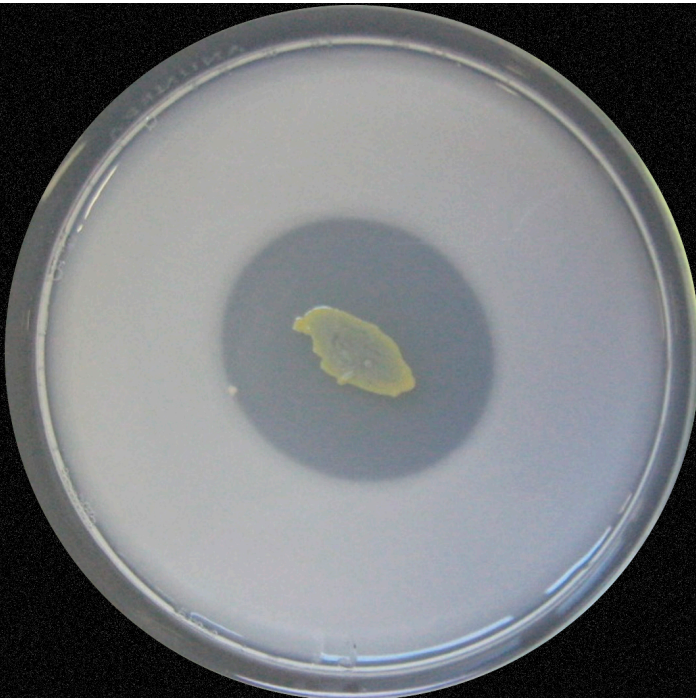


Prospecção de Comunidades Microbianas do Solo Ativas no Aproveitamento Agrícola de Fontes de Fósforo de Baixa Solubilidade



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 107

Prospecção de Comunidades Microbianas do Solo Ativas no Aproveitamento Agrícola de Fontes de Fósforo de Baixa Solubilidade.

*Eliane Aparecida Gomes
Francisco Adriano de Souza
Sylvia Moraes de Sousa
Maria José Vilaça de Vasconcelos
Ivanildo Evódio Marriel
Ubiana Cássia da Silva*

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2010

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

Home page: www.cnpms.embrapa.br

E-mail: sac@cnpms.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Antônio Carlos de Oliveira

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo

Afonso Viana, João Herbert Moreira Viana, Guilherme Ferreira

Viana e Rosângela Lacerda de Castro

Supervisão editorial: Adriana Noce

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento de ilustrações: Alexandre Esteves Neves

Editoração eletrônica: Alexandre Esteves Neves

Foto da capa: Eliane Aparecida Gomes

1ª edição

1ª impressão (2010): on line

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Milho e Sorgo**

Prospecção de comunidades microbianas do solo ativas no aproveitamento agrícola de fontes de fósforo de baixa solubilidade / Eliane Aparecida Gomes ... [et al.]. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2010.

34 p. : il. -- (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 107).

1. Microbiologia do solo. 2. Fósforo. 3. Solubilização.I. Gomes, Eliane Aparecida. II. Série.

CDD 631.422 (21. ed.)

© Embrapa 2010

Autores

Eliane Aparecida Gomes

Bióloga, Doutora em Genética e Melhoramento,
Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete
Lagoas, MG, 35701-970 eliane@cnpms.embrapa.br

Francisco Adriano de Souza

Engenheiro Agrônomo, Doutor em Ecologia de
Plantas e Microrganismos, Pesquisador da Embrapa
Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, 35701-970
francisco.adriano@cnpms.embrapa.br

Sylvia Morais de Sousa

Bióloga, Ph.D. em Biologia Molecular, Pesquisadora
da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG,
35701-970 smsousa@cnpms.embrapa.br

Maria José Vilaça de Vasconcelos

Bioquímica, Ph.D. em Biologia Molecular,
Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete
Lagoas, MG, 35701-970 mjose@cnpms.embrapa.br

Ivanildo Evódio Marriel

Engenheiro Agrônomo, Doutor em Microbiologia
do Solo, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo,
Sete Lagoas, MG, 35701-970
imarriel@cnpms.embrapa.br

Ubiana Cássia da Silva

Bióloga, Estudante de Agronomia na Universidade
Federal de São João del Rei, Sete Lagoas, MG,
35701-970 ubiana@yahoo.com.br

Sumário

Introdução	7
Fósforo no Solo e nas Plantas	8
Disponibilidade de P em Solos Ácidos	9
Fertilizantes Fosfatados	10
Microrganismos Solubilizadores de Fosfato	12
Prospecção de Microrganismos Solubilizadores de Fosfato	14
Mecanismos de Solubilização de P	16
Genética dos Microrganismos Solubilizadores de P	17
Biofertilizantes	19
Microrganismos Mineralizadores de Fosfato Orgânico	21
Conclusões e Perspectivas	24
Referências	25

Prospecção de Comunidades Microbianas do Solo Ativas no Aproveitamento Agrícola de Fontes de Fósforo de Baixa Solubilidade.

Eliane Aparecida Gomes

Francisco Adriano de Souza

Sylvia Moraes de Sousa

Maria José Vilaça de Vasconcelos

Ivanildo Evódio Marriel

Ubiana Cássia da Silva

Introdução

Os solos tropicais brasileiros geralmente são altamente intemperizados, ácidos e pouco férteis, fazendo com que as plantas cultivadas nestes ambientes sejam expostas a várias formas de estresses durante seu ciclo de crescimento. O desenvolvimento de uma agricultura sustentável nestes solos deve se fundamentar no uso da biodiversidade local, com um maior aproveitamento dos recursos biológicos, aliado ao uso de cultivares mais adaptadas às condições de estresses bióticos e abióticos com práticas de manejo adequadas. Juntos, estes fatores podem contribuir para o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável nessas áreas, além de diminuir os custos da produção, aumentando a produtividade e a rentabilidade do agronegócio.

Um dos fatores limitantes da expansão agrícola nestes solos é a alta capacidade de fixação de fósforo (P), resultando em uma baixa disponibilidade deste nutriente para as plantas (NOVAIS; SMYTH, 1999). O baixo nível de P nos solos é devido à alta reatividade de fosfatos solúveis com outros elementos, como alumínio e ferro, em solos ácidos, e cálcio, em solos calcários (BALIGAR; FAGERIA, 2001). O fósforo é adicionado aos solos na forma de fertilizantes fosfatados solúveis, sendo uma parte utilizada pelas plantas, enquanto a maior parte rapidamente forma complexos insolúveis com os constituintes do solo, tornando-se

indisponível para as plantas, o que leva à necessidade de frequentes aplicações deste nutriente (NOVAIS; SMYTH, 1999).

