

SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO *IN VITRO* POR MICRORGANISMOS RIZOSFÉRICOS DE GUANDU

IN VITRO PHOSPHATE SOLUBILIZATION BY RHIZOSPHERIC MICROORGANISMS FROM PIGEONPEA

Edson Luiz SOUCHIE¹; Antonio Carlos de Souza ABBOUD²; Ana Lucy CAPRONI³

1. Professor, Doutor, Centro Federal de Educação Tecnológica, Rio Verde – GO. esouchie@yahoo.com.br; 2. Professor Adjunto, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia; 3. Engenheira Florestal, Embrapa - Gado de Corte, laboratório de Biologia do Solo

RESUMO: Diversos microrganismos do solo têm a capacidade de solubilizar diferentes formas de fosfatos inorgânicos, podendo contribuir para o aproveitamento de fontes menos solúveis. Seis meios de cultura sólidos foram testados para isolar microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF). O isolamento foi feito a partir do rizoplane mais rizosfera de guandu utilizando a metodologia das diluições sucessivas e Número Mais Provável. Os critérios de seleção usados foram: número de MSF presentes, tempo de aparecimento de colônias e facilidade de distinção do halo transparente. Os meios GL (glicose e extrato de levedura) e GELP (glicose, extrato de levedura, peptona, extrato de solo e sais de base) favoreceram ao crescimento mais rápido e um maior número de MSF. Uma vez obtidos, 12 isolados de fungos e 37 de bactérias foram testados quanto à capacidade de solubilização de fosfato de Araxá em meio líquido. Estes isolados foram incubados, sob agitação, em meio líquido contendo 200 mg de fosfato de Araxá L⁻¹, durante 7 dias a 28 °C. No início e final do período de incubação foram determinados pH e P solúvel em meio líquido. Houve isolados que, apesar de solubilizar fosfato em meio sólido, não mantiveram esta capacidade em meio líquido. Para os que mantiveram a capacidade solubilizadora de fosfato em meio líquido, houve uma relação inversa entre pH do meio e teor de P solúvel. Os resultados sugerem que a metodologia de isolamento baseada na formação de halo em placa deve ser aliada à quantificação da solubilização de fosfato em meio líquido.

PALAVRAS-CHAVE: Solubilização de P. Fosfato natural. *Cajanus cajan*.

INTRODUÇÃO

Em solos com pH próximos à neutralidade ou ligeiramente alcalinos como alguns do semi-árido brasileiro, uma grande parte do P pode estar ligado ao cálcio formando compostos susceptíveis à solubilização por uma série de microrganismos rizosféricos que produzem acidez. De acordo com Rheinheimer; Anghinoni (2001), o P contido no material de origem do solo encontra-se totalmente na forma mineral, com predomínio dos fosfatos de Ca. Em solos ácidos, outros tipos de exsudatos como, por exemplo, os encontrados em raízes de guandu, podem solubilizar compostos de P, que nestas condições costumam estar ligados ao Fe ou Al (SUBBARAO et al. 1997). Essa característica é importante em sistemas de produção onde fosfatos de rocha ou outras fontes pouco solúveis são utilizados como fertilizantes.

O guandu é uma leguminosa semi-perene de múltiplos fins, podendo ser utilizada em sistemas de produção vegetal e animal. É uma boa fixadora de N₂ atmosférico e, conforme Otani et al. (1996) e Subbarao et al. (1997), é uma das poucas espécies que pode utilizar formas fixas de P no solo, particularmente Fe-P, sendo este potencial variável entre genótipos. Abboud (1986)

demonstrou a existência de populações de bactérias e fungos solubilizadores de fosfato na ordem de 10⁶ organismos g⁻¹ de solo da rizosfera de diversas leguminosas, incluindo guandu. Para esta espécie houve a maior ocorrência de fungos em relação a cinco outras testadas. Da mesma forma, Carneiro et al. (2004) detectaram aumento das populações de bactérias e fungos solubilizadores em solo de Cerrado cultivado com guandu. A capacidade dos MSF associados a essa leguminosa em melhorar a sua nutrição fosfatada e de outras culturas precisa ser investigada.

