



**CRÍSIA SANTOS DE ABREU**

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS  
ISOLADAS DE PLANTAS DE MILHO COM POTENCIAL PARA A  
BIOSSOLUBLIZAÇÃO DE ROCHAS FOSFÁTICAS**

**SETE LAGOAS-MG**

**2014**

**CRÍSIA SANTOS DE ABREU**

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS  
ISOLADAS DE PLANTAS DE MILHO COM POTENCIAL PARA A  
BIOSSOLUBLIZAÇÃO DE ROCHAS FOSFÁTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal de São João Del Rei, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

**Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Ivanildo Evódio Marriel**

**Coorientadora: Dra. Christiane Abreu de Oliveira Paiva**

**SETE LAGOAS-MG**

**2014**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

**Divisão de Biblioteca da UFSJ, MG, Brasil.**

---

A162s  
2014      Abreu, Crísia Santos de, 1984 -

Seleção e caracterização de bactérias endofíticas isoladas de plantas de milho com potencial para a biossolubilização de rochas fosfáticas/ Crísia Santos de Abreu.-- 2014.

47 f. : il.

Orientador: Ivanildo Evódio Marriel  
Co-orientadora: Christiane Abreu de Oliveira Paiva  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de São João Del-Rei,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias.  
Inclui bibliografia.

1. Milho - Cultivo - Teses. 2. Milho – Microrganismos endofíticos - Teses. 3. Milho – Rochas fosfáticas - Teses. I. Marriel, Ivanildo Evódio. II. Paiva, Christiane Abreu de Oliveira. III. Universidade Federal de São João Del-Rei. Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias. IV. Título.

**CRÍSIA SANTOS DE ABREU**

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS  
ISOLADAS DE PLANTAS DE MILHO COM POTENCIAL PARA A  
BIOSSOLUBLIZAÇÃO DE ROCHAS FOSFÁTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal de São João Del Rei, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

**Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Ivanildo Evódio Marriel**

**Coorientadora: Dra. Christiane Abreu de Oliveira Paiva**

Sete Lagoas, 27 de fevereiro de 2014.

Banca examinadora:

Dr. Francisco Adriano de Souza – Embrapa Milho e Sorgo

Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosângela Cristina Marucci - UNIFEMM

---

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Ivanildo Evódio Marriel

*“Eu não poderia viver sem Ti  
Eu jamais teria razão em minha vida  
Sem Te encontrar  
E conhecer Teu grande amor  
Senhor, minha vida pertence a Ti  
Pois é a Tua mão que me dá forças pra caminhar  
Vivendo os Teus sonhos  
Andando em direção ao Teu coração, Jesus  
Se não fosse o Senhor, nada disso seria possível  
Deus!”*

CTMDT

Deus, meu Senhor e pastor.

Meu fiel e melhor amigo, Jesus. Meu refúgio  
e minha fortaleza.

Ao meu noivo Joel pelo amor e dedicação.

A minha família.

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me sustentado em todos os momentos da minha vida. Por mostrar a cada instante que aquele que confia em Ti é mais que vencedor.

Ao meu noivo Joel pelo amor, compreensão e pela cumplicidade. Obrigada por sonhar comigo e sempre estar ao meu lado.

A minha família pelo apoio incondicional.

Ao pequeno grande Arthur por mostrar que a riqueza da vida está na simplicidade e no amor ao próximo.

Ao meu orientador Prof<sup>o</sup>. Dr. Ivanildo Evódio Marriel pela orientação.

A minha coorientadora Dr. Christiane Abreu de Oliveira Paiva pela coorientação.

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo e do Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo pelos momentos agradáveis e auxílio na condução dos experimentos.

A Beatriz Barros e ao Uiraci Lana pelo auxílio nas análises de sequenciamento.

Ao Dr. Antônio Carlos Oliveira pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos amigos de curso Alexandre, Deniete, Denize, Tamara e Tinoco pela convivência, companheirismo e momentos alegres.

A UFSJ pela oportunidade para a realização do mestrado e pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do mestrado pelos ensinamentos.

A Embrapa Milho e Sorgo pela disponibilização de recursos para a realização deste trabalho.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Vera Lúcia dos Santos pela disponibilização de recursos para as análises cromatográficas.

A Flávia Abrão Pessoa e ao Daniel Bonoto Gonçalves pela disponibilidade, paciência e auxílio nas análises cromatográficas.

As funcionárias da biblioteca da Embrapa Milho e Sorgo.

A banca examinadora pela participação.

A todos que de alguma forma participaram dessa importante conquista.

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1 Importância do milho no agronegócio brasileiro .....	3
2.2 Dinâmica de fósforo em solos de Cerrado.....	4
2.3 Microrganismos solubilizadores de fósforo (MSP) .....	5
2.4 Mecanismos de solubilização de fosfato .....	6
2.5 Potencial biotecnológico de microrganismos endofíticos .....	9
2.6 Identificação molecular dos microrganismos endofíticos solubilizadores de fósforo	11
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	12
3.1.1 Coleta das amostras vegetais.....	12
3.1.2 Desinfestação das amostras vegetais .....	12
3.1.3 Isolamento de bactérias endofíticas.....	12
3.2 Eficiência de solubilização de fósforo por microrganismos endofíticos em meio de cultura sólido .....	13
3.3 Eficiência de solubilização de fósforo por microrganismos endofíticos em meio de cultura líquido .....	14
3.4 Eficiência de solubilização de fósforo por microrganismos endofíticos em meio de cultura líquido enriquecido com rochas fosfáticas .....	15
3.5 Quantificação de ácidos orgânicos .....	15
3.6 Identificação molecular dos microrganismos endofíticos solubilizadores de fósforo	16
3.6.1 Extração do DNA genômico de bactérias .....	16
3.6.2 Quantificação do DNA genômico .....	17
3.6.3 Amplificação de sequências do rDNA 16S de bactérias .....	17
3.6.4 Purificação dos produtos de PCR em gel de agarose e sequenciamento de DNA ...	17

