agrícolas. No presente trabalho foi proposto a combinação de fosfato natural de Araxá (FNA) e micro-organismos selecionados como alternativa complementar ao fornecimento de P para a planta. Para tal, inicialmente foi avaliada a capacidade de solubilização de FNA *in vitro* por bactérias, actinobactérias e fungos isolados. Os fungos foram os micro-organismos mais indicados para compor bioinoculantes. Também foi observado que a inoculação do fungo solubilizador de P afetou a dinâmica deste elemento na fração lábil do solo. Ensaio em casa de vegetação evidenciaram o potencial destes micro-organismos em fornecer P para plantas de milho e tomateiro com a possibilidade de substituição de até 30% da dose de P na forma de P-rocha. Estudos subsequentes evidenciaram a importância da aplicação localizada de P no aumento da eficiência de uso por plantas de milho. Por fim, foi avaliado o uso combinado de micro-organismos solubilizadores de P (MSP) e ácidos húmicos (AH) no qual foram observados ganhos de matéria seca e

aumento do conteúdo de P com o uso de 40% da recomendação agronômica na forma de P sintético e 60% na de P natural, culminando na redução de fertilização sintética. Os resultados aqui obtidos, tomados em conjunto, fundamentam novas abordagens tecnológicas considerando a otimização da atividade biomineralizadora de P dos micro-organismos na presença de FNA visando o desenvolvimento de um novo insumo biológico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd-Alla, M. H. (1994) Phosphatases and the utilization of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar viceae. *Letters in Applied Microbiology*, 18: 294-296.
- Aguiar, K. P. (2012) Prospecção de bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas a vermicompostos. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, RJ. p. 63-86.
- Adesemoye, A. O., Kloepper, J. W. (2009) Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85: 1–12.
- Adesemoye, A. O., Torbert, H. A., Kloepper, J. W. (2009) Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial Ecology*, 58: 921–992.
- Agamy, R., Hashem, M., Alamri, S. (2013) Effect of soil amendment with yeasts as bio-fertilizers on the growth and productivity of sugar beet. *African Journal of Agricultural Research*, 8: 46–56.
- Agnihotri, V. P. (1970) Solubilization of insoluble phosphates by some soil fungi isolated from nursery seed beds. *Canadian Journal of Microbiology*, 16: 877-880.

- Alam, S., Khalil, S., Ayub, N., Rashid, M. (2002) *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganism (PSM) from maize rhizosphere. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 4: 454-458.
- Anderson, G. (1980) Assessing organic phosphorus in soils. In: Khasawneh, F. E., Sample, E. C., Kamprath, E. J., editors. *The Role of Phosphorus in Agriculture*. Madison, Wis: *American Society of Agronomy*, p. 411–32.
- Antoun, H. (2012) Beneficial microorganisms for the sustainable use of phosphates in agriculture. *Procedia Engineering*, 46: 62–67.
- Anwar, Q., Jalaluddin, M. (1999) Reactions of VMA and *Azospirillum* species on wheat growth. *Pakistan Journal of Biological Sciences. Agricultural*. 2 (1): 227-232.
- Arcand, M., Schneider, K. (2006) Plant and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 78: 791-807.
- Arnaud, C. M., Thibaud, M. C., Javot, H., Chiarenza, S., Delannoy, E., Revol, J., Soreau, P., Balzergue, S., Block, M. A., Maréchal, E., Desnos, T., Nussaume, L. (2014) Identification of phosphatin, a drug alleviating Pi starvation responses in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 166: 1479-1491.
- Asea, P. E. A., Kucey, R. M. N., Stewart, J. W. B. (1988) Inorganic phosphate solubilization by two *penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 220: 459-464.
- Baldotto, M. A., Giro, V. B., Baldotto, L. E. B., Canellas, L. P., Velloso, A. C. X. (2011) Initial performance of pineapple and utilization of rock phosphate applied in combination with organic compounds to leaf axils. *Revista Ceres*, Viçosa, 58 (3): 393-401.
- Banik, S., Day, B. K. (1982) Available Phosphate Content of an Alluvial Soil as Influenced by Inoculation of Some Isolated Phosphate Solubilizing Microorganisms. *Plant and Soil*, 69 (3): 353-364.
- Barroso, C. B., Nahas, E. (2008) Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43:529-535.
- Bashan, Y., Holguin, G. (1997) *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology* 43: 103-121.

- Bashan, Y. (1998) Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16: 729–770.
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E. (2010) How the plant growth promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - a critical assessment. *Advances in Agronomy*, 108: 77–136.
- Bashan, Y., Kamnev, A. A., de-Bashan, L. E. (2012) Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biology and Fertility of Soils*, doi:10.1007/s00374-012-0737-7.
- Beever, R. E., Burns, D. J. W. (1980) Phosphate uptake, storage and utilization by fungi. *Advances in Botanical Research*, 8: 127-219.
- Behera, B. C., Singdevsachan, S. K., Mishra, R. R., Dutta, S. K., Thatoi, H. N. (2013) Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove – a review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33 p.
- Bento, M. A. O. (2014) Bacteria isolated from soil and litter of the Atlantic Forest have potential as plant growth promoters. *World Journal of Microbiology & Biotechnology Incorporating the MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* (Dordrecht. Online).
- Berg, G. (2009) Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84: 11–18.
- Bhattacharya, S. S., Barman, S., Ghosh, R., Duary, R. K., Goswami, L., Mandal, N. C. (2013) Phosphate solubilizing ability of *Emericella nidulans* strain V1 isolated from vermicompost. *Indian Journal of Experimental Biology*, 51: 840-848.
- Bianco, C., Defez, R. (2010) Improvement of phosphate solubilization and *Medicago* plant yield by an indole-3-acetic acid-overproducing strain of *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (14): 4626-4632.
- Black, C. A. (1968) Soil plant relationships. New York: John Wiley e Sons, 653p.
- Bloom, A. J., Jackson, L. E., Smart, D. R. (1993) Root growth as a function of ammonium and nitrate in the root zone. *Plant Cell Environment*, 16: 199-206.