Atualmente, um crescente interesse tem surgido em relação à importância da diversidade microbiana edáfica já que os microrganismos desempenham papel fundamental na manutenção da qualidade do solo (GARBEVA et al. 2004). Dentre os microrganismos do solo, os solubilizadores de fosfatos inorgânicos desempenham importante papel no suprimento de P para as plantas (SILVA FILHO; VIDOR, 2001), apresentando potencial de uso na forma de inoculante (SILVA FILHO et al. 2002; SOUCHIE et al. 2005). Diversos autores (OMAR, 1998; KIM et al., 1997) relatam que a solubilização de fosfatos é correlacionada com a habilidade de produção de ácidos orgânicos e/ou polissacarídeos

extracelulares pelos microrganismos. Por exemplo, Reyes et al. (1999) encontraram correlação positiva entre a solubilização mineral de fosfato por *Penicillium rugulosum* e a produção de ácido glucônico ou cítrico.

Diversos microrganismos rizosféricos podem solubilizar P em meio de cultura pura (WHITELAW et al. 1999; WAKELIN et al. 2004; SOUCHIE et al. 2006) incluindo estirpes do gênero rizóbio (HARA; OLIVEIRA, 2005). Quando um microrganismo dissolve o fósforo em meio de cultura sólido contendo fosfato de cálcio há formação de uma zona de clarificação ao redor da colônia, correspondente à acidificação do meio e dissolução do fósforo (KANG et al. 2002). A composição de cada meio de cultura pode influenciar no número de isolados de MSF obtidos. Portanto, torna-se interessante testar diferentes meios de cultura, tidos como específicos para isolar MSF, visando maximizar seu isolamento. Assim, este estudo objetivou selecionar meios de cultura sólidos, dentre alguns encontrados na literatura, para melhor isolar MSF da rizosfera de guandu e testar metodologia para quantificação *in vitro* da solubilização de fosfato de Araxá por esses organismos.

MATERIAL E MÉTODOS

Avaliação de meios de cultura sólidos para isolamento de MSF

Este ensaio foi realizado sob condições de laboratório. Como planta isca, foi cultivado um genótipo de guandu coletado na região de Seropédica - RJ, denominado "Eldorado 1". As plantas foram cultivadas em um substrato composto de areia esterilizada e solo (1:6, baseado em peso), utilizando-se 10 copos plásticos de 400 mL com três plantas cada. Foi utilizada a camada superficial (0-10 cm) de um Latossolo Vermelho-Amarelo da região de Brasília - DF, cuja análise apresentou pH = 4,4; Al = 0,5; Ca = 1,0; Mg = 0,5 (Al, Ca e Mg em $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$); P = 5,0 e K = 30 (P e K em mg dm^{-3}).

Aos 30 dias após a germinação, iniciou-se a avaliação de meios sólidos através do isolamento de bactérias e fungos solubilizadores de fosfato nesses meios. Os meios testados foram: GYA (glicose, extrato de levedura, MgSO_4 e CaCl_2), descrito por Sperber (1958); K&B (extrato de solo e glicose) descrito por Katznelson; Bose (1959); GL (glicose e extrato de levedura); GELP (glicose, extrato de levedura, peptona, extrato de solo e sais de base); GES (glicose, extrato de solo, sais de base e solução de micronutrientes) e GAGES (glicose,

arabinose, extrato de solo, glicerol e sais de base), descritos por Sylvester-Bradley et al. (1982). Amostras de 1g de solo procedentes do rizoplane mais rizosfera, juntamente com pedaços de radículas, foram misturadas a 9 mL de solução salina (1%) e diluídas sucessivamente até 10^{-7} . De cada diluição foram transferidas alíquotas de 100 μL para placas de Petri esterilizadas, acrescentando-se logo em seguida os meios mantidos à temperatura de 45 °C e misturados imediatamente, conforme Sylvester-Bradley et al. (1982). Como testemunha, foi feito plaqueamento com alíquotas de 100 μL de solução salina esterilizada. Usaram-se triplicatas para cada diluição. Após a incubação das placas por sete dias a 28 °C, os meios foram avaliados quanto ao número de MSF presentes, tempo de aparecimento das colônias nas placas e facilidade na distinção do halo transparente.