3.7 Análise estatística .....	18
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>19</b>
4.1 Eficiência de solubilização de fósforo por microrganismos endofíticos em meio de cultura sólido .....	19
4.2 Eficiência de solubilização de fósforo por microrganismos endofíticos em meio de cultura líquido .....	21
4.3 Eficiência de solubilização de fósforo por microrganismos endofíticos em meio de cultura líquido enriquecido com rochas fosfáticas .....	27
4.4 Quantificação de ácidos orgânicos .....	28
4.5 Produção de ácidos orgânicos x eficiência de solubilização .....	34
4.6 Caracterização molecular dos microrganismos endofíticos solubilizadores de fósforo .....	36
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>40</b>

## RESUMO

### SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE PLANTAS DE MILHO COM POTENCIAL PARA A BIOSOLUBLIZAÇÃO DE ROCHAS FOSFÁTICAS

**RESUMO** - O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas de maior importância para o agronegócio brasileiro em face do advento do milho safrinha associado a novas técnicas agrícolas e à utilização e incorporação de terras não cultivadas principalmente em regiões de Cerrad e da demanda da agroindústria de rações de aves, suínos e bovinos. Com isso, o aumento de produção nesta cultura gera maior demanda por insumos e torna o agronegócio brasileiro altamente dependente do mercado externo no que se refere, principalmente, à utilização de adubação fosfatada, visto que cerca de 50% deste adubo no Brasil é proveniente de importação. Microrganismos solubilizadores de fósforo (MSP) estão sendo utilizados como alternativa para otimizar a eficiência na utilização de fósforo (P), principalmente por meio da biossolubilização de rochas fosfáticas e produção de ácidos orgânicos. Neste contexto, o presente trabalho objetivou selecionar e caracterizar microrganismos endofíticos de milho solubilizadores de fosfato *in vitro* com potencial para biossolubilização de rochas fosfáticas. Os experimentos foram conduzidos utilizando-se delineamento inteiramente casualizado, com 3 ou 4 repetições. Nos ensaios de solubilização por rochas fosfáticas foi utilizado esquema fatorial 3x12, sendo 3 fontes de rochas e 12 estirpes de microrganismos solubilizadores de P. O material vegetal foi coletado em experimento de campo contendo milho no estágio de floração da safra 2013. Após o isolamento obteve-se morfotipos de bactérias endofíticas da seiva, folha e raiz de milho. Os ensaios de solubilização de P foram realizados em meio NBRIP sólido e líquido, contendo fosfato tricálcio e nos ensaios com solubilização de rocha as fontes de P foram hidroxiapatita, fosfato de Araxá e fosfato de Itafós. A produção de ácidos orgânicos foi mensurada por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Todas as estirpes apresentaram eficiência relativa de solubilização em meio líquido com fosfato tricálcio superior ao controle (sem microrganismos). Os maiores valores de solubilização de P ocorreram com a fonte de rocha fosfática, hidroxiapatita. Com relação à produção de ácidos orgânicos pelos endofíticos solubilizadores de P, houve predomínio de ácido glucônico dentre os ácidos orgânicos detectados (glucônico>lático>butírico>succínico>oxálico>2-cetoglucônico>cítrico>propiónico>acético). De acordo com a identificação molecular dos microrganismos endofíticos solubilizadores de P avaliados neste estudo, ocorreu predominância dos gêneros *Bacillus* (57,14%) e *Pantoea* (33,33%), sendo este primeiro, o gênero que apresentou maior potencial para solubilização de P nas três fontes de rocha avaliadas e de fosfato tricálcio.

**Palavras-chave:** solubilização de fósforo, microrganismos endofíticos, fosfato de rocha, *Zea mays*.

Comitê Orientador: Prof<sup>o</sup>.Dr. Ivanildo Evódio Marriel – UFSJ e Embrapa Milho e Sorgo (Orientador); Dra. Christiane Abreu de Oliveira Paiva – Embrapa Milho e Sorgo (Coorientadora)

## ABSTRACT

### SELECTION AND CHARACTERIZATION OF ENDOPHYTIC BACTERIA ISOLATED PLANT MAIZE WITH POTENTIAL FOR ROCK BIOSOLUBILIZATION PHOSPHATE