- Boddey, R. M., Döbereiner, J. (1988) Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent results and perspectives for future research. *Plant and Soil*, 108: 53-65.
- Bolan, N. S., Naidu, R., Mahimairaja, S., Baskaran, S. (1994) Influence of low-molecular-weight organic acids on the solubilization of phosphates. *Biology and Fertility of Soils*, 18: 311–319.
- Busato, J. G., Velloso, A. C. X., Canellas, L. P., Cabral, L. L. (2005) Solubilização de fosfatos naturais de rocha em resposta ao tratamento com ácidos húmicos. In: Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, Rio de Janeiro, Anais, UFRRJ/Embrapa CNPS.
- Busato, J. G., Lima, L. S., Aguiar, N. O., Canellas, L. P., Olivares, F. L. (2012) Changes in labile phosphorus forms during maturation of vermicompost enriched with phosphorus-solubilizing and diazotrophic bacteria. *Bioresource Technology*, 110: 390–395.
- Canellas, L. P., Façanha, A. O., Façanha, A. R., Olivares, F. L. (2002) Humic acids isolated from earthworm induces root mitotic sites and plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiology*, 30:1951-195.
- Canellas, L. P., Olivares, F. L. (2014) Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 1:3.
- Canellas, L. P., Zandonadi, D. B., Olivares, F. L., Façanha, A. R. (2006) *Efeitos fisiológicos de substâncias húmicas - o estímulo às H⁺-ATPases*. In: Manlio Silvestre Fernandes. (Org.). *Nutrição Mineral de Plantas*. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. P. 175-200.
- Cattelan, A. J., Hartel, P. G., Fuhrmann, J. J. (1999) Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science Society of America Journal*, 63: 1670–1680.
- Cerigioli, M. M. (2006) Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea Mays* L.) e potencial para promoção de crescimento. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 132 p.
- Chai, B., Wu, Y., Liu, P., Liu, B., Gao, M. (2011) Isolation and phosphate-solubilizing ability of a fungus, *Penicillium* sp. from soil of an alum mine. *Journal of Basic Microbiology*, 51 (1): 5-14.

- Chaiharn, M., Lumyong, S. (2009) Phosphate solubilization potential and stress tolerance of rhizobacteria from rice soil in Northern Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25: 305-314.
- Chen, Y., Aviad, T. (1990) Effects of humic substances on plant growth. In: Maccarthy, P.; Capp, C.E.; Malcolm, R.L. & Bloom, P.R., eds. Humic substances in soil and crop sciences: selected readings. Madison, *American Society of America*, p. 161-186.
- Chen, Y. P., Rehha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T. (2005) Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate-solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34: 33-41.
- Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., Young, C. C. (2006) Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34: 33–41.
- Chen, Z., Ma, S., Liu, L. L. (2008) Studies on phosphorus solubilizing activity of a strain of phosphobacteria isolated from chestnut type soil in China. *Bioresource Technology*, 99: 6702-6707.
- Chuang, C. C., Kuo, Y.L., Chao, C. C., Chao, W. L. (2007) Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biology and Fertility of Soils*, 43: 575-584.
- Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A. (2010) Plant growthpromoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42: 669–678.
- Conceição, P. M., Vieira, H. D., Canellas, L. P., Marques Júnior, R. B., Olivares, F. L. (2008) Recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, p. 545-548.
- Conceição, P. M., Vieira, H. D., Canellas, L. P., Olivares, F. L., Conceição, P. S. (2009) Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho. *Ciência Rural*, 39 (6): 1880-1883.
- Corrales, I., Amenos, M., Poschenrieder, C., Barcelo, J. (2007) Phosphorus efficiency and root exudates in two contrasting tropical maize varieties. *Journal of Plant Nutrition*, 30: 887–900.

- Dadhich, S. K., Somani, L. L., Shilpkar, D. (2011) Effect of integrated use of fertilizer P, FYM and biofertilizers on soil properties and productivity of soybean-wheat crop sequence. *Journal of Advances in Developmental Research*, 2: 42–46.
- Daniels, C., Michan, C., Ramos, J. L. (2009). New molecular tools for enhancing methane production, explaining thermodynamically limited lifestyles and other important biotechnological issues. *Microbial Biotechnology*, 2: 533–536.
- Davies, D. D. (1986) The fine control of cytosolic pH. *Physiologia Plantarum*, 67: 702–706.
- Deubel, A., Merbach, W. (2005) Influence of microorganisms on phosphorus bioavailability in soils. In: Buscot, F., Varma, A. (eds) *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Springer, p. 177–191.
- Drummond, A. J., Ashton, B., Buxton, S. Cheung, M., Cooper, A., Duran, C., Field, M., Heled, J., Kears, M., Markowitz, S., Moir, R., Stones-Hava, S., Sturrock, S., Thierer, T., Wilson, A. (2011) *Geneious*, 5 (4).
- Do Carmo Harta, M., Torrent, J. (2007) Phosphorus desorption kinetics in relation to phosphorus forms and sorption properties of Portuguese acid soils. *Soil Science*, 172: 631–638.
- Dobbss, L. B., Zandonadi, D. B., Evaristo, J. A. M., Façanha, A. L. O., Retamal, C. A., Façanha, A. R., Canellas, L. P. (2007) Ácidos húmicos estimulam a atividade da H⁺-ATPase da plasmalema em raízes de plântulas de arroz. In: *VII Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas*, Florianópolis.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Okon, Y., Vanderleyden, J. (2002). Effects of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biology and Fertility of Soils*, 36: 284-297.
- Donner, S. D., Kucharik, C. J. (2008) Corn-based ethanol production compromises goal of reducing nitrogen export by the Mississippi River. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105: 4513–4518.
- Egamberdiyeva, D. (2005). Plant growth promoting rhizobacteria isolated from a Calcisol in a semi-arid region of Uzbekistan: Biochemical characterization and effectiveness. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168: 94-99.

- Ehrlich, H. L. (1990) Mikrobiologische and biochemische Verfahrenstechnik. In: Einsele, A., Finn, R. K., Samhaber, W., *Geomicrobiology*, 2nd ed. Weinheim: VCH, Verlagsgesellschaft.
- Eivazi, F., Tabatabai, M. A. (1977) Phosphatases in soils, *Soil Biology and Biochemistry*, 9: 167-172.
- EMBRAPA (2009) Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. 2^o edição revista e ampliada. Brasília, 627 p.
- EMBRAPA (2009) EMBRAPA e UFPR desenvolvem primeiro inoculante para milho e trigo, 2009. Disponível em: <<http://www.embrapa.gov.br/imprensa/noticias/2009/agosto/1asemana/embrapa-e-ufpr-desenvolvem-primeiroinoculante-para-milho-e-trigo>>. Acesso em: 13 jan. 2012.
- EMBRAPA (2010) Prospecção de comunidades microbianas do solo ativas no aproveitamento agrícola de fontes de fósforo de baixa solubilidade. Embrapa Milho e Sorgo. Sete Lagoas, MG.
- Erro, J., Urrutia, O., Baigorri, R., Aparicio-Tejo, P., Irigoyen, I., Storino, F., Mandado, M., Yvin, J. C., Garcia-Mina, J. M. (2012) Organic Complexed Superphosphates (CSP): Physicochemical Characterization and Agronomical Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 2008–2017.
- Façanha, A. R., Façanha, A. L. O., Olivares, F. L., Guridi, F., Santos, G. A., Velloso, A. C. X., Rumjanek, V. M., Brasil, F.; Schripsema, J., Braz, R., Oliveira, M. A., Canellas, L. P. (2002) Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre as bombas de prótons da membrana plasmática. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37: 1301-1310.
- Fasim, F., Ahmed, N., Parson, R., Gadd, G. M. (2002) Solubilization of zinc salts by a bacterium isolated from air environment of a tannery. *FEMS Microbiology Letters*, 213: 1-6.
- FAO (2006) Fertilizer use by crop: FAO fertilizer and plant nutrition bulletin 17. *Food and Agriculture Organization of the United Nation*, Rome, p. 60–61.
- Fernandes, M. S. (2006) Nutrição mineral de plantas. *Sociedade Brasileira de Ciência do Solo*. 432 p.
- Garshasbi, L., Paknejad, F., Kashani, A., Nateghi, M. Fatemi, Z. (2014) Wheat performance as affected by pre-plant and foliar application of phosphorus