Dentre os principais mecanismos que influenciam a eficiência de aquisição de P no solo estão: modificações de atributos morfológicos da raiz, a presença de aerênquimas, modificações de características químicas na rizosfera, alterações de características fisiológicas de cinética de absorção, alterações em processos bioquímicos e interações com microrganismos do solo (BALIGAR; FAGERIA, 2001).

Nas interações com raízes de plantas, os microrganismos podem ser endofíticos, simbióticos ou de vida livre. Entre aqueles de vida livre, destacam-se os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSP), objeto deste documento, que são bactérias ou fungos capazes de solubilizar diferentes formas de fosfato de baixa solubilidade, deixando-os disponíveis para as plantas (BAREA et al., 2005).

Fósforo no solo e nas plantas

O fósforo é um dos macronutrientes essenciais para o desenvolvimento das plantas, uma vez que atua nas funções vitais básicas, estando envolvido em inúmeros processos biológicos, como formação dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) e fosfolipídeos, além de fluxo e estoque da energia por meio das moléculas de ATP e NADPH. Este elemento é, ainda, indispensável à fotossíntese e à respiração, além de diversas funções celulares, influenciando todo o ciclo do desenvolvimento vegetal, podendo favorecer o amadurecimento precoce das culturas (STAUFFER; SULEWSKI, 2004; NOVAIS et al., 2007).

No solo, o P pode ser encontrado de duas formas, fósforo inorgânico e fósforo orgânico, de acordo com o composto em que está ligado. O fósforo inorgânico é composto pelos minerais primários, P adsorvido e pequenas quantidades de P da solução do solo. O fósforo adsorvido pode ser encontrado ligado a vários minerais do solo, devido à sua elevada capacidade de formar complexos de alta energia de ligação.

Nestes complexos, as formas de P no solo podem estar associadas a óxidos de ferro (P-Fe), de alumínio (P-Al) e silicatos de alumínio nos solos ácidos e ligadas a carbonato de cálcio (P-Ca) nos solos alcalinos (NOVAIS; SMITH, 1999). Dependendo do tipo e do manejo do solo, o componente do P de origem orgânica contribui com 30 a 50% na composição do P total no solo (RICHARDSON et al., 2009), principalmente na forma indisponível de fosfato inositol (fitato) e outras como fosfo-monoésteres, fosfolipídios, ácidos nucleicos e fosfoésteres (NAHAS, 1991; GYANESHWAR et al., 2002).

Disponibilidade de P em solos ácidos

Embora os solos geralmente apresentem uma grande quantidade de P total, apenas uma pequena parte está imediatamente disponível na solução do solo como ânions ortofosfato (predominantemente como HPO_4^{2-} e H_2PO_4^-) para absorção pelas plantas. Na maioria dos solos, a concentração de ortofosfato em solução é baixa, normalmente 1-5 μM (BIELESKI, 1973), e devem ser suplementados por outras fontes de P para satisfazer às necessidades nutricionais da planta. Devido à absorção, ortofosfato é rapidamente esgotado nas imediações das raízes das plantas, e, como tal, um grande gradiente de concentração ocorre na rizosfera entre o solo e a superfície radicular (TINKER; NYE, 2000). Como na maioria dos solos a taxa de difusão de ortofosfato é insuficiente para vencer os gradientes, a absorção de P é limitada na maioria dos casos. No entanto, resultados de pesquisas mostram que as plantas estão bem adaptadas para a absorção de P de baixas concentrações, que são típicas de soluções de solo, conforme indicado pela captação de concentrações mínimas de 0,01 a 0,1 M para diferentes espécies (JUNGK, 2001). Baseado nisso, sugere-se que o fornecimento de P à superfície radicular e sua disponibilidade é influenciada pela raiz e por processos microbianos e que a capacidade das raízes para explorar novas regiões do solo são de maior importância para a aquisição de P que a cinética associada à sua absorção.

Segundo Siqueira e Franco (1988), nos solos tropicais, acumulam-se, ao longo do período de cultivo, em torno de 500 kg de P retido ou fixado nas partículas do solo, por hectare, sendo distribuído em média, da seguinte forma: 40% ligado ao Al; 30% ao Fe e de 5 a 10% ao Ca. Existe, ainda, um estoque de P orgânico que, no caso destes solos, corresponde de 10 a 30% do P total. Assim, a biodisponibilidade de P nos solos, em geral, é muito baixa, apesar do conteúdo total de P neles ser de 200 a 500 vezes maior que a quantidade disponível para uso pelas plantas (LIU et al., 2006). A concentração de fosfato inorgânico na solução da maioria dos solos varia de 0,1 a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, fazendo com que as plantas absorvam este nutriente de soluções com concentrações extremamente baixas (LOUGHMAN et al., 1983). A quantidade de P absorvida por uma lavoura de milho, por exemplo, é muito pequena quando se considera o estoque total deste elemento no solo, porém, elevada em relação ao P na solução do solo.

Fertilizantes fosfatados

Com o intuito de elevar a produtividade agrícola nacional, são adicionadas aos solos grandes quantidades de adubos fosfatados. Porém, considerando o total de fertilizantes aplicados, apenas de 10 a 20% são, efetivamente, utilizados pelos vegetais (VANCE et al., 2003), pois 75-90% dos adubos fosfatados adicionados são precipitados pela complexação com cátions metálicos presentes nos solos (STEVENSON, 1986). Inúmeras consequências adveem deste fato, pois além do significativo prejuízo econômico, tem-se a geração de problemas ambientais, como o agravamento do processo de eutrofização das águas de mananciais hídricos pela lixiviação dos adubos fosfatados e a produção de resíduos contaminantes e tóxicos pela síntese dos fertilizantes solúveis através do tratamento com ácidos (VAN STRAATEN, 2002). Segundo alguns autores, os fosfatos acumulados em solos agrícolas são suficientes para sustentar a agricultura por cerca de 100 anos (GOLDSTEIN et al., 1993).

A principal fonte de P para a produção de fertilizantes são as rochas fosfáticas que constituem um recurso natural, cuja denominação fos-

fato natural ou rocha fosfática cobre uma ampla variação de tipos de minérios, tendo em comum a constituição de apatitas, sendo a fluorapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO})_4\text{F}_2$ o principal componente de fosfatos naturais, como em Jacupiranga, Catalão, Araxá e Tapira, no Brasil, e no Tennessee, nos EUA.