**ABSTRACT-** Maize (*Zea mays* L.) is a crop of major importance for Brazilian agribusiness in view of the advent of winter maize associated with new agricultural techniques and the use and incorporation of uncultivated land, especially in the Biome Cerrado regions and demand of agribusiness for poultry, pig and cattle feed. Thus, the increase in production of this crop creates greater demand for inputs and makes Brazilian agribusiness highly dependent export market with regard mainly to the use of phosphate fertilizers, as approximately 50% of this fertilizer in Brazil is imported. Phosphorus solubilizing microorganisms (PSM) are being used as an alternative to optimize the efficient use of phosphorus (P), mainly through biosolubilization of phosphate rock and the production of organic acids. In this context, this work aimed to select and characterize *in vitro* phosphate solubilizing maize endophytic microorganisms with potential for biosolubilization of phosphate rock. The experiments were conducted using a completely randomized design with 3 or 4 replications. In phosphate rock solubilization trials a 3x12 factorial was used, 3 sources of rocks and 12 strains of P solubilizing microorganisms. The plant material was collected in an experimental field containing flowering maize of the 2013 harvest. After isolation, endophytic bacteria morphotypes were obtained from the maize sap, leaf and root. Assays of P solubilization were performed in solid and liquid NBRIP medium containing tricalcium phosphate and in the rock solubilization assays the P sources were hydroxyapatite, Araxá phosphate and Itafós phosphate. The production of organic acids was measured by HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). All strains showed relative solubilization efficiency in liquid medium with tricalcium phosphate higher than the control (without microorganisms). The highest P solubilization values occurred with the phosphate rock source, hydroxyapatite. With regard to organic acid production by P solubilizing endophytes, gluconic acid predominated among the detected organic acids (gluconic > lactic > butyric acid > succinic acid > oxalic > 2-ketogluconic > citric > propionic > acetic acid). According to the molecular identification of the P solubilizing endophytic microorganisms in this study, there was a predominance of the genera *Bacillus* (57.14%) and *Pantoea* (33.33%), the former being the genre that showed the greatest potential for P solubilization in the three rock sources evaluated and the tricalcium phosphate.

**Keywords :** solubilization of phosphorus , endophytic microorganisms , rock phosphate , *Zea mays*.

Guidance Committee: Prof<sup>o</sup>. Dr. Ivanildo Evódio Marriel – UFSJ / Embrapa Milho e Sorgo (Orientador); Dra. Christiane Abreu de Oliveira Paiva – Embrapa Milho e Sorgo (Coorientadora)

## 1 INTRODUÇÃO

A incorporação de novas tecnologias somada ao advento do milho safrinha, principalmente em regiões de Cerrado, destaca o agronegócio brasileiro no cenário da economia nacional. Neste contexto, a cultura do milho se destaca considerando que a agroindústria de rações de aves, suínos e bovinos é composta basicamente por farelo de soja e de milho, tornando o milho uma *commodity* estratégica para expansão do agronegócio brasileiro.

A cultura do milho exige alta demanda por nutrientes e dentre os macronutrientes essenciais às plantas, o fósforo (P) constitui um dos fatores limitantes da produção agrícola devida sua importância no metabolismo vegetal, atuação nas funções fisiológicas básicas das células e em vários processos biológicos, como fotossíntese e respiração celular.

A fertilidade do solo de regiões tropicais, como a região de Cerrado, fica substancialmente limitada pela baixa disponibilidade natural de P, uma vez que a deficiência de P no solo potencialmente ocasiona alterações no metabolismo das plantas, a exemplo, prejudicando o estoque de energia e a produção de carboidratos o que substancialmente ocasiona queda da produtividade e até mesmo a inviabilidade da safra. Como forma de correção dessa deficiência e para viabilizar a exploração agrícola do Cerrado, agricultores adotam práticas de adubação fosfatada em quantidades elevadas para manutenção e/ou melhoria da capacidade produtiva dos solos devido à perda de parte do P que é fornecido via adubação pelo fenômeno de fixação em reações com componentes do solo.

Microrganismos solubilizadores de fósforo (MSP) estão sendo utilizados como alternativa para otimizar a eficiência na utilização de P por desempenharem papel primordial no ciclo biogeoquímico deste elemento, disponibilizando-o para as plantas, através do fluxo de P pela biomassa microbiana, da solubilização do P inorgânico, da mineralização do P orgânico. Neste contexto, há um crescente interesse na utilização de microrganismos em práticas agrícolas, principalmente para a promoção de crescimento vegetal, entre outras aplicações, o potencial de colonização de microrganismos endofíticos (Azevedo, 1998; Mariano et al., 2004; Santos & Varavallo, 2011; Leite et al., 2013). Esses endófitos proporcionam mobilização e aquisição de nutrientes, estimulam a tolerância a estresses, aumentam a resistência das plantas às doenças exercendo antagonismo, competição e indução dos sistemas de defesa vegetal, além de atuarem como potenciais MSP.

Vários mecanismos estão diretamente ligados à capacidade das plantas em adquirirem P da solução do solo. Entre os principais mecanismos temos: extensão do sistema radicular por associações micorrízicas, promoção do crescimento pela ação de fitohormônios, produção de sideróforos que são moléculas de peso molecular e diversas estruturas químicas quelantes seletivas do íon férrico (Dellagi et al., 2009) e de enzimas fosfatases capazes de hidrolisar o P orgânico, utilização de rochas fosfáticas em associação com MSP e a produção de ácidos orgânicos. A produção de ácidos orgânicos como acetato, lático, oxálico, tartárico, succínio e principalmente o ácido glucônico tem sido considerada um dos principais mecanismos bioquímicos na solubilização de P. Neste contexto, a caracterização molecular de MSP tem sido amplamente utilizada por possibilitar uma identificação taxonômica e por permitir a análise de sequências tanto estreitamente relacionadas quanto entre microrganismos mais distantes.