- under inoculation with arbuscular mycorrhizal (AM) and non-inoculation. *Agriculture Research Center*, 4 (5): 154-61.
- Gaskin, J. W., Hartel, P., Little, E., Harris, G. (2010) Soil Inoculants. *College of Agricultural and Environmental Sciences Cooperative Extension*. University of Georgia, circular 990.
- Gaur, A. C., Ostwal, K. P. (1972) Influence of phosphate dissolving Bacilli on yield and phosphate uptake of wheat crop. *Indian Journal of Experimental Biology*, 10: 393-4.
- Glick, B. R. (1995) Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnology Advances*, 13: 247-61.
- Goldstein, A. H. (1986). Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *American Journal of Alternative Agriculture*, 1: 51-57.
- Goldstein, A. H., Liu, S. T. (1987) Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola*. *Biotechnology Journal*, 5: 72-4.
- Goldstein, A. H. (1994) Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria. In: Torriani-Gorini, A., Yagil, E., Silver, S., editors. Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology. Washington, DC: ASM Press. p. 197-203.
- Goldstein, A. H. (1995) Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram-negative bacteria. *Biological Agriculture and Horticulture*, 12: 185.
- Goldstein, A. H., Braverman, K., Osorio, N. (1999) Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) bacterium. *FEMS Microbiology Ecology*, 3: 295-300.
- Gonçalves, J. L. M., Firme, D. J., Novais, R. F., Ribeiro, A. C. (1985) Cinética de adsorção de fósforo em solos de cerrado. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 9: 107-111.
- Gracia de Salamone, I. E., Hynes, R. K., Nelson, L. M. (2001) Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 404-411.

- Guppy, C. N., Menzies, N. W., Moody, P. W., Blamey, F. P. C. (2005) Competitive sorption reactions between phosphorus and organic matter in soil: a review. *Australian Journal of Soil Research*, 43: 189–202.
- Gupta, R., Singal, R., Sankar, A., Kuhad, R. C., Saxena, R. K. (1994) A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *Journal of General and Applied Microbiology*, 40: 255-260.
- Gutierrez-Manero, F. J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Francisco, R. T., Manuel, T. (2001). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilis* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*, 111: 206-211.
- Gyaneshwar, P., Kumar, N. J., Pareka, L. J., Podle, P. S. (2002) Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*, 245 (1): 83-93.
- Hamdali, H., Hafidi, M., Virolle, M. J., Ouhdouch, Y. (2008). Rock phosphate solubilizing Actinimycetes: Screening for plant growth promoting activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 2565-2575.
- Hameeda, B., Harini, G., Rupela, O. P., Wani, S. P., Reddy, G. (2006a) Growth promotion of maize by phosphate solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiological Research*, 163: 234-242.
- Hameeda, B., Rupela, O. P., Reddy, G., Satyavani, K. (2006b) Application of plant growth-promoting bacteria associated with composts and macrofauna for growth promotion of Pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 43: 221-227.
- Hameeda, B., Harini, G., Rupela, O., Wani, S., Reddy, G. (2008) Growth promotion of maize by phosphatesolubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiological Research*. 163: 234-242.
- Hamuda, H. E. A. F. B., Patkó, I. (2010) Relationship between environmental impacts and modern agriculture. *Óbuda University e-Bulletin*, 1: 87–98.
- Harley, J. L., Smith, S. E. (1983) Mycorrhizal symbiosis. London, New York: Academic Press.
- Harris, J. N., New, P. B., Martin, P. M. (2006) Laboratory tests can predict beneficial effects of phosphate-solubilizing bacteria on plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 1521-1526.

- Hayes, M. H., Malcolm, R. (2001) Consideration of composition and aspects of the structures of humic substances. In: Hayes, M. H.; Malcolm, R. (eds.) Humic substances and chemical contaminants. Madson: *Soil Science Society of America*, p. 3-39.
- Haynes, R. J. (1990) Active ion uptake and maintenance of cation- anion balance: A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. *Plant and Soil*, 126: 247–264.
- He, Z. L., Bian, W., Zhu, J. (2002) Screening and identification of microorganisms capable of utilizing phosphate adsorbed by goethite. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 33: 647–663.
- Helman, Y., Burdman, S., Okon, Y. (2011) Plant growth promotion by rhizosphere bacteria through direct effects. In: Rosenberg, E., Gophna, U. (eds) Beneficial microorganisms in multicellular life form. *Springer*, Heidelberg, p. 89–103.
- Himani, S., Reddy, M. S. (2012) Improvement of wheat and maize crops by inoculating *Aspergillus* spp. In alkaline soil fertilized M.S with rock phosphate, *Archives of Agronomy and Soil Science*, 58: 535-546.
- Hilda, R., Fraga, R. (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17: 319–359.
- Hilda, R. (2000) Isolation of a gene from *Burkholderia cepacia* IS-16 encoding a protein that facilitates phosphatase activity. *Current Microbiology*, 40: 362-366.
- Hoberg, E., Marschner, P., Lieberei, R. (2005) Organic acid exudation and pH changes by *Gordonia* sp. and *Pseudomonas fluorescens* grown with P adsorbed to goethite. *Microbiological Research*, 160: 177–187.
- Hopkins, C. G., Whiting, A. L. (1916) Soil bacteria and phosphates. III Agric Exp Stn Bull, 190: 395–406.
- Hue, N. V. (1991) Effects of organic acids/anions on P sorption and phytoavailability in soils with different mineralogies. *Soil Science*, 152: 463–471.
- Hufnagel, B., de Sousa, S. M., Assis, L., Guimaraes, C. T., Leiser, W., Azevedo G. C., Negri, B., Larson, G., Staff, J. E., Pastina, M. M., Barros, B. A., Wltzien, E., Rattunde, F. W., Viana, J. H., Clark, R. T., Falção, A., Gazaffi, R., Garcia, A. A. F., Schaffert, R. E., Kochian, L. V., Magalhaes, J. V. (2014) Duplicate and conquer: multiple homologs of phosphorus starvation tolerance enhance