O número de bactérias e fungos solubilizadores e não solubilizadores que cresceram nas placas foi determinado pelo método do Número Mais Provável (Tabela de McCrady). A identificação dos MSF se deu por meio da visualização de um halo transparente formado ao redor das colônias, conforme Kang et al. (2002). Este halo indica a solubilização de CaHPO_4 contido em cada meio. Os organismos que formaram halo transparente foram repicados em placa de Petri contendo o mesmo meio em que foram originalmente obtidos. Posteriormente, foram armazenados em tubo de ensaio contendo aquele meio sólido e óleo mineral, a temperatura ambiente.

Os dados foram transformados ($\log n$), submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Quantificação *in vitro* da solubilização biológica de fosfato de Araxá em meio líquido

Quarenta e nove isolados (12 fungos e 37 bactérias) obtidos na fase anterior, foram inoculados em frascos contendo 50 mL de meio líquido (Sylvester-Bradley et al., 1982) acrescidos de fosfato de Araxá (14 g kg^{-1} de P) na concentração de 200 mg L^{-1} , ao invés de 200 mg de fosfato de Catalão que foi usado por aqueles autores. Os frascos foram incubados por sete dias a 28 °C. Como testemunha, incubou-se meio líquido na ausência de microrganismo solubilizador. O ensaio foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por microrganismo. Foram determinados valores iniciais de pH e P solúvel do meio. No final do período de incubação, procedeu-se à centrifugação

(3.000 rpm por 15 min), determinação do pH e quantificação dos teores de P solúvel no sobrenadante (TEDESCO et al., 1995). Os teores de P solúvel e os valores de pH foram submetidos a uma análise de correlação linear.

RESULTADOS

Avaliação de meios de cultura sólidos para isolamento de MSF

Dos seis meios de cultura sólidos testados para isolamento, GL e GELP possibilitaram o isolamento de um maior número de bactérias solubilizadoras (Tabela 1). Além disso, o número de bactérias foi sempre superior ao de fungos. Os

MSF formaram em torno de si um halo facilmente visível por contraste com o meio opaco, conforme Kang et al. (2002). Dentre os meios testados, GELP possibilitou a melhor visualização do halo formado, devido à solubilização do CaHPO_4 . Esse meio também apresentou colônias de bactérias solubilizadoras após 24 h de incubação enquanto que o aparecimento de colônias nos demais meios iniciou-se por volta de 48 h. Os meios GL, GAGES e K&B foram os que se destacaram quanto ao número de colônias de fungos solubilizadores enquanto que GES, GELP e GYA isolaram menor número destes não diferindo entre si (Tabela 1). Foram obtidos 12 isolados de fungos e 37 de bactérias solubilizadoras de fosfato.

Tabela 1. UFC de microrganismos solubilizadores e não solubilizadores em diferentes meios de cultura sólidos (médias de três repetições)

Meios de cultura	Bactérias		Fungos	
	Não Solubilizadoras	Solubilizadoras	Não Solubilizadores	Solubilizadores
	----- x 10 ⁶ UFC -----			
GES	3,2 c	0,2 c	0,1 c	0,004 b
GELP	18,2 b	2,7 b	0,5I c	0,0007 b
GYA	2,2 c	0,7 c	1,8 b	0,003 b
GL	140,0 a	140,0 a	3,0 a	0,07 a
GAGES	6,2 bc	0,8 c	1,1 b	0,13 a
K&B	2,5 c	0,5 c	0,3 c	0,13 a

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey (5%)

Quantificação *in vitro* da solubilização biológica de fosfato de Araxá em meio líquido