Portanto, uma maior compreensão da variabilidade genética, eficiência e da capacidade da comunidade microbiana de solubilizar diversas fontes de fosfatos poderá favorecer a seleção e identificação de estirpes potencialmente úteis para agregar valor fertilizante aos fosfatos de baixa solubilidade, visando a utilização destes como fonte de fósforo na agricultura. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi selecionar e caracterizar bactérias endofíticas solubilizadoras de fosfato *in vitro* com potencial para biossolubilização de rochas fosfáticas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Importância do milho no agronegócio brasileiro

O agronegócio brasileiro é um componente importante da economia do país devido à sua participação na absorção de mão de obra, contribuição para o PIB (Produto Interno Bruto) e geração de superávit primário. Atualmente o agronegócio brasileiro apresenta um crescimento na demanda por grãos em virtude do aumento do crescimento populacional, aumento de renda e mudança de hábitos alimentares (MAPA, 2012), bem como pela crescente demanda pelas indústrias de rações que utilizam grãos como base do seu processo produtivo.

A incorporação de novas tecnologias, principalmente em regiões de Cerrado, destaca o agronegócio brasileiro no cenário da economia nacional. Dentro deste cenário, a cultura do milho se destaca considerando que a agroindústria de rações de aves, suínos e bovinos é composta basicamente por farelo de soja e de milho, tornando o milho uma *commodity* estratégica para expansão do agronegócio brasileiro.

A produção mundial de milho situa-se em torno de 876,84 milhões de toneladas e o Brasil aparece no cenário mundial como o terceiro maior produtor de milho com uma produção equivalente a 8% (70,15 milhões de toneladas) da produção mundial (USDA, 2013), sendo superado apenas pelos Estados Unidos e pela China. Em face de fatores como o crescimento da indústria de rações e de atividades de avicultura, suinocultura e pecuária leiteira, o consumo interno de milho cresceu consideravelmente nos últimos anos (CONAB, 2013) e isso se deve tanto à sua multiplicidade de utilização quanto à tradição de cultivo deste cereal no país.

Segundo dados da CONAB (2013), a média nacional de produtividade do milho foi de 5.104 kg/ha na safra 2012/2013 e a previsão é de 5.074 kg/ha para a safra 2013/2014. Ao lado da soja, existem previsões de crescimento contínuo da demanda por grãos de milho nos próximos anos (MAPA, 2012), devido ao aumento das exportações para o mercado de carnes e consumo de grãos.

O cultivo de milho cresce extensamente em todo o mundo. Trata-se de uma das forragens de maior importância agrícola, tanto em países industrializados como em países em desenvolvimento (Huang & Wei, 2004) cuja utilização na alimentação é diversificada devido ao alto teor de amido (71,5%) e teores significativos de proteínas (10,3%), lipídeos (4,8%) e açúcares (2,%) (Lopes, 2005). Desta forma, a cultura do milho tem uma representatividade

alta, estando entre os ítems mais importantes na balança comercial brasileira, sendo o grão a principal forma exportada desta cultura (Ministério do desenvolvimento, indústria e comércio exterior, 2013). Esse incremento na produção do milho ocasiona, conseqüentemente, uma maior demanda por insumos e torna o agronegócio brasileiro altamente dependente do mercado externo no que se refere à utilização de adubação fosfatada, visto que cerca de 50% do adubo fosfatado utilizado no Brasil é proveniente de importação (ANDA, 2013).

## 2.2 Dinâmica de fósforo em solos de Cerrado

Dentre os macronutrientes N, P, K, Ca, Mg e S (nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre) essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, o P constitui um dos fatores limitantes para a produção agrícola, principalmente em regiões de Cerrado (Raij, 2004; Sousa, 2010), devido a sua importância no metabolismo vegetal e atuação nas funções básicas das células como na formação de biomoléculas de ácidos nucleicos (DNA e RNA) e de fosfolípidos, bem como na produção, fluxo e estoque da energia por meio das moléculas de ATP (trifosfato de adenosina) e NADPH (Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) em vários processos biológicos, como fotossíntese e respiração.

Os solos de Cerrado são caracteristicamente ácidos, possuem baixa fertilidade natural e, conseqüentemente, baixa disponibilidade de nutrientes essenciais, como o fósforo (Sousa et al., 2002). Mesmo quando há aplicação de adubação fosfatada, devido ao fenômeno de fixação de P com componentes do solo (Resende, 2004), o P fica menos disponível para as plantas. De forma geral, a concentração de P (2-10  $\mu\text{M}$ ) na solução de solo é sub-ótima (Vance et al., 2003). Isso se deve à condição do P em complexar facilmente com cátions presentes no solo e por sua difusão lenta, criando uma zona de depleção ao redor da rizosfera (Marschner et al., 2011) que, por sua vez, dificulta o acesso das raízes a esse nutriente.

O P no solo pode ser encontrado sob duas formas, de acordo com o composto em que está ligado: fósforo inorgânico ( $P_i$ ) e fósforo orgânico ( $P_o$ ). O  $P_i$  é composto pelos minerais primários, P adsorvido e pequenas quantidades de P da solução do solo ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ). O P adsorvido pode ser encontrado ligado a vários minerais do solo devido a sua elevada capacidade de formar complexos de alta energia de ligação.

Nestes complexos de fixação do P com minerais do solo ou ainda devido à sua adsorção na superfície de partículas de argila, as formas de  $P_i$  podem estar associadas a óxidos

de ferro (P-Fe), de alumínio (P-Al) e silicatos de alumínio nos solos ácidos, ou ligadas a carbonato de cálcio (P-Ca) nos solos alcalinos, dependendo das propriedades do solo (Novais & Smith, 1999; Marschner et al., 2006) e essas reações correspondem ao processo de fixação de P pelo solo que tem como consequência a formação de compostos de baixa solubilidade, tornando o P menos disponível para a planta. Em solos tropicais, como nos solos brasileiros, o P é encontrado em maior quantidade nas formas de fosfatos de alumínio e de ferro (Barroso, 2006; Barroso & Nahas, 2008).