- phosphorus acquisition and sorghum performance on low-phosphorus soils. *Plant Physiology*, 166: 659-677.
- Hwangboo, H., Park, D. R., Kim, Y. W., Rim, Y. S., Park, K. H., Kim, T. H., Suh, J. S., Kim, K. Y. (2003) 2-keto gluconic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedium*. *Current Microbiology*, 47: 87.
- Igual, J. M, Valverde, A., Cervants, E., Velazquez, E. (2001) Phosphate solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use updated molecular techniques in their study. *Agronomy*, 21: 651-568.
- Illmer, P., Schiner, F. (1992) Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 24: 389-395.
- Illmer, P., Schinner, F. (1995) Solubilization of inorganic calcium phosphate solubilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 27: 257–63.
- Jackman, J. M., Jones, R. C., Yost, R. S., Babcock, C. J. (1997) Rietveld estimates of mineral percentages to predict phosphate sorption by selected Hawaiian soils. *Soil Science Society of America Journal*, 61: 618–625.
- Jeon, J. S., Lee, S. S., Kim, H. Y., Ahn, T. S., Song, H. G. (2003) Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms. *The Journal of Microbiology*, 41: 271-276.
- Jindo, K., Sanches, T., Peres, L. E. P., Azevedo, I. G., Aguiar, N. O., Mazzei, P., Spaccini, R., Piccolo, A., Olivares, F. L., Canellas, L. P. (2015) Uptake, storage and high affinity phosphorus cell transporters are influenced by humic substances. *Plant and Soil*,..
- Johnson, H. W. (1959) The solubilization of “insoluble” phosphate IV the reaction between organic acids and tricalcium phosphate. *New Zealand Journal of Science*, 2: 215-218.
- Jones, D. L., Dennis, P. G., Owen, A. G., Van Hees, P. A. W. (2003) Organic acid behavior in soils—misconceptions and knowledge gaps. *Plant and Soil*, 248: 31–41.
- Jones, D. L., Oburger, E. (2011). Solubilization of phosphorous by soil microorganisms. In: Buneman, E., Oberson, A., Frossard, E. (eds.) Phosphorous in action, v. 100: Biological processes in soil phosphorous cycling. *Springer Berlin Heidelberg*. p. 169-198.

- Joveva, S., Nozinie, R., Delie, V. (1991) Determination of intermediates in bioconversion of 2,5-diketo-d-gluconic acid by genus *Corynebacterium* by thin-layer chromatography. *Prehrambenotenol Biotechnol Rev*, 29: 87-90.
- Juriank, J. J., Dudley, L. M., Allen, M., Knight, W. G. (1986) The role of calcium oxalate in the availability of phosphorus in soils of semiarid regions: thermodynamic study. *Soil Science*, 142: 225-261.
- Kang, S. C., Pandey, P., Khillon, R., Maheswari, D. K. (2008) Process of rock phosphate solubilization by *Arpergillus* sp. PS 104 in soil amended medium. *Journal of Environmental Biology*, 29: 743.
- Kang, B. G., Kim, W. T., Yun, H. S., Chang, S. C. (2010). Use of plant growth promoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots. *Plant Biotechnology Reports*, 4: 179-183.
- Kaur, G., Reddy, M. S. (2014) Influence of P-solubilizing bacteria on crop yield and soil fertility at multilocational sites. *European Journal of Soil Biology*, 1-6.
- Kham, A. A., Jilani, G., Akhtar, M. S., Naqvi, S. M. S., Rashid, M. (2009) Phosphorus solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their role in crop production. *Journal of Agricultural and Biological Science*, 1: 48.
- Khan, M. S., Zaidi, A., Wani, P. A. (2007) Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-Areview. *Agronomy for Sustainable Development*, 27: 29-43.
- Khan, M. S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M., Wani, P. A. (2010) Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 56 (1): 73–98.
- Kim, K. Y., Jordan, D., McDonald, G. A. (1997) Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium, *Soil Biology and Fertility of Soils*, 24: 347-352.
- Kim, K. Y., Jordan, D., Mcdonald, G. A. (1998) Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biology and Fertility of Soils*, 26: 79-87, 1998.
- Kononova, M. M. (1982) *Matéria orgánica del suelo: su naturaleza, propiedades y métodos de investigación*. Barcelona, Oikos-Tou. 365p.
- Kpoblekou, K., Tabatabai, M. A. (1994) Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Science*, 158: 442–453.

- Kucey, R. W. N., Tanez, H. H., Leggett, M. E. (1989) Microbially mediated increases in plant available phosphorus. *Advances in Agronomy*, 42: 199-228.
- Lapido-Loureiro, F. E.; Nascimento M. (2003) Fertilizantes e Sustentabilidade na Agricultura: Uma Abordagem Mínero-Química-Metalúrgica. CETEM, [www.cetem.gov.br]/Publicações/Série Estudos e Documentos nº 53.
- Li, X. F., Zuo, F. H., Ling, G. Z., Li, Y. Y., Yu, Y. X., Yang, P. Q., Tang, X. L. (2009) Secretion of citrate from roots in response to aluminum and low phosphorus stresses in *Stylosanthes*. *Plant and Soil*, 325: 219–229.
- Lin, T. F., Huang, H. I., Shen, F. T., Young, C. C. (2006) The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. *Bioresource Technology*, 97: 957–960.
- Liu, S. T., Lee, L. Y., Jai, C. Y., Hung, C. H., Chang, Y. S., Wolfram, J. H., Rogers, R., Goldstein, A. H. (1992) Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *E. coli* HB 101: Nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the co-enzyme pyrroloquinoline quinone. *Journal of Bacteriology*, 174: 5814-5819.
- Louw, H. A., Webley, D. M. (1959) A study of soil bacteria dissolving certain phosphate fertilizers and related compounds. *Journal of Applied Bacteriology*, 22: 227–33.
- Lucy, M., Reed, E., Glick, B. R. (2004) Application of free living plant growth promoting rhizobacteria. *Antonie van leeuwenhoek*, 86: 1-25.
- Malavolta, E., Vitti, G. C., Oliveira, S. A. de. (1997) Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações, 2. ed. Piracicaba: POTAFOS. 319 p.
- MAPA (1980) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *BINAGRI – SISLEGIS*. Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980.
- MAPA (2004) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *BINAGRI – SISLEGIS*. Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004.
- MAPA (2009) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Secretaria de Defesa Agropecuária*. Instrução normativa nº 25, de 23 de julho de 2009.