Os fosfatos naturais são as matérias-primas para a obtenção dos fertilizantes fosfatados solúveis, como superfosfato simples, triplo ou fosfatos de amônio, que são processados quimicamente por meio de ácido sulfúrico ou ácido fosfórico, processo de alto custo energético, responsável pelo custo elevado dos fertilizantes fosfatados e que pode causar danos ambientais. A utilização direta das fontes naturais de P como fertilizantes, principalmente para culturas anuais, não é economicamente viável, particularmente em solos com alta capacidade de adsorção e baixa capacidade de troca iônica, como é o caso dos solos de Cerrado (SIMPSON et al., 1997).

Neste contexto, tem sido avaliada a utilização de fosfatos naturais brasileiros quanto à disponibilização de fósforo no solo, com intuito de utilizá-los como fonte alternativa de P para as culturas, reduzindo o uso de produtos químicos e favorecendo a sustentabilidade ambiental e agrícola. No entanto, e particularmente em solos não ácidos, um nível mínimo de processamento das rochas é necessário antes da aplicação no solo. Mesmo em solos com pH abaixo de 5,5-6,0, fosfatos de rocha se tornam tão eficientes quanto superfosfatos somente depois de quatro anos de aplicação direta anual (GHANI et al., 1994). Contudo, o emprego direto dessas fontes naturais de fósforo para fertilização do solo não é economicamente recomendável sobretudo nos solos tropicais, onde estes minerais são adsorvidos com facilidade (SIMPSON et al., 1997).

A alteração dos minerais das rochas em ambientes naturais é um processo conhecido causado pela ação da água e de ácidos orgânicos exsudados pelas raízes das plantas e por microrganismos que aceleram este processo. Por essa razão, existe um renovado e crescente interesse na manipulação dos fosfatos de rochas por métodos biológicos

visando o aumento de sua eficiência agrônômica. Dessa forma, alguns estudos têm buscado o uso de microrganismos com potencial de solubilização de P agregados aos fosfatos naturais para aumentar a disponibilidade deste elemento (STAMFORD et al., 2004).

Microrganismos solubilizadores de fosfato

Os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSP) são comuns no solo, onde as bactérias constituem um grupo que varia de 1-50% e os fungos de 0,5 a 1,0% da população total destes microrganismos (KUCEY, 1983). A maior proporção de MSP está concentrada na rizosfera, sendo estes metabolicamente mais ativos que aqueles isolados de outros locais (VAZQUEZ et al., 2000; BAREA et al., 2005).

A maioria destes microrganismos solubiliza P ligado ao Ca e somente poucos conseguem solubilizar complexos de P-Al e P-Fe, podendo ser ainda, eficientes na solubilização de fosfatos de rocha (GYANESHWAR et al., 2002). O fosfato insolúvel mobilizado pelos microrganismos pode ser absorvido pelas raízes das plantas, enquanto as plantas exsudam compostos de carbono, principalmente açúcares, que podem ser metabolizados pelos microrganismos da rizosfera (PÉREZ et al., 2007).

MSP são caracterizados pela sua capacidade de solubilizar formas precipitadas de P quando cultivados em meios de cultura em laboratório e incluem uma ampla variedade de organismos simbióticos e não simbióticos, como espécies de *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium*, actinobactérias e vários fungos como *Aspergillus* e *Penicillium* (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999; WHITELAW, 2000; GYANESHWAR et al., 2002). A seleção de MSP é rotineiramente baseada na solubilização de fosfatos de Ca moderadamente solúveis (geralmente, fosfato de tricálcio $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ e fosfatos contendo hidróxi- e fluorapatitas $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$ e $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2]$ e fosfatos de Fe ($\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e Al ($\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). A quantidade de P solubilizado é altamente dependente da fonte (solubilidade) do P e, para diferentes microrganismos, é influenciada pe-

las condições de cultivo. Por exemplo, comumente relata-se serem os fungos mais eficientes na solubilização de fosfatos de Fe e Al, enquanto a capacidade dos diferentes organismos de solubilizar fosfatos de Ca é influenciada pela fonte de carbono e nitrogênio no meio, pela capacidade de tamponamento do meio e da fase em que as culturas são amostradas (KUCEY, 1983; ILLMER et al., 1995; WHITELAW et al., 1999, NAHAS, 2007). A natureza da fonte de nitrogênio utilizada no meio de cultura também afeta a capacidade de solubilização dos microrganismos, sendo observada maior taxa de solubilização na presença de sais de amônio do que na presença de nitrato como fonte de nitrogênio. Este efeito pode ser atribuído à liberação de prótons para compensar a absorção de amônio, levando a uma diminuição do pH extracelular (ROSS; LUCKNER, 1984). Em alguns casos, no entanto, amônio pode levar a um decréscimo na solubilização de P (REYES et al., 1999a, b).

Sob condições controladas de crescimento, vários estudos têm demonstrado um maior crescimento e uma maior nutrição de P das plantas inoculadas com MSP, fato que é muitas vezes atribuído à atividade de solubilização de P dos microrganismos envolvidos (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999; WHITELAW, 2000; GYANESHWAR et al., 2002). No entanto, efeitos claros do papel de MSP em ambientes mais complexos do solo e em condições de campo, têm sido mais difíceis de serem demonstrados e respostas inconsistentes das plantas e de diferentes microrganismos foram observados. Como discutido por Richardson (2001), isto pode ser devido a uma série de fatores que incluem conhecimento insuficiente para a introdução e compreensão da dinâmica de microrganismos e sua interação com comunidades microbianas nativas complexas no solo, a ausência aparente de qualquer associação específica entre os parceiros, e a pobre compreensão dos mecanismos reais envolvidos, tanto para os microrganismos e a sua interação quanto para a eficácia em diferentes ambientes de solo.

Por outro lado, a promoção do crescimento pode não estar exclusivamente associada à solubilização de P, uma vez que a produção de fitohormônios pode estar envolvida (WAKELIN et al., 2006). Gulden e Vessey (2000) demonstraram que a promoção do crescimento das

raízes e o aumento do P nas plantas inoculadas com *Penicillium bilaii* estavam associados primeiramente ao aumento do crescimento da raiz, incluindo maior comprimento radicular específico e produção de pelos mais longos na raiz. Estes estudos destacam a dificuldade em determinar o mecanismo real associado à promoção do crescimento, uma vez que a estimulação do crescimento de raízes também contribui para um maior potencial para a aquisição de P. É importante, portanto, que os experimentos para demonstrar os benefícios do MSP sejam conduzidos com várias fontes de P, onde os benefícios da inoculação podem ser corretamente avaliados, e que medidas específicas de aquisição de P (por exemplo, por diluição isotópica) sejam realizadas para confirmar a mobilização de P de fontes do solo pouco disponíveis às raízes.