A forma orgânica de P ( $P_o$ ) representa em torno de 10-50% do P total presente na solução do solo (Rodríguez & Fraga, 1999; Tisdale et al., 2003). O  $P_o$  ocorre, principalmente, sob as formas indisponíveis de fosfato inositol (fitato), fosfolipídios e ácidos nucleicos (Gyaneshwar et al., 2002) e trata-se de uma forma resistente à ação de enzimas do solo em função da formação dos complexos fosfato-inositol e proteínas. Devido à sua adsorção em partículas de argila com óxidos de ferro e alumínio, a forma orgânica de P pode se tornar disponível pela mineralização por enzimas fosfatases liberadas pelas raízes e/ou microrganismos do solo (Mendes & Reis Junior, 2003).

Devido à baixa concentração do P na solução do solo, este deve ser continuamente ressuprido pela fase sólida do solo para promover a nutrição vegetal. O P liberado via adubação fosfatada passa para a solução do solo e, em seguida, para a fase sólida em que é convertido inicialmente em P lábil (P prontamente disponível). Com o tempo, esse P passa para formas não lábeis (Raij, 2004; Resende, 2004) que não são passíveis de aproveitamento imediato pelas plantas. O P pode ser removido da solução do solo via adsorção por ligações covalentes de alta energia com a superfície de argilas e óxidos hidratados de Fe e Al em solos ácidos ou com carbonatos de cálcio em solos alcalinos (Resende, 2004; Barroso & Nahas, 2008).

### **2.3 Microrganismos solubilizadores de fósforo (MSP)**

Microrganismos solubilizadores de fósforo (MSP) são abundantes no solo, podem ser facilmente isolados na rizosfera e tem um papel central no ciclo deste nutriente (Whitelaw, 2000; Goldstein et al., 2003), visto que vários grupos da população microbiana apresentam capacidade de solubilizar P presente no solo ou adicionados sob a forma de fertilizantes (Whitelaw, 2000), fato que contribui para estudos que avaliam a capacidade da

microbiota do solo em solubilizar fosfatos, principalmente de cálcio e alumínio (Moreira & Siqueira, 2006; Barroso & Nahas 2008).

Apesar da abrangente ocorrência de MSP no solo, estes estão em número insuficiente para competirem com microrganismos presentes na rizosfera. Assim, o P liberado é insuficiente para promover o crescimento substancial da planta (Richardson, 2001). Como alternativa para aumentar a quantidade de P liberado, a inoculação de plantas com microrganismos selecionados (biofertilizantes) e em concentração superior à naturalmente presente no solo tem sido utilizada para promover benefício substancial na solubilização de fosfato (Rodríguez & Fraga, 1999; Souchie & Abboud, 2007).

A utilização de microrganismos potencialmente solubilizadores de P para agregação de valor fertilizante e potencializar a liberação de P tem alcançado resultados satisfatórios de crescimento e produção em culturas como alfafa (Rodrigues & Fraga, 1999), trigo (Whitelaw, 2000), cebola e soja (Khan et al., 2010), milho (Laheurte & Berthelin, 1987; Nahas, 1994; Oliveira, 2009; Bidondo et al., 2012; Chaves et al., 2013) e cana-de açúcar (Stamford et al., 2006).

Estudos relatam a capacidade de bactérias em solubilizar fosfatos naturais: bactérias dos gêneros *Achromacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* e *Erwinia Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Aereobacter* (Rodríguez & Fraga, 1999; Pérez et al., 2007; Bidondo et al., 2012; Chaves et al., 2013). Entre os fungos solubilizadores de P, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os mais citados na literatura (Barroso & Nahas, 2008; Khan et al., 2010; Chai et al., 2011).

## **2.4 Mecanismos de solubilização de fosfato**

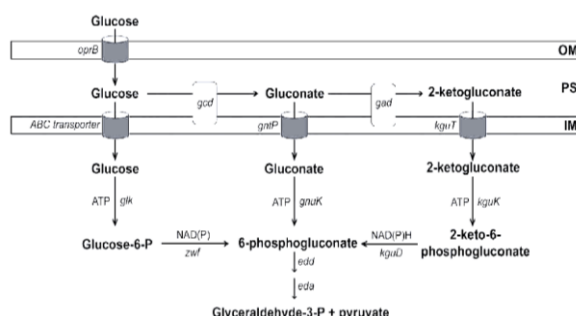
Vários mecanismos estão diretamente ligados à capacidade das plantas em adquirirem P da solução do solo: extensão do sistema radicular por associações micorrízicas, promoção do crescimento de raízes laterais radiculares pela ação de fitohormônios, excreção de íons  $H^+$ , deslocamento do equilíbrio de adsorção que resulta em transferência de íons fosfato para a solução do solo e/ou incremento da mobilidade de formas orgânicas de P; estímulos de processos metabólicos que são efetivos na solubilização e mineralização de P a partir de formas não lábeis de P inorgânico e orgânico, liberação de ácidos orgânicos, produção de sideróforos e de enzimas fosfatases capazes de hidrolisar o  $P_o$  (Mendes & Reis Junior, 2003). Dentre os ácidos orgânicos presentes no processo de solubilização de P, destacam-se os

ácidos glucônico, láctico, cítrico, oxálico, succínico, tartárico, entre outros (Goldstein, 2000; Pérez et al., 2007; Mander et al., 2012; Behera et al., 2013; Kaur & Reddy, 2014).