Todos os isolados obtidos na etapa anterior forma testados quanto ao potencial de solubilização de fosfato de Araxá em líquido. De forma geral, a maioria dos fungos acidificou mais o meio de cultura reduzindo o pH inicial de 6,7 a valores abaixo de 2,0, ao final do período de incubação. No caso das bactérias, houve alguns isolados em que o pH do meio ao final da incubação foi próximo ao pH inicial. Houve ainda alguns onde o pH final foi reduzido a valores de até 3,7 e outros isolados onde o pH foi reduzido a valores de até 2,5 (Figura 1). Houve correlação negativa (bactérias, $r = -0,79^{**}$ e

fungos $r = -0,85^{**}$) entre pH final e o teor de P solúvel no meio.

O teor inicial de P solúvel no meio foi 5,5 mg L⁻¹. No caso de 11 entre os 12 isolados fúngicos, os teores de P solúvel ao final do período de incubação, variaram de 13 a 24 mg L⁻¹. No caso de nove entre 37 isolados bacterianos, os teores de P solúvel estiveram na faixa de 8,0 a 22 mg L⁻¹. O meio líquido incubado com a maioria dos isolados de bactéria apresentou teores equivalentes ou inferiores ao teor inicial, indicando que esses isolados, embora tenham formado halo de solubilização em meio sólido aparentemente não mantiveram a capacidade solubilizadora quando

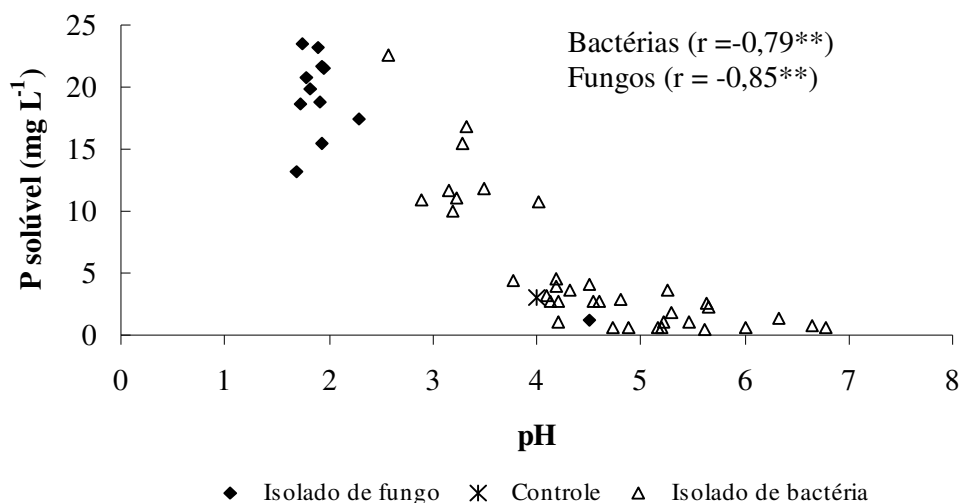


Figura 1. Relação entre pH final do meio de cultura líquido e teor de P solúvel após sete dias de incubação com bactérias e fungos solubilizadores de fosfato

testados em meio líquido. Houve um isolado bacteriano que acidificou mais o meio do que os demais (pH = 2,5) tendo também possibilitado teores de P solúvel de 22,5 mg L⁻¹, valor bem superior ao da maioria dos isolados de bactéria, equiparando-se aos valores máximos atingidos pelos fungos. A maioria dos isolados bacterianos apresentou crescimento rápido, ou seja, com três dias de incubação já era observada turbidez do meio líquido, indicando o crescimento das células. Os isolados fúngicos demonstraram crescimento mais lento que as bactérias.

DISCUSSÃO

Uma melhor performance dos meios GL e GELP também foi notada por Souchie et al. (2006) isolando bactérias e fungos solubilizadores de fosfato de área de pastagem e floresta secundária de Mata Atlântica. Esses autores sugerem que a presença de extrato de levedura na composição desses meios poderia ser um diferencial em relação aos demais meios, favorecendo o isolamento de MSF.