Prospecção de microrganismos solubilizadores de fosfato

MSP podem ser isolados utilizando-se diluições em série ou técnicas de enriquecimento de cultura em meio Pikovskaya (PIKOVSKAYA, 1948) a partir de solo não rizosférico (Figura 1) e solo rizosférico, rizoplano, e também de outros ambientes, tais como solos de áreas de depósito de fosfato de rocha e áreas de ambientes marinhos (GAUR, 1990). Após a incubação dos organismos nas placas com meio sólido contendo fosfato insolúvel, MSP são detectados pela formação de halos claros em torno de suas colônias (Figura 2). Recentemente, outros métodos para o isolamento e seleção de MSP foram sugeridos (GUPTA et al., 1994; NAUTIYAL, 1999). Uma vez que certas estirpes de organismos solubilizadores de fosfato exibem variação e instabilidade no que diz respeito à atividade de solubilização de fosfato (ILLMER; SCHINNER, 1992), eles devem ser repetidamente subcultivados para avaliar a persistência do potencial de solubilizadores de fosfato. Uma vez que organismos eficientes na solubilização de fosfato são selecionados, a capacidade de solubilização de fosfato insolúvel deve ser avaliada em meio de cultura líquido. Finalmente, culturas solubilizadores de fosfato eficientes são usadas para fazer os inoculantes, e sua performance em condições de vasos em casa de vegetação ou campo é avaliada em diferentes culturas.



Figura 1. Isolamento de microrganismos solubilizadores de fosfato de solo rizosférico.

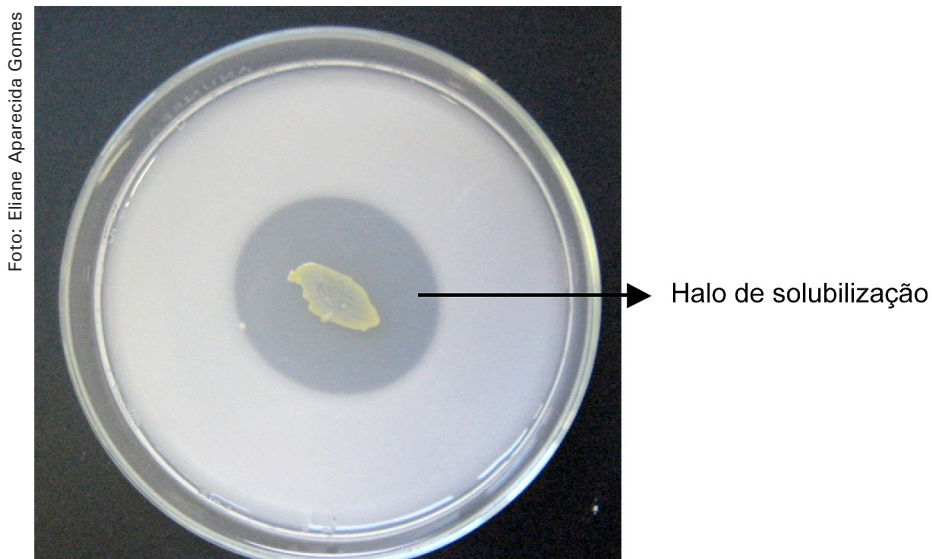


Figura 2. Meio de cultura com fosfato natural inoculado com bactéria, mostrando halo de solubilização de fosfato natural de rocha.

Mecanismos de solubilização de P

A capacidade dos microrganismos em solubilizar o fósforo inorgânico do solo está relacionada com o potencial de reduzir o pH do meio tanto pela liberação de ácidos orgânicos quanto de prótons. Os ácidos orgânicos secretados podem dissolver diretamente o fosfato mineral como um resultado de troca de ânions de PO_4^{2-} – pelo ânion do ácido ou podem quelar íons de Fe e Al associados com o fosfato (OMAR, 1998). MSP podem produzir ácidos orgânicos, tais como: acetato, lactato, oxalato, tartarato, succinato, citrato, gluconato, cetogluconato, glicolato, etc. (BANIK; DEY, 1982; CUNNINGHAM; KUIACK, 1992; GYANESHWAR et al., 1998; KIM et al., 1998). Contudo, ainda não foi relatada nenhuma correlação definitiva entre a produção de ácidos pelos MSP e a quantidade de fosfato solubilizado (ASEA et al., 1988). O papel dos ácidos orgânicos produzidos pelos MSP na solubilização do fosfato pode ser devido à diminuição de pH, à função de quelante de cátions ou pela competição com fosfatos por sítios de adsorção no solo (NAHAS, 1996). Ácidos inorgânicos, por exemplo, ácido clorídrico, sulfídrico, nítrico e carbônico também podem solubilizar fosfato, mas eles são menos eficazes em comparação com ácidos orgânicos no mesmo pH (KIM et al., 1997).

Outras hipóteses baseiam-se na correlação existente entre o pH e a quantidade de P solubilizado (ILLMER; SCHINNER, 1992; ILLMER et al., 1995; RODRIGUES; FRAGA, 1999; WHITELAW, 2000). A redução do pH pode ser uma consequência da liberação de ácidos orgânicos (WHITELAW et al., 1999), no entanto, o decréscimo do pH no meio de cultura pode ser também o resultado de uma absorção seletiva pelos microrganismos de alguns nutrientes do meio de cultura e não pela produção de ácidos (BARROSO; NAHAS, 2005).

Entre as bactérias formadoras de nódulos em leguminosas (por exemplo, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*), a atividade de solubilização de fosfato está associada com a produção de ácido 2-cetoglucônico. Halder e Chakrabarty (1993) observaram que a capacidade de solubiliza-

ção de P por *Rhizobium* foi totalmente abolida pela adição de NaOH, indicando que a capacidade de solubilização desta estirpe é devida à habilidade de reduzir o pH do meio.

No entanto, a acidificação parece não ser o único mecanismo de solubilização, uma vez que a capacidade de redução do pH, em alguns casos, não se correlaciona com a capacidade de solubilizar fosfatos minerais (SUBHA RAO, 1982). Neste contexto, a capacidade quelante de ácidos orgânicos também é importante, como foi demonstrado por Kucey (1988), em que a adição de 0,05 M de EDTA ao meio tem o mesmo efeito de solubilização que a inoculação com *Penicillium bilaii*.