- MAPA (2010) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Secretaria de Defesa Agropecuária*. Instrução normativa nº 30, de 12 de dezembro de 2011.
- MAPA (2011) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Secretaria de Defesa Agropecuária*. Instrução normativa nº 13, de 24 de março de 2011.
- Marques Jr., R. B. M., Canellas, L. P., Silva, L. G., Olivares, F. L. (2008) Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 32, p. 1121-1128.
- Marra, L. M., de Oliveira, S. M., Soares, C. R. F. S., Moreira, F. M. S. (2011) Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. *Scientia Agricola*, 68: 603–609.
- Marra, L. M., Soares, C. R. F. S., Oliveira, S. M., Ferreira, P. A. A., Soares, B. L., Carvalho, R. F., Lima, J. M., Moreira, F. M. S. (2012) Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. *Plant and Soil*, 355: 1-19.
- Marschner, H. (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd Ed. Academic Press, San Diego, CA, 889 p.
- MF-SEAE (Ministério da Fazenda - Secretaria de Acompanhamento Econômico) (2011) Panorama do mercado de fertilizantes – Maio/2011. 35 p. www.seae.fazenda.gov.br/...fert_seae_-2011_fertilizantes.pdf.
- Mittal, V., Singh, O., Nayyar H., Kaur, J., Tewari, R. (2008) Stimulatory effect of phosphate solubilizing fungal strains (*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*) on the yield of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. GPF2). *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 718-727.
- Mohapatra, B., Verma, D. K., Sen, A., Panda, B. B., Asthir, B. (2013) Bio-fertilizers- A Gateway to Sustainable Agriculture. *Popular Kheti*, 1(4): 97-106.
- Moreira, M. A., Carvalho, J. G., Pasqual, M., Fráguas, C. B., Silva, A. B. (2006) Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. *Ciência e Agrotecnologia*, 30 (5): 875-879.
- Moreira, F. M. S., Silva, K., Nóbrega, R. S. A., Carvalho, F. (2010) Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, 1(2): 74-99.

- Nahas, E., Centurion, J. F., Assis, L. C. (1994) Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 18: 43-48.
- Nahas, E. (1996) Factors determining rock phosphate solubilization by microorganism isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12: 18-23.
- Nahas, E., Banzatto, D. A., Assis, L. C. (1990) Fluoroapetite solubilization by *Aspergillus niger* in vinasse medium, *Soil Biology and Biochemistry*, 22: 1097.
- Nain, L., Rana, A., Joshi, M., Jadhav, S. D., Kumar, D., Shivay, Y. S., Paul, S., Prasanna, R. (2010) Evaluation of synergistic effects of bacterial and cyanobacterial strains as biofertilizers for wheat, *Plant and Soil*, 331: 217-230.
- Nardi, S., Concheri, G., Dell'agnola, G. (1996) Biological activity of humus. In: Piccolo, A. (ed.), *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier, New York, p. 361-40.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vianello, A. (2002) Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology & Biochemistry*, 34: 1527-1536.
- Neumann, G., Massonneau, A., Langlade, N., Dinkelaker, B., Hengeler, C., Romheld, V., Martinoia, E. (2000) Physiological aspects of cluster root and development in phosphorus-deficient white lupins. *Annals of Botany*, 85: 909-919.
- Nopparat, C., Jatupornpipat, M., Rittiboon, A. (2007) Isolation of phosphate solubilizing fungi in soil from kanchanbari, Thailand. *KMITL. Science and Technology Journal*, 137.
- Novais, R. F., Smyth, T. J. (1999) *Fósforo em solo e planta em condições tropicais*. Viçosa, MG: UFV, DPS, 399 p.
- Novais, R. F., Smyth, T. J., Nunes, F. N. (2007) *Fósforo*. Viçosa, MG: UFV, DPS, p. 471-550.
- Nwoke, O. C., Diels, J., Abaidoo R., Nziguheba, G., Merckx, R. (2008) Organic acids in the rhizosphere and root characteristics of soybean (*Glycine max*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) in relation to phosphorus uptake in poor savanna soils. *African Journal of Biotechnology*, 7: 3620-3627.

- Oberson, A., Friesen, D. K., Rao, I. M., Bühler, S., Frossard, E. (2001) Phosphorus transformations in an oxisol under contrasting land-use systems: the role of the soil microbial biomass. *Plant and Soil*, 237: 197-210.
- Oberson A., Tagmann H. U., Langmeier M., Dubois D., Mäder P., Frossard, E., (2010) Fresh and residual phosphorus uptake by ryegrass from soils with different fertilization histories, *Plant and Soil*, 334: 391-407.
- Öğüt, M., Er, F., Neumann, G. (2011) Increased proton extrusion of wheat roots by inoculation with phosphorus solubilizing microorganism. *Plant and Soil*, 339: 285–297.
- Ohtake, H., Kato, J., Kuroda, A., Taguchi, K., Sakai, Y. (1996) Chemolactic signal transduction in *Pseudomonas aeruginosa* in *Pseudomonas*. *Molecular Biology and Biotechnology* (Eds) Nakazawa, T., Furukawa, K., Hass, D., Silver, S. (Washington DC: American Society for Microbiology), p. 188-194.
- Olivares, F. L. (2009) Biologia do Solo- história, tendências e perspectivas. Boletim informativo Sociedade Brasileira de Ciência do Solo – vol. 34, n. 1 (jan./abr. 2009). – Campinas: SBCS, p. 33 e 34.
- Olivares, F. L. , Canellas, L. P., Carriello, R. C., Busato, J. G., Ndaw, S. M., Marques Jr., R. B., Baldotto, L. E. B., Zandonadi, D. B., Dobbss, L. B., Aguiar, N. D., Chagas, J. G, Aguiar, K. P., Giro, V. B., Bento, M. A. O., Gonzaga Jr., L, Façanha, A. R. (2010) Technological advances and field application of a new biofertilizer based on endophytic bacteria and humic acid. In: *12th International Symposium on Biological Nitrogen Fixation with non-legume & 2nd International INCT Symposium on Biological Nitrogen Fixation*, Book of Abstracts, Búzios, RJ.
- Omar, S. A. (1998). The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular–arbuscular–mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14: 211–218.
- Onweremadu, E. U. (2007) Predicting phosphorus sorption characteristics in highly weathered soils of South-Eastern Nigeria. *Research Journal of Environmental Sciences*, 1: 47–55.
- Okon, Y., Labandera-Gonzales, C. A. (1994) Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years of world-wide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*, 26: 1591-1601.

- Osorio, N. W., Habte, M. (2013) Phosphate desorption from the surface of soil mineral particles by a phosphatesolubilizing fungus. *Biology and Fertility of Soils*, 49: 481-486.
- Padmavathamma, P. K., Li, L. Y., Kumari, U. R. (2008) An experimental study of vermi-biowaste composting for agricultural soil improvement. *Bioresource Technology*, 99: 1672–1681.
- Panhwar, Q. A., Radziah, O., Zaharah Rahman, A., Sariah, M., Mohd Razi, I., Naher, U. A. (2011) Contribution of phosphate solubilizing bacteria in phosphorus bioavailability and growth enhancement of aerobic rice. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 9: 810–820.
- Parks, E. J., Olson, G. J., Brickman, F. E., Baldi, F. (1990) Characterization of high performance liquid chromatography (HPLC) of the solubilization of phosphorus in iron one by a fungus. *Indian Journal of Microbiology*, 5: 183-190.
- Paul, E. A., Clark, F. E. (1988) *Soil Microbiology and Biochemistry*. San Diego, CA: Academic Press.
- Peuravuori, J. (2005) NMR spectroscopy study of freshwater humic material in light of supramolecular assembly. *Environmental Science & Technology*, 39: 5541-5549.
- Piccolo, A. (2001) The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science*, 166: 810-832.
- Piccolo, A. (2002) The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Advances in Agronomy*, 75, 57-133.
- Piccolo A., Spiteller M. (2003) Electrospray ionization mass spectrometry of terrestrial humic substances and their size fractions. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 377: 1047-1059
- Pineda, M. E. B. (2014) La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(1): 101-113.
- Potafos (2005) [www.ppi.ppic.org], *Publicações POTAFOS, Arquivo do Agrônomo no 10 – Nutri-fatos*. 24p., acesso em 15/04/05.
- Pradhan, N., Sukla, L. B. (2011) Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *African Journal of Biotechnology*, 5 (10): 850.