Acredita-se que a capacidade de solubilização de P correlaciona-se, principalmente, com o potencial de liberação de ácidos orgânicos pelos microrganismos (Mendes et al., 2013). Microrganismos solubilizadores de fósforo inorgânico, em geral, excretam ácidos orgânicos que dissolvem diretamente o material fosfático e/ou quelam cátions que acompanham o ânion fosfato (Marra et al., 2012).

A eficiência na solubilização de  $P_i$  tem sido relacionada ao tipo de ácido orgânico liberado, bem como a combinação entre ácidos com o potencial de dissolver distintas fontes de fosfato (Chen, 2006). De forma geral, a produção de ácidos orgânicos varia com as condições do meio, estado fisiológico e o tipo de microrganismo (Sousa, 2010). Formas de  $P_i$  são solubilizadas por microrganismos heterotróficos e autotróficos e no caso dos heterotróficos, estes ácidos orgânicos dissolvem minerais fosfatados e/ou quelam cátions ligados ao P como, por exemplo,  $PO_4^{3-}$  e, desta forma, liberam P na solução do solo (He et al., 2002). Dentre os ácidos produzidos por grande parte de BSP (Bactérias Solubilizadoras de Fósforo) encontram-se os ácidos orgânicos como acetato, láctico, oxálico, tartárico, succínio e glucônico (Mander et al., 2012).

Segundo Pérez et al. (2007), BSP têm produzido, principalmente, os ácidos glucônico e ceto-glucônico que são produzidos no periplasma de muitas bactérias gram-negativas via oxidação direta da glicose. Miller et al. (2010) constataram que o mecanismo utilizado pela maioria das espécies de *Pseudomonas* para solubilização de fosfato inorgânico envolve a síntese de ácidos orgânicos, em particular o ácido glucônico, pelo metabolismo extracelular oxidativo direto da glicose em que ocorre extrusão de ácido glucônico para o exterior da célula, tendo como produto final o gliceraldeído-3- fosfato mais piruvato (Figura 1).



**Figura 1** – Via metabólica proposta para o catabolismo da glicose em *Pseudomonas* com formação de ácido glucônico (Miller et al., 2010). Genes que codificam enzimas/proteínas

envolvidas no transporte e conversão de moléculas são determinados para cada passo: *oprB*, glicose/carboidrato porina de membrana exterior; *gcd*, glicose desidrogenase; *gad*, glucanato desidrogenase; *gntP*, glucanato permeasse; *kguT*, transportador putativo 2-cetoglucanato; *glk*, glucoquinase; *kguk*, 2-cetoglucanato quinase; *zwf*, glicose-6- fosfato- desidrogenase; *kguD*, cetoglucanato 6-fosfato redutase; *edd*, fosfoglucanato desidratase; *eda*, ceto-deoxi-fosfoglucanato aldolase. *OM*:membrana exterior; *PS*: espaço periplasmático; *IM*: membrana interna.

Barroso & Nahas (2008), em um estudo realizado com *Aspergillus niger* relataram que a atividade solubilizadora encontrada foi relacionada com a produção de ácidos orgânicos atribuída principalmente à produção dos ácidos glucônico, oxálico, e succínio. *Aspergillus* e *Penicillium* são os gêneros de fungo relatados na literatura que possuem maior capacidade de solubilização de fósforo (Shin et al., 2006; Akintokun et al., 2007) com liberação, principalmente, dos ácidos orgânicos succínico, cítrico, glucônico, cetoglucônico e oxálico (Khan et al., 2010).

Outro mecanismo envolvido na solubilização de P é a atuação das enzimas do solo fitase e fosfatase pela ação de Microrganismos Mineralizadores de Fósforo (MMP). Esses MMP podem mineralizar o fosfato orgânico do solo, também denominado fosfato inositol (fitato; *myoinositol* hexakisfosfato, juntamente com outros isômeros e derivados de ordem inferior) (Greiner et al., 2007) que é a forma predominante de P orgânico nos solos, especialmente os de regiões tropicais.

O processo de mineralização do P retido na molécula orgânica do ácido fítico ( $C_6H_{18}O_{24}P_6$ ) ocorre mediante a liberação de enzimas fosfatases (Richardson & Simpson, 2011) e fitases (Greiner, 2006). A enzima fitase disponibiliza o P a partir do ácido fítico. As enzimas fosfatases são capazes de catalisar a hidrólise das moléculas de P orgânico, disponibilizam esse nutriente para as plantas (Nannipieri et al., 2011), refletindo o funcionamento eficiente do processo de decomposição de resíduos orgânicos, além de atuarem como bioindicadoras de mudanças ambientais (De La Paz Jimenes et al., 2002). Desta forma, a produção de fosfatases ácidas é atribuída à atividade metabólica de raízes e fungos, e de fosfatases alcalinas a fungos e bactérias da rizosfera (Jorquera et al., 2011). O fato de uma fração considerável da microbiota do solo ser capaz de produzir fosfatases extracelulares sugere que esse é um mecanismo importante para a obtenção de P para o seu metabolismo.

Uma forma alternativa de mecanismo para solubilização de P é a utilização de rochas fosfáticas como insumo estratégico em muitos países (Mechri et al., 2014). Porém, a utilização de fosfato de rocha como fonte de fertilizante não disponibiliza o P prontamente para as plantas em solos com condições de pH maiores que 5,5 e 6,0 e mesmo em condições ótimas os rendimentos são inferiores quando comparados com a utilização de fontes solúveis de P (Mechri et al., 2014). Isso se deve ao fato de grande parte do fosfato de rocha aplicado no solo ser rapidamente imobilizado e tornar-se indisponível para as plantas.