Genética dos microrganismos solubilizadores de P

Na maioria das bactérias, a capacidade de solubilização de fosfatos minerais está relacionada à produção de ácidos orgânicos (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999). Goldstein (1996) propôs a via de oxidação direta de glicose a ácido glicônico como um dos principais mecanismos de solubilização do fosfato mineral em bactérias gram-negativas. O primeiro passo da via é a oxidação de glicose a ácido glicônico pela glicose desidrogenase (GDH), enzima membro das quinoproteínas que requer o cofator pirroloquinolina quinona (PQQ). Ácido glicônico é então oxidado a ácido 2-ceto glucônico, um dos ácidos orgânicos mais fortes que existem naturalmente. Uma vez que esta via ocorre no espaço periplasmático, o ambiente extracelular se torna altamente ácido. Bactérias solubilizadoras de P que usam esta via de oxidação direta podem liberar quantidades significantes de Pi a partir de fosfato de cálcio via acidificação de seu ambiente extracelular.

Goldstein e Liu (1987) foram os primeiros a clonar um gene envolvido na solubilização de fosfato mineral da bactéria gram-negativa *Erwinia herbicola*. A expressão desse gene permitiu a produção de ácido glicônico em *Escherichia coli* HB101 e conferiu a esta cepa a capacidade de

solubilizar hidroxapatita. Outro tipo de gene (*gabY*) envolvido na produção de ácido glicônico e na solubilização de fosfato mineral foi clonado de *Pseudomonas cepacia* (BABU-KHAN et al., 1995). No entanto, a sequência de aminoácidos deduzida a partir deste gene não apresentou homologia com genes previamente clonadas da via oxidação direta (síntese de ácido glicônico), mas foi semelhante a componentes ligados à proteína de membrana histidina permease. Outros genes isolados envolvidos no fenótipo de solubilização não parecem estar relacionados com os genes biossintéticos *pqq*. Kim et al. (1997) observaram que um fragmento de DNA genômico de *Enterobacter agglomerans* mostrou atividade de solubilização em *E. coli* JM109, embora o pH do meio não tenha sido alterado. Estes resultados indicam que a produção de ácido é um fator importante, mas não o único mecanismo de solubilização de fosfato por bactérias (ILLMER; SCHINNER, 1992). Todas essas descobertas demonstram a complexidade da solubilização em diferentes cepas de bactérias, mas ao mesmo tempo oferecem uma base para uma melhor compreensão deste processo.

A Tabela 1 mostra alguns genes envolvidos na solubilização de fosfato isolados de diferentes espécies de bactérias.

Tabela 1. Genes clonados envolvidos na solubilização de P

Microrganismo	Gene ou plasmídeo	Característica	Referência
Erwinia herbicola	mps	Produção de ácido glicônico. Provavelmente envolvido na síntese de PQQ *	Godstein e Liu (1987)
Pseudomonas cepacia	gabY	Produção de ácido glicônico. Nenhuma homologia com PQQ	Babu-Khan et al. (1995)
Enterobacter agglomerans	pKKY	Solubiliza P em <i>E. coli</i> JM 109. Não reduz o pH	Kim et al. (1997)

Microrganismo	Gene ou plasmídeo	Característica	Referência
Rahnella aquatilis	pK 1M10	Solubiliza P e produz ácido glicônico em E. coli DH5-alfa	Kim et al. (1997)
Serratia marcescens	pKG3791	Produção de ácido glicônico e solubilização de P mineral	Krishnaraj e Goldstein (2001)

* cofator pirroloquinolina quinona

Biofertilizantes

A descoberta desta mútua relação entre plantas e MSP tem estimulado o desenvolvimento de novas tecnologias, tais como os biofertilizantes. Nesse contexto, vários estudos têm sido realizados com a finalidade de avaliar microrganismos com capacidade de solubilizar fontes pouco solúveis de P, como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999; WAKELIN et al., 2004; CHEN et al., 2006; ACHAL et al., 2007; XIAO et al., 2008; OGBO, 2010).

A maioria dos estudos são baseados no isolamento dos MSP de solos, avaliação da capacidade de solubilização em condições de meio de cultura (REYES et al., 2006; PÉREZ et al., 2007; XIAO et al., 2008) e posterior inoculação dos microrganismos nas sementes (WHITELAW, 2000; WU et al., 2005; VASSILEV et al., 2006; EL-TARABILY et al., 2008; HAMEDA et al., 2008; NISHANTH; BISWAS, 2008), ou pela adição do P solubilizado pelos microrganismos diretamente nos solos (VASSILEV; VASSILEVA, 2003). Na abordagem de uso de MSP como inoculante de sementes, a capacidade dos MSP de competir com outros microrganismos estabelecidos na rizosfera pode ser baixa, fazendo com que a quantidade de P liberada por eles seja insuficiente para um aumento substancial do crescimento vegetal (RICHARDSON et al.,

2009). Neste sentido, uma alternativa seria a substituição da inoculação de sementes com MSP pelo uso destes para produção de fertilizante organomineral a partir da mistura com fosfato de rocha moído e uma fonte de carbono. Com isto, deve-se produzir biofertilizantes contendo formas solúveis de P (GOLDSTEIN et al., 1993) a um custo bem mais baixo que os fosfatos solúveis (superfosfatos simples ou triplo), atualmente utilizados.

Segundo Nahas (1999), resultados contrastantes quanto ao uso de MSP em experimentos de laboratório ou campo podem ocorrer porque a eficiência da solubilização depende da estirpe do microrganismo, do fosfato a ser solubilizado, do tipo de solo, cultivar, acidez e da natureza dos materiais orgânicos que servirão como fonte de carbono para o crescimento dos microrganismos. Portanto, para o desenvolvimento de tecnologias e de processos que maximizem a solubilização de fosfatos naturais de rocha existe a necessidade da geração de novos conhecimentos e pesquisas a respeito dos fatores que influenciam o crescimento dos microrganismos e a melhor maneira de utilizá-los para produção de biofertilizantes. Neste sentido, merece atenção especial o tipo de matéria orgânica utilizada. Neste caso, deverá ser feito um *screening* na coleção dos microrganismos identificados a partir de ensaios in vitro, determinando, para cada um, seu potencial de solubilização para cada fonte de fosfato natural (fósforo ligado a Ca, Fe, ou Al) e para cada grande grupo de fonte de carbono (ex.: esterco bovino ou cama de frango).