- Primavesi, A. (2002) Manejo ecológico do solo: a agricultura em regiões tropicais. São Paulo: Nobel. 543 p.
- Puente, M. E., Li, C. Y., Bashan, Y. (2009) Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. *Environmental and Experimental Botany*, 66: 389–401.
- Quaggiotti, S., Rupert, B., Pizzeghello, D., Francioso, O., Tugnoli, V., Nardi, S. (2004) Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*, 55: 803-813.
- Rajan, S. S. S., Wattkinson, J. H., Sinclair, A. G. (1996) Phosphate rocks for direct application to soils. *Advances in Agronomy*, 57: 77.
- Raju, R. A., Reddy, M. N. (1999) Effect of rock phosphate amended with phosphate solubilizing bacteria and farm yard manure in wetland rice (*Oryza sativa*). *Indian Journal of Agriculture Sciences*, 69: 451–3.
- Raghu, K., MacRae, I. C. (1966) Occurrence of phosphate-dissolving microorganisms in the rhizosphere of rice plants and in submerged soils. *Journal of Applied Bacteriology*, 29: 582–586.
- Reddy, M. S., Kumar, S., Babita, K., Reddynd, M. S. (2002) Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 84: 187–189.
- Renner, R. (2008) Fertilizer phosphate demands could corrode water safety. *Environmental Science of Technology*, 42: 7030.
- Reis J. F. B., Reis, V. M. (2009) Inoculante em cana é novidade. *Campo & Negócios* 76: 31-32.
- Ribeiro, A. C.; Guimarães, P. T. G.; Alvarez V., V. H. (1999) Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais – 5^a Aproximação, Viçosa: MG, 1999, 359 p.
- Richa, G., Khosla, B., Reddy, M. S. (2007) Improvement of maize plant growth by phosphate solubilizing fungi in rock phosphate amended soils, *World Journal of Agricultural Sciences*, 3: 481-484.
- Richardson, A. E., Hadobas, P. A., Hayes, J. E., O'Hara, C. P., Simpson, R. J. (2001) Utilization of phosphorus by pasture plants supplied with myo-inositol hexaphosphate is enhanced by the presence of soil micro-organisms, *Plant and Soil*, 229: 47-56.

- Richardson, A., Barea, J., McNeill, A., Prigent-Combaret, C. (2009) Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*. 321: 305-339.
- Rodda, M. R. C., Canellas, L. P., Façanha, A. R., Zandonadi, D. B., Guerra, J. G. M., Almeida, D. L. De, Santos, G.A. (2006a) Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto. I - Efeito da concentração. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 30: 649-656.
- Rodda, M. R. C., Canellas, L. P., Façanha, A. R., Zandonadi, D. B., Guerra, J. G. M., Almeida, D. L. De, Santos, G. A. (2006b) Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto. II - efeito da fonte de vermicomposto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 30: 657-664.
- Rodríguez, H., Fraga, R. (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17: 319-339.
- Rojas-Tapias, D., Moreno-Galván, A., Pardo-Díaz, S., Obando, M., Rivera D, Bonilla, R. (2012) Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Applied Soil Ecology*, 61: 264–272.
- Roy, R. N., Finck, A., Blair, G. J., Tandon, H. L. S. (2006) Plant nutrition for food security a guide for integrated nutrient management. *FAO Fertilizer and plant nutrition bulletin*. Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome.
- Rudolfs, W. (1922) Influence of sulfur oxidation upon growth of soy beans and its effect on bacterial flora of soil. *Soil Science*, 14: 247–262.
- Ruttenberg, K. C. (2003) The global phosphorus cycle. *Treatise on Geochemistry*, 8: 585–643.
- Sahin, F., Cakmakci, R., Kantar, F. (2004). Sugar beet and barely yields in relation to inoculation with N₂ fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant and Soil*, 265: 123-129.
- Saiz-Jimenez, C., Hermosin, B., Trubetskaya, O. E., Reznikova, O. I., Afanas'Eva, G. V., Trubetskoj, O. A. (2006) Thermochemolysis of genetically different soil humic acids and their fractions obtained by tandem size

- exclusion chromatography-polyacrylamide gel electrophoresis. *Geodenna*, 131: 22-32.
- Salcedo, I. H., Medeiros, C. (1995) Phosphorus transfer from tropical terrestrial to aquatic systems – mangroves. In Tiessen, H. (ed.), Phosphorus in the Global Environment. Transfers, Cycles and Management. Scope 54 (462 p.). ICSU, UNEP. John Wiley & Sons, 347–362.
- Sato, S., Comerford, N. (2006) Organic anions and phosphorus desorption and bioavailability in a humid Brazilian Ultisol. *Soil Science*, 171: 695–705.
- Schachtman, D. P., Robert, R. J., Ayling, S. M. (1998) Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. *Plant Physiology*, 116: 447–453.
- Shigaki F., Sharpley, A. N., Prochnow, L. I. (2006). Animal-based agriculture, phosphorus and management and water quality in Brazil: options for the future. *Scientia Agricola*, 63: 194–209.
- Silva Filho, G. N. (1998) Solubilização de fosfatos pela microbiota do solo. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998. (Tese de Doutorado)
- Simpson, A. J. (2002) Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 40: 572-582.
- Smith, F. W., Mudge, S. R., Rae, A. L., Glassop, D. (2003) Phosphate transport in plants. *Plant and Soil*, 248: 71-83.
- Son, H. J., Park, G. T., Cha, M. S., Heo, M. S. (2006) Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Technology*, 97: 204-210.
- Souhie, E. L., Azcón, R., Barea, J. M., Saggin Júnior, O. J., Silva, E. M. R. (2005) Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40: 1149-1152.
- Souhie, E. L., Abboud, A. C. S. (2007) Solubilização de fosfato por microrganismos rizosféricos de genótipos de Guandu cultivados em diferentes classes de solo. *Semina: Ciências Agrárias*, 28: 11-18.
- Sposito, G. (2008) The chemistry of soils. *New York: University Oxford Press*. 2nd.ed., 329 p.