Pérez et al., 2007 relataram que a produção de bioinoculantes processados a partir da solubilização de rochas fosfáticas por BSP resulta em rendimentos para a planta. Busato et al. (2012) concluíram que a utilização de fosfato de Araxá em associação com bactérias diazotróficas proporcionou aumento significativo na disponibilidade de P e que isso pode representar uma importante ferramenta biotecnológica para aumentar o valor de resíduos orgânicos. Koppelaar & Weikard (2013) relataram que *Pseudomonas luteola* em associação com hidroxiapatita promoveu o crescimento de plantas e apresentou potencial para uso como biofertilizante.

## **2.5 Potencial biotecnológico de microrganismos endofíticos**

O interior das plantas encontra-se naturalmente colonizado por um grupo em especial de microrganismos endofíticos, os quais vivem em íntima interação com a planta hospedeira e, ao contrário dos microrganismos fitopatogênicos, habitam o interior das plantas sem causar sintomas aparentes de doença (Azevedo, 1998) e vivem a maior parte do seu ciclo de vida dentro dos tecidos vegetais sem emitir nenhum sintoma de patogenicidade (Baldani et al., 1997).

Microrganismos endofíticos, por definição, são geralmente fungos e bactérias que habitam o interior de plantas, podendo ser encontrados em folhas, ramos e raízes vegetais e não causam prejuízos aparentes aos seus hospedeiros (Azevedo, 1998; Challis & Hopwood, 2003), recebendo nutrientes e proteção da planta e, em troca, produzem compostos químicos como antibióticos e enzimas que, em determinadas circunstâncias, protegem e auxiliam a planta (Neto et al., 2003).

Os endófitos são potencialmente úteis à agricultura e à indústria, especialmente a alimentícia e farmacêutica, além de apresentarem potencial de utilização em indústrias de defensivos agrícola (Santos & Varavallo, 2011), bem como de serem utilizados como vetores

genéticos. Além de exercerem funções importantes para a sobrevivência do hospedeiro, atualmente sabe-se que a utilização de microrganismos endofíticos está associada à sua capacidade metabólica de produção de moléculas bioativas (Favoretto, 2010) como toxinas, antibióticos e outros compostos de potencial interesse biotecnológico (Azevedo, 1998; Santos & Varavallo, 2011).

A utilização de microrganismos em práticas agrícolas aumentou significativamente nos últimos anos porque tanto na promoção de crescimento vegetal como no controle biológico de pragas e doenças de plantas, entre outras aplicações, eles se constituem em potenciais substitutos de produtos químicos, podendo favorecer desta maneira a preservação do ambiente (Araújo et al., 2000). A exemplo, alguns microrganismos endofíticos são produtores hábeis de diversos compostos bioativos que são, em sua maioria, produtos naturais com atividade antimicrobiana e confere aos endófitos mecanismos de sobrevivência no ambiente, sendo, deste modo, essencial em um ambiente como a planta onde diversos microrganismos coexistem e competem pelos nutrientes e por espaço (Leite et al., 2013).

Um grande número de trabalhos tem mostrado o uso potencial de microrganismos endofíticos como agentes no controle biológico de doenças e pragas em plantas, na indução de resistência na planta hospedeira, na promoção de crescimento vegetal, no aumento da tolerância ao estresse pela seca ou calor em gramíneas, na produção de metabólitos secundários de interesse para a saúde humana e na fitorremediação de áreas poluídas (Zhang et al., 2009).

A solubilização de fosfato é comum entre bactérias endofíticas. Forchetti et al. (2007), relataram que endófitos bacterianos de girassol apresentaram desempenho superior na solubilização de P sugerindo uma seleção para bactérias endofíticas promotoras de crescimento. Kuklinsky-Sobral et al. (2004), isolaram bactérias epifíticas e endofíticas de soja e encontraram predominância de 60% (predominância de *Pseudomonaceae*, *Burkholderiaceae* and *Enterobacteriaceae*) de endófitos capazes de solubilizarem fosfato. Palaniappan et al. (2010) isolaram bactérias de nódulos de raízes feijão e encontraram a maioria de endófitos capazes de solubilizarem fosfato, além de possuírem características múltiplas como produção do fitohormônio AIA (ácido indol-3-acético) e produção de sideróforos.

## **2.6 Identificação molecular dos microrganismos endofíticos solubilizadores de fósforo**

Vários trabalhos têm sido realizados com o objetivo de isolar, identificar e estudar a diversidade de bactérias endofíticas nos tecidos de várias espécies de plantas e suas interações (Li et al., 2010). Nesse sentido, o gene 16S rRNA tem sido amplamente utilizado para estudos taxonômicos, pois permite a análise de sequências tanto estreitamente relacionadas quanto entre microrganismos mais distantes (Souza, 2011).

Resultados de estudos baseados na amplificação e sequenciamento de fragmentos da região 16S mostraram que a diversidade de microrganismos em amostras ambientais é vasta (Souza, 2011). Portanto, o sequenciamento do gene 16S rDNA tem auxiliado nos estudos de diversidade genética bacteriana, pois permite a identificação das espécies isoladas. Chueire et al. (2003) empregaram a técnica de sequenciamento dessa região com o intuito de estabelecer relações filogenéticas de estirpes comerciais recomendadas para as culturas de soja e do feijoeiro no Brasil. Videira et al. (2009) avaliaram a diversidade de bactérias associadas ao arroz e registraram espécies fixadoras de nitrogênio através do sequenciamento do gene 16S rRNA.