Sylvester-Bradley et al. (1982), testando os meios GL, GES, GELP e GAGES para isolamento de MSF da rizosfera de *Brachiaria humidicola* na região amazônica brasileira, observaram que GES possibilitou o isolamento de um maior número de bactérias solubilizadoras. Neste trabalho, GL foi o que se sobressaiu (Tabela 1). Apesar disso, os

resultados deste trabalho confirmam os de Sylvester-Bradley et al. (1982) quanto ao predomínio de bactérias em relação a fungos solubilizadores em todos os meios testados. Estes últimos autores sugerem que é possível que as bactérias crescendo no meio produzam substâncias que inibam o crescimento dos fungos. Por outro lado, Souchie (2000) isolando MSF com os meios GL e GELP a partir do rizoplane mais rizosfera de seis genótipos de guandu cultivados em seis classes de solo procedentes do nordeste brasileiro, constataram um maior número de fungos solubilizadores ao invés de bactérias. Possivelmente, a diversidade florística (SOUCHIE et al. 2006), tipo e manejo de solo (NAHAS et al. 1994) sejam fatores determinantes que influenciam a população de solubilizadores de fosfato. Souchie et al. (2006), utilizando o meio GELP, detectaram maior número de bactérias e fungos solubilizadores numa área de floresta secundária que apresentava maior diversidade florística, principalmente espécies leguminosas, que em área de pastagem com predomínio de gramíneas. Nahas (1999) sugere que espécies leguminosas aumentam a população de MSF devido ao enriquecimento do solo com nitrogênio. Dessa forma, apesar de terem sido usados os mesmos meios, os solubilizadores foram isolados a partir de locais com condições edafoclimáticas e florística distintas. Em solos da região semi-árida brasileira, a cobertura vegetal do solo é menor que na região do Cerrado e Mata

Atlântica, podendo os fungos solubilizadores ter seu estabelecimento favorecido em relação às bactérias, já que são eucariotos, formam esporos e, desta forma, resistem mais às condições de baixa umidade e altas temperaturas do solo. Na região do Cerrado e Mata Atlântica, a cobertura vegetal é mais abundante e diversificada, geralmente havendo maiores teores de umidade e menores temperaturas do solo. Estas condições possivelmente favorecem o estabelecimento das bactérias solubilizadoras, já que possuem menor versatilidade que os fungos para suportar condições adversas.

O fato de alguns isolados bacterianos não apresentarem habilidade de solubilização de fosfato de Araxá em meio líquido possivelmente se deva à diferença entre as fontes fosfatadas utilizadas. Nos meios sólidos, induziu-se à precipitação de CaHPO_4 pela adição de CaCl_2 e K_2HPO_4 enquanto que no meio líquido utilizou-se fosfato de Araxá. Possivelmente, os íons fosfato estão complexados em uma forma mais cristalina no fosfato de Araxá o que torna sua solubilização mais difícil que a de CaHPO_4 formado artificialmente. Outra possibilidade seria o surgimento de substâncias tóxicas ou alterações ocorridas no meio pelos produtos do metabolismo dos MSF (SILVA FILHO, 1998; SOUCHIE, 2000). A presença de cátions, como o cálcio, no meio pode interferir no processo de solubilização. Fosfato de Araxá é um tipo de rocha fosfatada rica neste elemento, consequentemente, concentrações acima de uma dose ótima, desfavoreceriam o mecanismo de solubilização. Além disso, determinados níveis de metais pesados, como Cd, Ni, Pb, Zn, Cu e outros, contidos no fosfato de Araxá (Amaral Sobrinho et al. 1992), podem atuar como inibidores do processo de solubilização. Karamushka et al. (1996) relatam que a liberação de concentrações tóxicas de alguns metais durante a solubilização de fosfato de rocha pode afetar o crescimento, fisiologia e metabolismo dos fungos solubilizadores. Por fim, os isolados bacterianos podem simplesmente ter perdido a capacidade de solubilização de P devido ao período de armazenamento.