- Srisvastava, P. K., Singh, P. C., Gupta, M., Sinha, A., Vaish, A., Shukla, A., Singh, N., Tewari, S. K. (2011) Influence of earthworm culture on fertilization potential and biological activities of vermicomposts prepared from different plant wastes. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174: 420.
- Strobel, B. W. (2001) Influence of vegetation on low-molecular-weight carboxylic acids in soil solution: A review. *Geoderma*, 99: 169-198.
- Subbarao, N. S. (1988) Phosphate solubilizing microorganism. In: Biofertilizers in agriculture and forestry. *Regional Biofert. Dev. Centre*, Hissar, India: p. 133-142.
- Sulbaran, M., Perez, E., Ball, M. M., Bahas, A., Yarzabal, L. A. (2008) Characterization of the mineral phosphate by solubilizing activity of *Pantoea agglomerans* MMB051 isolated from an iron-rich soil in Southeastern Venezuela (Bolívar State). *Current Microbiology*, 58: 378-383.
- Suslow, T. V., Schroth, M. N., (1982) Rhizo-bacteria of sugarbeet: Effects of seed application and root colonization on yield. *Phytopathology*, 72: 199–206.
- Sutton, R., Sposito, G. (2005) Molecular structure in soil humic substances: the new view. *Environmental Science & Technology*, 39, 9009-9015.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2013) Fisiología vegetal. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 918 p.
- Theodorou, M. E., Panxton, W. C. (1993) Metabolic adaptation of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiology*, 101: 339-334.
- Tisdale, S. L., Nelson, W. L., Beaton, J. D. (1985) Soil fertility and fertilizers. 4 ed. New York: Macmillan Publishing Company, 754 p.
- Toro, M. (2007) Phosphate solubilizing microorganisms in the rhizosphere of native plants from tropical savannas: An adaptive strategy to acid soils? In: Velaquez, C., Rodriguez-Barrueco, E. (eds.) Developments in Plant and Soil Sciences. *Springer*, The Netherlands. p. 249-252.
- USGS (2012) United States Geological Survey Minerals Yearbook. 8 p.
- Vanlauwea, B., Nwoke, O., Diels, J.; Sanginga, N., Carsky, R., Deckers, J., Merckx, R. (2000) Utilization of rock phosphate by crops on a representative toposequence in the Northern Guinea savanna zone of Nigeria: response by *Mucuna pruriens*, *Lablab purpureus* and maize. *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 2063-2077.
- Van Straaten, P. (2002) Rocks for crops: agro minerals of sub-Saharan Africa. Nairobi: *ICRAF*, p. 338.

- Vaughan, D., Malcolm, R. E. (1985) *Influence of humic substances on growth and physiological processes*. In: Vaughan, D., Malcolm, R.E. (Eds.), *Soil Organic Matter and Biological Activity*. Martinus-Nijhoff, Boston, MA, USA, p. 37-75.
- Vázquez P. M. (1996) Bacterias solubilizadoras de fosfatos inorgánicos asociadas a la rizosfera de los mangles: *Avicennia germinans* (L.) L y *Laguncularia racemosa* (L.) Gerth. Tesis para el título de Biólogo Marino. Univ. Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S.
- Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M. E., Lopez Cortes, A., Bashan, Y. (2000) Phosphate solubilizing microorganism associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils*, 30: 460-468.
- Vassilev, N., Vassileva, M. (2003) Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 435–440.
- Verma, S. C., Ladha, J. K., Tripathi, A. K. (2001) Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology*, 91: 127-141.
- Vessey, J. K. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255: 571-586.
- Vistoso, E., Theng, B. K. G., Bolan, N. S., Parfitt, R. L., Mora, M. L. (2012) Competitive sorption of molybdate and phosphate in Andisols. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 12: 59–72.
- Wakelin, S. A., Gupta, V. V., Harvey, P. R., Ryder, M. H. (2007). The effect of *Penicillium* fungi on plant growth and phosphorus mobilization in neutral to alkaline soils from southern Australia. *Canadian Journal of Microbiology*, 53: 106–115.
- Walpola, B. C., Yoon, M. H. (2012) Prospectus of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus availability in agricultural soils: A review. *African Journal of Microbiology Research*, 6(37): 6600-6605.
- Wani, P. A., Khan, M. S., Zaidi, A. (2007) Co-inoculation of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria to promote growth, yield and nutrient uptake in chickpea. *Agronomica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 55: 315-323.

- Whitelaw, M. A., Harden, T. J., Helyar, K. R. (1999) Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 655-665.
- Whitelaw, M. A. (2000) Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, 69: 99–151.
- Wikipédia (2012) Wikipédia, a enciclopédia digital. População mundial: http://pt.wikipedia.org/wiki/Popula%C3%A7%C3%A3o_mundial em 25/06/2012.
- Wu, S. C., Cao, Z. H., Li, Z. G., Cheung, K. C., Wong, M. H. (2005) Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma*, 125 (1/2): 155-166.
- Xiao, C., Chi, R., Li, X., Xia, M., Xia, Z. (2011) Biosolubilization of rock phosphate by three stress-tolerant fungal strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165: 719.
- Xie, J., Knight, J. D., Leggett, M. E. (2009) Comparison of media used to evaluate *Rhizobium leguminosarum* bivar *viciae* for phosphatesolubilizing ability. *Canadian of Journal of Microbiology*, 55: 910-915.
- Xin, C., Jian-Jun, T., Zhi-Guo, F., Shui-Jin, H. (2002) Phosphate-solubilizing microbes in rhizosphere soils of 19 weeds in Southeastern China. *Journal of Zhejiang University Science*, 3: 355-361.
- Xu, D. B., Madrid, C. P., Röhr, M., Kubicek, C. P. (1989) The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30: 553-558.
- Yahya, A., Azawi, S. K. A. (1998) Occurrence of phosphate solubilizing bacteria in some Iranian soils. *Plant and Soil*, 117: 135-141.
- Yuan, Q. P., Wang, J. D., Zhang, H., Qian, Z. M. (2005) Effect of temperature shift on production of xylanase by *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, 40: 3255-3257.
- Zaidi, A., Khan, M. S., Ahemad, M., Oves, M., Wani, P. A. (2009) Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. In: Mohammad Saghir Khan; Almas Zaidi and Javed Musarrat (Editors). *Microbial strategies for crop improvement*. Springer-Verlag, Berlin. p. 23-50.

- Zandonadi, D. B., Canellas, L. P., Façanha, A. R. (2007) Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. *Planta*, 225: 1583 – 1595.
- Zarabi, M., Alahdadi, I., Akbari, G. A., Akbari, G. A. (2011) A study on the effects of different biofertilizer combinations on yield, its components and growth indices of corn (*Zea mays* L.) under drought stress condition. *African Journal of Agricultural Research*, 6: 681–685.
- Zou, K., Binkley, D., Doxtader, K. G. (1992) New methods for estimating gross P mineralization and mobilization rates in soils. *Plant and Soil*, 147: 243–250.