A capacidade dos microrganismos 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. Esta é uma tecnologia com grandes possibilidades econômicas, existindo atualmente na Austrália e no Canadá produtos utilizando tais microrganismos como inoculantes, tais como JumpStart; Philom Bios, no Canadá, à base de *Penicillium bilaiae*, e na Austrália, o PR-70 Release, produzido pela Bio-Care Technology, utilizando *P. radicum*. 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 num estágio inicial, necessitando-se de mais resultados de pesquisa, tanto na área de isolamento dos microrganismos 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 devido aos seguintes fatores: a) permitir o uso em larga escala de reservas nacionais de fosfato de baixa reatividade; b) reduzir a dependência do país de fertilizantes químicos processados; c) possibilitar uso mais nobre de grandes reservas de matéria orgânica, como esterco bovino e cama de frango, para a produção de fertilizantes organo-minerais, reduzindo o impacto ambiental destes resíduos; d) usar esta tecnologia de produção de biofertilizante também na agricultura familiar. Neste último aspecto, uma estratégia interessante seria possibilitar ao agricultor a produção de um fertilizante rico em fósforo solúvel na propriedade, utilizando fosfato de rocha e uma fonte de carbono (esterco) como meio para multiplicar uma quantidade inicial de MSP. Estes microrganismos solubilizadores seriam produzidos em biofábricas e repassados em doses adequadas aos produtores interessados. Com isso, será possível ao agricultor obter um fertilizante fosfatado eficiente e de custo bem mais baixo que os das fontes de alta solubilidade atuais (superfosfatos simples e triplo). Outra vantagem desta tecnologia é que os microrganismos solubilizadores ficam ativos nos solos promovendo a solubilização gradativa do P que foi adicionado na forma de fosfatos solúveis e que se encontra adsorvido a partículas do solo e indisponível para as plantas. Este fósforo adsorvido pode ser lixiviado (principalmente via erosão laminar) para mananciais aquáticos, promovendo a eutrofização de rios e lagos.

Microrganismos mineralizadores de fosfato orgânico

A degradação dos restos vegetais e animais incorporados ao solo, realizada principalmente por microrganismos, até seus constituintes

minerais, é chamada de mineralização. Sendo um processo biológico, está sujeito às condições do ambiente que favoreçam a atividade dos microrganismos (NAHAS, 1991; RICHARDSON et al., 2009). Alguns microrganismos do solo desempenham um papel crucial na ciclagem de nutrientes como decompositores de resíduos vegetais, mineralizando compostos orgânicos e liberando fósforo inorgânico (NAHAS et al., 1994; LÓPEZ-HERNANDEZ et al., 1998). Se, por um lado, o principal mecanismo para solubilizar o P inorgânico é a produção de ácidos orgânicos, por outro lado, o principal mecanismo para a mineralização do P orgânico de fontes insolúveis por microrganismos é a produção de enzimas fosfatases. Os microrganismos têm sido considerados como os principais produtores destas enzimas no solo (GYANESHWAR et al., 2002; RICHARDSON et al., 2005; SIQUEIRA et al., 2004; TARAFDAR; GHARU, 2006; RICHARDSON et al., 2009), mais que raízes de plantas (TARAFDAR et al., 2001). Richardson et al. (2009) destacaram o potencial de microrganismos do solo em aumentar a disponibilidade de P a partir de fitato, pela produção de fitase. Entretanto, estes microrganismos mineralizadores de P orgânico têm sido pouco estudados e pouco se conhece sobre estes processos e mecanismos.

No Brasil, os avanços relacionados à prática do plantio direto têm proporcionado solos agricultáveis cada vez mais ricos em matéria orgânica, principalmente devido ao processo de decomposição da cobertura vegetal deixada sob o solo neste tipo de plantio (BAYER et al., 2004). Em plantio convencional, ocorre uma maior manipulação do solo e um revolvimento de resíduos de plantas para o seu interior. Por outro lado, em plantio direto, o solo é pouco revolvido, os resíduos das plantas permanecem na sua superfície não sendo mecanicamente misturados no solo. As raízes das plantas tendem a se concentrar próximas à superfície do solo. Normalmente, a parte superficial do solo do plantio direto possui temperaturas mais baixas, maior acidez, maior oxidação e maior umidade que a superfície do solo de plantio convencional. Estas condições em plantio direto tendem a causar um maior acúmulo da matéria orgânica e menores taxas de decomposição que em plantio convencional.

Está bem evidenciado que solos ricos em matéria orgânica contêm maior quantidade de fósforo orgânico, que se encontra em forma indisponível para absorção pelas raízes das plantas (BAYER et al., 2004; WAKELIN et al., 2004). A quantidade de P orgânico nestes materiais é constituída por 30 a 50% de fosfatos de inositol (fitatos), 3 a 5 % de ácidos nucléicos e nucleotídeos, 1% de fosfolipídeos e outros compostos em quantidades mínimas e outros ainda não definidos (NAHAS, 1991). Nesse sistema de plantio torna-se de grande importância a investigação de microrganismos capazes de mineralizar o fósforo indisponível o que pode resultar na maior eficiência na absorção de nutrientes pelas plantas.

No Brasil, dezoito milhões de hectares são anualmente plantados sob plantio direto (CARVALHO, 2010). Como a cultura do milho no Cerrado brasileiro vem sendo em grande parte manejada sob plantio direto, microrganismos mineralizadores de fósforo são um potencial a ser explorado como possíveis inoculantes de sementes de milho em plantio direto. Nesse sentido, poucos estudos têm investigado grupos específicos de microrganismos mineralizadores de P a partir de fosfolipídios (RICHARDSON et al., 2009). A fonte mais comum de fosfolipídios é a lecitina. O fitato é uma boa fonte de fósforo orgânico e está presente em maior quantidade no solo (RICHARDSON, 2001; WAKELIN et al., 2004, RICHARDSON et al., 2005), mas sua decomposição pode ser muito limitada porque ele pode facilmente ser adsorvido e precipitado com metais, formando moléculas insolúveis (NAHAS 1991; SIQUEIRA et al., 2004). A degradabilidade dos compostos de fósforo orgânico depende principalmente das propriedades físico-químicas e bioquímicas de suas moléculas; por exemplo, fosfatos de ácidos nucléicos, fosfolipídios e carboidratos são facilmente quebrados, mas ácidos fítics, polifosfatos e fosfonatos são decompostos mais vagorosamente (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999). No entanto, a habilidade dos microrganismos em solubilizar o fósforo de várias fontes de P insolúveis, orgânicas e inorgânicas, tem sido considerada como uma desejável característica para uso diversos (RICHARDSON et al., 2005), o que torna também importante a investigação desta habilidade em várias fontes de P para os microrganismos da rizosfera de milho.