Há trabalhos que comparam o potencial de solubilização *in vitro* entre MSF. Silva Filho (1998) comparando resultados de potencial de solubilização de fosfato entre diversos gêneros de MSF verificou que os isolados de *Penicillium* sp. apresentaram potencial superior ou igual aos de *Pseudomonas*, que por sua vez, foram superiores aos de *Bacillus* sp. e estes aos de *Aspergillus* sp. Da mesma forma, Nahas (1994) demonstraram uma maior capacidade de solubilização de P *in vitro* por diversos fungos de solo e de rizosfera comparado às bactérias. Silva Filho (1998) sugere que a solubilização de fosfato ocorre pela acidificação do meio e que ela está relacionada ao crescimento do organismo. Isto está de acordo com a proposta de que a solubilização de fosfatos ocorre, basicamente, pela produção de ácidos orgânicos e liberação de prótons (SPERBER, 1958; SILVA FILHO; VIDOR, 2000; WHITELAW, 2000).

Futuros estudos são interessantes visando testar a capacidade solubilizadora de distintas fontes fosfatadas por estes organismos, sob condições *in vitro* e em sistemas solo-planta.

CONCLUSÕES

Os meios GL e GELP são os mais indicados para isolar microrganismos solubilizadores já que possibilitam o crescimento mais rápido destes e detectam o maior número destes organismos associados a guandu.

A indicação de solubilização biológica de fosfato, avaliada visualmente pela formação de halo transparente em meio de cultura sólido, não necessariamente implica na capacidade de solubilizar P de fosfato de Araxá em meio líquido.

A combinação das metodologias de isolamento de solubilizadores em meio sólido e quantificação da solubilização em meio líquido é mais eficaz que a utilização isolada de uma delas.

AGRADECIMENTOS

Ao PRODETAB, pelo financiamento deste projeto e à Virgínia Tenório de Carvalho pelo auxílio em laboratório.

ABSTRACT: Several soil microorganisms can solubilize different inorganic P forms, contributing to the use of low reactive P sources. Six solid growth media were tested to isolate P-solubilizing microorganisms. Isolation was performed from rhizoplane plus rhizosphere of pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp.), using the method of successive dilutions and Most Probable Number. The criteria for choosing the most suitable solid media to isolate pigeonpea solubilizers were: number of colonies, time to colony appearing and distinction of the transparent halo. Growth media GL (glucose, yeast extract and agar) and GELP (glucose, yeast extract, peptone and agar) induced a faster colony development and a higher number of P-solubilizing microorganisms. Twelve fungi isolates and 37 bacteria were tested in relation to

their ability to solubilize “Araxá” phosphate in liquid medium. The isolates were cultivated for 7 days at 28 °C in liquid medium on a rotary shaker. 200 mg of “Araxá” phosphate L⁻¹ was added to the liquid medium. pH and soluble P were determined at initial and final of the incubation time. Some isolates solubilized phosphate in solid medium but not in liquid medium. For the isolates that maintained the solubilization ability in liquid medium, an inverse relationship between pH and soluble P was verified. The results suggest that the isolation method, based on the halo formation in Petri dishes should be combined with quantification of soluble phosphate in liquid media.

KEYWORDS: Phosphate solubilization. Rock phosphate. *Cajanus cajan*.