APÊNDICES

Quadro 14. Análise química do Argissolo Amarelo

C	pH	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	SB	T	t	m	V
g kg ⁻¹		- mg dm ⁻³		----- cmol _c dm ⁻³ -----								
3,9	6,4	4	220	1,1	0,6	0,0	1,0	2,4	3,4	2,4	0%	70%

Conforme as recomendações da Embrapa (2009): C = dicromatometria em meio ácido; P e K⁺ = extrator Carolina do Norte; Ca²⁺, Mg²⁺ e Al³⁺ = extrator KCl 1mol L⁻¹ (Análises feitas no Laboratório de Análise de Solos e Fertilizantes da UFRRJ, Campus Leonel Miranda. Campos dos Goytacazes, RJ). Onde: C= teor de carbono orgânico; pH= potencial hidrogeniônico em água; P e K= fósforo e potássio disponível; Ca²⁺, Mg³⁺= cálcio e magnésio trocável; H+Al= acidez potencial; SB= soma de bases (K⁺, Ca²⁺, Mg³⁺); T= capacidade de troca de cátions= SB+(H+Al) ; t= capacidade efetiva de troca de cátions= SB+Al³⁺; m= saturação de Al³⁺ ; V= saturação por bases.

Quadro 15. Análise granulométrica do Argissolo Amarelo

Areia	Silte	Argila
----- % -----		
30,8	9,7	59,5

Análises feitas no Laboratório de Análise de Solos e Fertilizantes da UFRRJ, Campus Leonel Miranda. Campos dos Goytacazes, RJ.

Quadro 16. Análise química do vermicomposto de esterco bovino

C	pH	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	SB	T	t	m	V
g kg ⁻¹		- mg dm ⁻³		----- cmol _c dm ⁻³ -----								
118,0	7,0	2244	8601	15,3	19,6	0,0	3,2	61,0	64,2	61,0	0%	95%

Conforme as recomendações da Embrapa (2009): C = dicromatometria em meio ácido; P e K⁺ = extrator Carolina do Norte; Ca²⁺, Mg²⁺ e Al³⁺ = extrator KCl 1mol L⁻¹ (Análises feitas no Laboratório de Análise de Solos e Fertilizantes da UFRRJ, Campus Leonel Miranda. Campos dos Goytacazes, RJ). Onde: C= teor de carbono orgânico; pH= potencial hidrogeniônico em água; P e K= fósforo e potássio disponível; Ca²⁺, Mg³⁺= cálcio e magnésio trocável; H+Al= acidez potencial; SB= soma de bases (K⁺, Ca²⁺, Mg³⁺); T= capacidade de troca de cátions= SB+(H+Al) ; t= capacidade efetiva de troca de cátions= SB+Al³⁺; m= saturação de Al³⁺ ; V= saturação por bases.

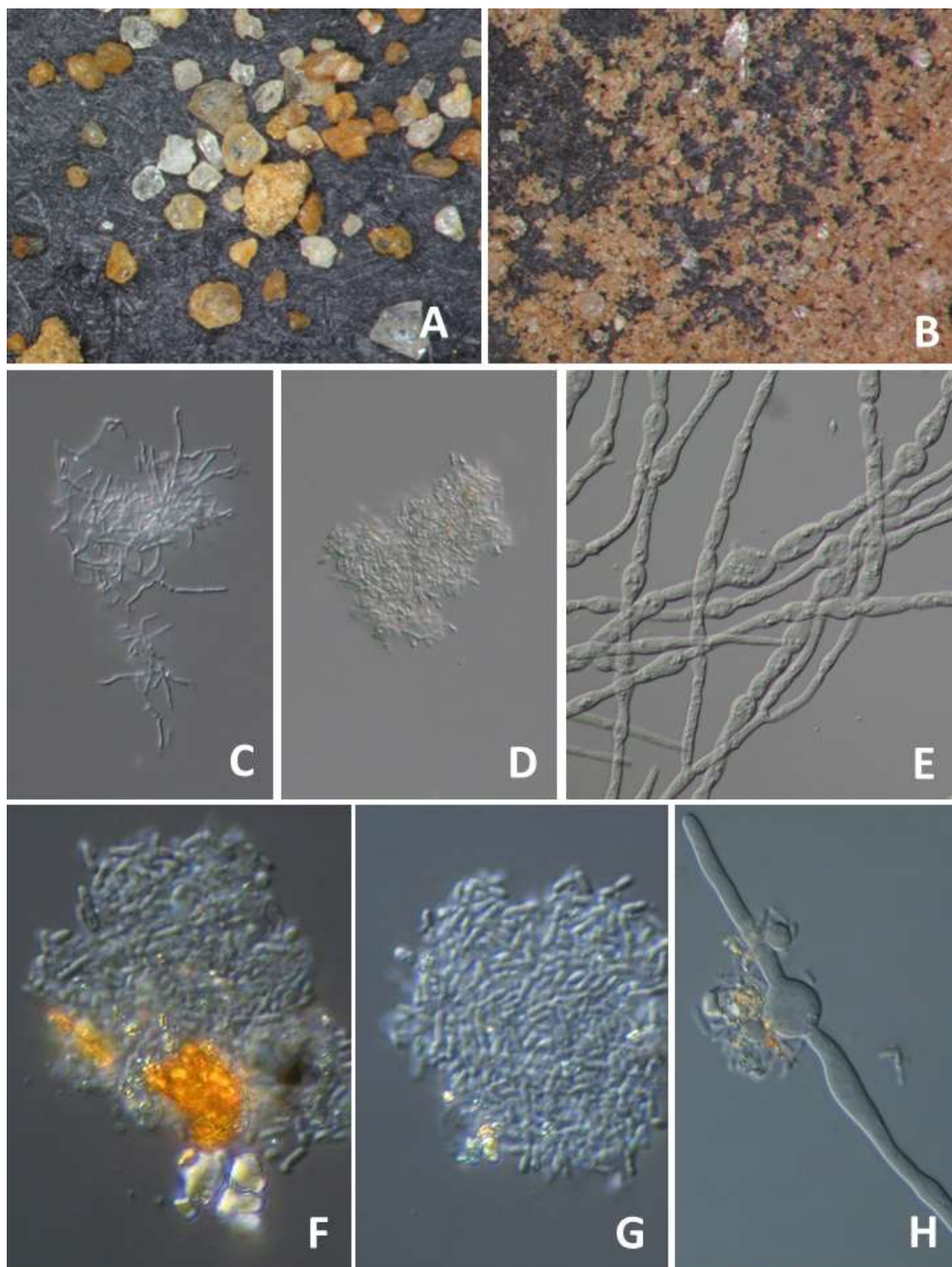


Figura 32: Microscopia estereoscópica da rocha fosfatada de Araxá em 100 mesh (A) e 325 mesh (B). Microscopia óptica de contraste diferencial e interferencial dos actinomicetos (C, 630x), bactérias (D, 630x) e fungos (E, 400x) utilizados nos *ensaios in vitro* e agregados bacterianos aderidos a fragmentos de rocha e em processo inicial (F, 1000x) e avançado de dissolução (G, 1000x). Associação entre o fungo e a bactéria no processo de dissolução de P em fragmentos de rocha fosfatada de Araxá (H, 500x).