Conclusões e perspectivas

Existe um grande potencial para o desenvolvimento de MSP como inoculantes. Para sua ampla aplicação é necessário um maior entendimento da ecologia microbiana e da dinâmica das populações no solo, além do desempenho inconsistente em alguns ambientes. Diante disso, pesquisas visando a melhoria do processo de solubilização, do desempenho e da interação do MSP com outros microrganismos no solo e a sua utilização como inoculantes são necessárias. Métodos de produção de inóculos (por exemplo o uso de veículos apropriados, viabilidade e avaliação da longevidade do inóculo) e a possibilidade do desenvolvimento de interações com fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio precisa ser considerada. O desenvolvimento de melhores métodos de *screening* dos MSP e o entendimento da base genética da solubilização de P pode ajudar no desenvolvimento de inoculantes mais eficientes.

Outra possibilidade é a manipulação genética dos microrganismos visando melhorar a sua capacidade de solubilização de fosfato e/ou a introdução desta característica em outros microrganismos importantes para o crescimento das plantas. A manipulação genética pela tecnologia do DNA recombinante oferece uma abordagem viável para a obtenção de linhagens melhoradas. Clonagem de genes envolvidos no processo de solubilização do fosfato mineral, tais como os fatores que influenciam a síntese de ácidos orgânicos, seria o primeiro passo nesse programa de manipulação genética. Subclonagem destes genes em vetores apropriados e sua transferência e expressão para outras cepas pode ser um processo bem sucedido para melhorar a capacidade de solubilização de fosfato de linhagens selecionadas. Além disso, a seleção por métodos de genética clássica de mutantes com aumento de produção de ácidos orgânicos poderia constituir uma abordagem eficaz que não pode ser subestimada.

Referências

- ACHAL, V.; SAVANT, V. V.; REDDY, M. S. Phosphate solubilization by a wild type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus thuringiensis*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 695-699, 2007.
- ASEA, P. E. A.; KUCEY, R. M. N.; STEWART, J. W. B. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 20, p. 459-464, 1988.
- BABU-KHAN, S.; YEO, T. C.; MARTIN, W. I.; DURON, M. R.; ROGERS, R. D.; GOLDSTEIN, A. H. Cloning of a mineral phosphate solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 972-978, 1995.
- BALIGAR, V. C.; FAGERIA, N. K. Nutrient use efficiency in plants. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 32, p. 921-950, 2001.
- BANIK, S.; DEY, B. K. Available phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate solubilizing microorganisms. **Plant and Soil**, The Hague, v. 69, p. 353-364, 1982.
- BAREA, J.-M.; POZO, M. J.; AZCÓN, R.; AGUILAR, C. A. Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 56, n. 417, p. 1761-1778, 2005.
- BARROSO, C. B.; NAHAS, E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 29, p. 73-83, 2005.
- BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; PAVINATO, A. Armazenamento de carbono em frações lábeis da matéria orgânica de um Latossolo Vermelho sob plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 677-683, 2004.

BIELESKI, R. L. Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 24, p. 225-252, 1973.

CARVALHO, A. M. de. **Plantio direto com qualidade no Cerrado**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2010. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/242/>>. Acesso em: 25 out. 2010.

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

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

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

GAHOONIA, T. S.; NIELSEN, N. E. Variation in root hairs of barley cultivars doubled soil phosphorus uptake. **Euphytica**, Wageningen, v. 98, p. 177-182, 1997.

GAUR, A. C. **Phosphate solubilizing microorganisms as biofertilizers**. New Delhi: Omega Scientific Publisher, 1990. 176 p.

GHANI, A.; RAJAN, S. S. S.; LEE, A. Enhancement of rock phosphate solubility through biological processes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 26, p. 127-136, 1994.

GOLDSTEIN, A. H. Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by Gram-negative bacteria. In: TORRIANI-GORINI, A.; YAGIL, E.; SILVER, S. (Ed.). **Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology**. Washington: ASM Press, 1996. p. 197-203.

GOLDSTEIN, A. H.; LIU, S. T. Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola*. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 5, p. 72-74, 1987.

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

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. **Legumes: importance and constraints to greater use Plant Physiology**, Bethesda, v. 131, p. 872-877, 2003.

GULDEN, R. H.; VESSEY, J. K. *Penicillium bilaii* inoculation increases root hair production in field pea. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 80, p. 801-804, 2000.

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

GYANESHWAR, P.; NARESH, K. G.; PAREKH, L. J. Effect of buffering on the phosphate solubilizing ability of microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 14, p. 669-673, 1998.

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

HALDER, A. K.; CHAKRABARTY, P. K. Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. **Folia Microbiologica**, Prague, v. 38, p. 325-330, 1993.

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

ILLMER, P.; BARBATO, A.; SCHINNER, F. Solubilization of hardlysoluble AIPO₄ with P-solubilizing microorganisms. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, p. 265-270, 1995.

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

JUNGK, A. Root hairs and the acquisition of plant nutrients from soil. **Journal of Plant Nutrition Soil Science**, v. 164, p. 121-129, 2001.

KIM, K. Y.; JORDAN, D.; McDONALD, G. A. Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 24, p. 347-352, 1997.

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

KRISHNARAJ, P. U.; GOLDSTEIN, A. H. Cloning of a *Serratia marcescens* DNA fragment that induces quinoprotein glucose dehydrogenase-mediated gluconic acid production in *Escherichia coli*/ in the presence of stationary phase *Serratia marcescens*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 205, p. 215-220, 2001.

KUCEY, R. M. N. Phosphate solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 63, p. 671-678, 1983.

KUCEY, R. M. N. Effect of *Penicillium bilaji* on the solubility and up-take of P and micronutrients from soil by wheat. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 68, p. 261-270, 1988.

LIU, G.; DUNLOP, J.; PHUNG, T.; LI, Y. Comparisons of two quick methods for evaluating phosphorus efficiency genotypes. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PHOSPHORUS DYNAMICS IN THE SOIL-PLANT CONTINUUM, 3., 2006, Uberlândia. **Proceedings...** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. p. 100-101.

LÓPEZ-HERNANDEZ, D.; BROSSARD, M.; FROSSARD, E. P-Isotopic exchangeable values in relation to Po mineralization in soils with very low P-sorbing capacities. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 1663-1670, 1998.