REFERÊNCIAS

- ABBOUD, A. C. S. **Eficiência da adubação verde associada a fosfato natural de Patos de Minas**. 1986. 298f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1986.
- AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; COSTA, L. M.; OLIVEIRA, C. VELOSO, A. C. X. Metais pesados em alguns fertilizantes e corretivos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa, v. 16, n. 2, p. 27-276, nov. 1992.
- CARNEIRO, R. G.; MENDES, I. C.; LOVATO, P. E.; CARVALHO, A. M.; VIVALDI, L. J. Indicadores biológicos associados ao ciclo do fósforo em solos de Cerrado sob plantio direto e plantio convencional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 661-669, Jul. 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br>> Acesso em: 16 nov. 2005.
- GARBEVA, P.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Microbial diversity in soil: Selection microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 243-270, set. 2004.
- HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 07, p. 667-672, Jul. 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br>> Acesso em: 12 jan. 2006.
- KANG, S. C.; HA, C. G.; LEE, T. G.; MAHESHWARI, D. K. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a soil-inhabiting fungus *Fomitopsis* sp. PS 102. **Current Science**. Bangalore, v. 82, n. 4, p. 439-442, fev. 2002.
- KARAMUSHKA, V. I.; SAYER, J. A.; GADD, G. M. Inhibition of H⁺ efflux from *Sacharomyces cerevisiae* by insoluble metal phosphates and protection by calcium and magnesium: inhibitory effects a result of soluble metal cations? **Mycological Research**, New York, v. 100, n. 6, p. 707-413, jun. 1996.
- KATZNELSON, H.; BOSE, B. Metabolic activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat root, rhizosphere and non-rhizosphere soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 5, n. 1, p.79-85, nov. 1959.
- 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**. New York, v. 26, n. 2, p. 79-87, dez. 1997.
- NAHAS, E. M.; CENTURION, J. F.; ASSIS, L. C. Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 43-48, 1994.
- 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 (Eds). Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS, p. 467-486, 1999.

OMAR S. A. 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**, Dordrecht, v. 14, n. 2, p. 211-218, nov. 1998.

OTANI, T.; AE, N.; TANAKA, H. Phosphorus (P) uptake mechanisms of crop grown in soils with low P status. 2. Significance of organic acids in root exudates of pigeonpea. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokio, v. 42, n. 3, p. 553-560, out. 1996.

RHEINHEIMER, D. S.; ANGHINONI, I. Distribuição do fósforo inorgânico em sistemas de manejo de solo, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 151-160, jan. 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br>> Acesso em: 20 fev. 2006

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

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 24, n. 2, p. 311-329, mar/abr. 2000.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 36, n. 12, p. 1495-1508, Dez. 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br>> Acesso em: 15 jan. 2006.

SILVA FILHO, G. N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 6, p. 847-854, Jun. 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br>> Acesso em: 12 jan. 2006.

SPERBER, J. L. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. **Australian Journal of Agriculture Research**. Collingwood, v. 9, p. 778-781, abr. 1958.

SOUCHIE, E. L. **Isolamento e caracterização de microrganismos solubilizadores de fosfato isolados da rizosfera de guandu (*Cajanus cajan* L. Millsp.), visando ao aproveitamento de fosfatos naturais**. 2000, 109f. Dissertação. (Mestrado em Fitotecnia) – Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, 2000.

SOUCHIE, E. L.; CAMPELLO, E. F. C.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. **Floresta**, Curitiba, v. 35, n. 2, p. 329-334, Mai/Ago.2005. Disponível em: <<http://calvados.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/floresta/article/viewFile/4620/3567>> Acesso em: 16 nov. 2005

SOUCHIE, E. L.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R.; CAMPELLO, E. F. C.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M. Communities of P-solubilizing bacteria, fungi and arbuscular mycorrhizal fungi in grass pasture and secondary forest of Paraty, RJ-Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 1, p. 183-193, Mar. 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br>> Acesso em: 15 jan. 2006.

SUBBARAO, G. V.; AE, N.; OTANI, T. Genotypic variation in iron, and aluminum-phosphate solubilizing activity of pigeonpea root exudates under P deficient conditions. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 43, n. 2, p.295-305, nov. 1997.

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

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análises de solo**,

plantas e outros materiais. Porto Alegre: UFRGS, 1995, 174p.

WAKELIN, S. A.; WARREN, R. A.; HARVEY, P. R.; RIDER, M. H. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 40, n. 1, p. 36-43, out. 2004.

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, n. 5, p. 655- 665, mai. 1999.

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