LOUGHMAN, B. C.; ROBERTS, S. C.; GOODWIN-BAILEY, C. I. Varietal differences in physiological and biochemical responses to changes in the ionic environment. **Plant and Soil**, The Hague, v. 72, p. 245-259, 1983.

NAHAS, E. Phosphate solubilizing microorganisms: effect of carbon, nitrogen and phosphorus sources. In: VALÁZQUEZ, E.; RODRÍGUEZ-BARRUECO, C. (Ed.). **Developments in plant and soil science**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 111-115. First international meeting on microbial phosphate solubilization.

NAHAS, E. **Ciclo do fósforo: transformações microbianas**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. 67 p.

NAHAS, E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 12, p. 567-572, 1996.

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

NAHAS, E.; CENTURION, J. F.; ASSIS, L. C. Efeito das características físicas e químicas dos solos sobre a população microbiana. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Campinas, v. 8, n. 1, 1994.

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

NISHANTH, D.; BISWAS, D. R. Kinetics of phosphorus and potassium release from rock phosphate and waste mica enriched compost and their effect on yield and nutrient uptake by wheat (*Triticum aestivum*). **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, p. 3342-3353, 2008.

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

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J.; NUNES, F. N. Fósforo. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG: SBCS, 2007.

OGBO, F. C. Conversion of cassava wastes for biofertilizer production using phosphate solubilizing fungi. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, p. 4120-4124, 2010.

OMAR, S. A. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. **Journal of Microbiology**, v. 14, p. 211-218, 1998.

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

PIKOVSKAYA, R. I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. **Microbiology**, Reading, v. 17, p. 362-370, 1948.

REYES, I.; BERNIER, L.; SIMARD, R.; TANGUAY, P. H.; ANTOUN, H. Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of a tropical *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 28, p. 291-295, 1999a.

REYES, I.; BERNIER, L.; SIMARD, R. R.; ANTOUN, H. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV induced mutants. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 8, p. 281-290, 1999b.

REYES, I.; VALERY, A.; VALDUZ, Z. Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. **Plant and Soil**, The Hague, v. 287, p. 69-75, 2006.

RICHARDSON, A. E.; GEORGE, T. S.; HENS, M.; SIMPSON, R. J. Utilization of soil organic phosphorus by higher plants. In: TURNER, B. L.; FROSSARD, E.; BALDWIN, D. S. (Ed.). **Organic phosphorus in the environment**. Wallingford: CABI Publishing, 2005. p. 165-184.

RICHARDSON, A. E.; BAREA, J.; McNEILL, A. M.; PRIGENT-COMBARET, C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, The Hague, v. 322, p. 17-24, 2009.

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

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

ROOS, W.; LUCKNER, M. Relationships between proton extrusion and fluxes of ammonium ions and organic acid in *Penicillium cyclospium*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 130, p. 1007-1014, 1984.

SIMPSON, P. G.; SALE, P. W. G.; TENNAKOON, S. B. An economic analysis of the field performance of North Carolina reactive phosphate rock compared with single superphosphate for selected sites from the national reactive phosphate rock project. **Australian Journal of Experiental Agriculture**, Melbourne, v. 37, p. 1061-1076, 1997.

SIQUEIRA, J. O.; ANDRADE, A. T.; FAQUIN, V. O papel dos microrganismos na disponibilização e aquisição de fósforo pelas plantas. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. (Ed.). **Fósforo na agricultura brasileira**. Piracicaba: Potafos, 2004.

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo**: fundamentos e perspectivas. Brasília: MEC, 1988. 236 p.

STAMFORD, N. P.; MOURA, A. M. M. F.; SANTOS, K. S.; SANTOS, P. R. Atuação de *Acidithiobacillus* na solubilização de fosfato natural em solo de tabuleiro cultivado com jacatupé (*Pachyrhizus erosus*). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 28, p. 75-83, 2004.

STAUFFER, M. D.; SULEWSKI, G. Fósforo essencial para a vida. In: SIMPÓSIO SOBRE FÓSFORO NA AGRICULTURA BRASILEIRA, 2003, São Pedro, SP. **Fósforo na agricultura brasileira**: anais. Piracicaba: Potafos, 2004. p. 1-11.

STEVENSON, F. J. **Cycles of soil carbon, nitrogen, phosphorus, sulphur micronutrients**. New York: Wiley, 1986.

SUBHA RAO, N. S. Phosphate solubilization by soil microorganisms. In: SUBHA RAO, N. S. (Ed.). **Advances in agricultural microbiology**. New Delhi: Oxford & IBH, 1982. p. 229-305.

TARAFDAR, J. C.; GHARU, A. Mobilization of organic and poorly soluble phosphates by *Chaetomium globosum*. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 32, p. 273-283, 2006.

TARAFDAR, J. C.; YADAV, R. S.; MEENA, S. C. Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 164, p. 279-282, 2001.

TINKER, P. B.; NYE, P. H. **Solute movement in the rhizosphere**. New York: Oxford University Press, 2000. 455 p.

VAN STRAATEN, P. **Rocks for crops: agro minerals of sub-Saharan Africa**. Nairobi: ICRAF, 2002. p. 338.

VANCE, C. P.; EHDE-STONE, C.; ALLAN, D. L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, Oxford, v. 157, p. 423- 447, 2003.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 61, p. 435-440, 2003.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; NIKOLAEVA, I. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. **Applied and Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 71, p. 137-144, 2006.

VAZQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, Y.; LOPEZ CORTES, A.; BASHAN Y. Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semi arid coastal lagoon, **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 30, p. 460-468, 2000.

WAKELIN, S.; ANSTIS, S.; WARREN, R.; RYDER, M. The role of pathogen suppression on the growth promotion of wheat by *Penicillium radicum*. **Australasian Plant Pathology**, v. 35, p. 253-258, 2006.

WAKELIN, S. A.; ROSEMARY, A. W.; HARVEY, P. R.; RYDER, M. A. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 40, p. 36-43, 2004.

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

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

WU, S. C.; CAO, Z. H.; LI, Z. G.; CHEUNG, K. C.; WONG, M. H. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and L solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. **Geoderma**, Amsterdam, v. 125, p. 155-166, 2005.

XIAO, C. Q.; CHI, R. A.; HUANGB, X. H.; ZHANG, W. X.; QIUA, G. Z.; WANGA, D. Z. Optimization for rock phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines. **Ecological Engineering**, Oxford, v. 33, p. 187-193, 2008.

Embrapa

Milho e Sorgo

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