Portanto, as sequências genômicas oferecem informações valiosas sobre a biologia de microrganismos, e quanto mais sequências tornam-se disponíveis, maior número de informações é gerado sobre a identidade e os mecanismos envolvidos no sucesso de colonização e interação desses microrganismos com as plantas.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1.1 Coleta das amostras vegetais**

O material vegetal foi coletado em experimento de campo contendo milho no estágio de floração da safra 2013 proveniente de distintos genótipos de milho plantados em latossolo vermelho distrófico na Embrapa Milho e Sorgo (19°28'S 44°15'W), município de Sete Lagoas-MG. As partes (raiz, folha e colmo) da planta foram conduzidas ao Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo da Embrapa Milho e Sorgo para limpeza e desinfestação e posteriores análises bioquímicas e microbiológicas.

#### **3.1.2 Desinfestação das amostras vegetais**

Os procedimentos de desinfestação do material vegetal e isolamento de microrganismos endofíticos foram realizados conforme descrito por Araújo et al. (2000) e Marriel et al.(2001). As folhas, raízes e colmo foram lavados em água corrente e desinfestadas sequencialmente por meio de imersão em etanol 70 % por 2 minutos; 5 minutos em hipoclorito de sódio a 2,5 % de cloro ativo (v/v) e novamente em etanol 70 % durante 2 minutos. Após desinfestação todo o material vegetal foi lavado cinco vezes com água destilada esterilizada.

Para a verificação da eficiência do processo de desinfestação, alíquotas da água destilada (100 µL) utilizada na primeira e última lavagem dos tecidos vegetais foram inoculadas em meio de cultura BDA( Batata, 200 g L<sup>-1</sup>; Dextrose,20 g L<sup>-1</sup> e Agar, 15 g L<sup>-1</sup>) e incubadas a 25-28°C durante 5 dias. Foram realizadas três repetições para cada plaqueamento.

#### **3.1.3 Isolamento de bactérias endofíticas**

Para o isolamento de bactérias endofíticas de amostras de raízes e folhas, estas partes foram previamente desinfestadas superficialmente como descrito anteriormente e cerca de 10 g de cada amostra foi macerada com areia esterilizada (Marriel et al., 2001). O macerado obtido foi diluído serialmente em solução salina (0,85%) e homogeneizado por 30 minutos. Após homogeneização, uma alíquota de 1 mL foi retirada para se proceder a diluições seriadas (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-5</sup>).

Posteriormente, uma alíquota de 100 µL de cada diluição seriada foi plaqueada em meio de cultura BDA suplementado com nistatina e ciclohexamida. As placas inoculadas foram incubadas a 25-28°C por até 10 dias, sendo o crescimento dos microrganismos acompanhado diariamente. Foram realizadas três repetições para cada plaqueamento. No tratamento controle, as placas foram inoculadas com solução salina (0.85%) esterilizada.

Para o isolamento de bactérias endofíticas de amostras de colmo de milho, este material foi previamente desinfestado superficialmente como citado anteriormente, sendo posteriormente realizado um corte sobre os entrenós do colmo para extração da seiva sob pressão positiva de sucção (Marriel et al., 2001). A seiva obtida foi diluída em solução salina (0,85%) e homogeneizada por 30 minutos. Após homogeneização, uma alíquota de 1 mL foi retirada para se proceder a diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ), sendo a inoculação similar ao processo realizado para folhas e raízes, descrito anteriormente.

Após o isolamento obteve-se morfotipos de bactérias da seiva, folha e raiz que foram incorporados à Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo. Para este estudo, foram utilizados 73 isolados selecionados aleatoriamente para serem caracterizados quanto a eficiência de solubilização de fósforo *in vitro* em meio sólido, meio líquido, meio enriquecido com rochas fosfáticas, produção de ácidos orgânicos e identificação taxonômica. Destes 73 isolados, 25 foram isolados de seiva, 22 isolados de folha e 26 de raiz.

### **3.2 Eficiência de solubilização de fósforo por microrganismos endofíticos em meio de cultura sólido**

As 73 estirpes selecionados foram inoculadas em placas contendo o meio NBRIP (*National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium*) (Nautiyal, 1999) e incubadas a 28 °C durante 7 dias para visualização do halo indicador de solubilização.

Após o período de incubação, o halo de solubilização foi medido pelo seguinte critério: diâmetro total ( $\phi$  halo +  $\phi$  colônia) dividido pelo diâmetro da colônia, considerando-se a média de quatro repetições para cada amostra. O resultado obtido foi expresso pelo Índice de Solubilização por meio da fórmula proposta por Berraquero et al. (1976):

$$IS = \phi \text{ Halo (mm)} / \phi \text{ Colônia (mm)}$$

### 3.3 Eficiência de solubilização de fósforo por microrganismos endofíticos em meio de cultura líquido

As estirpes isoladas foram crescidas em meio de cultura TSB (*Trypticase Soy Broth*) e incubadas a 30 °C por 3 a 5 dias, sob agitação constante. Após o período de incubação as amostras foram avaliadas em espectrofotômetro a 540 nm para ajuste da densidade ótica (*Optical Density* - DO) de cada isolado e padronização do inóculo a ser utilizado nos testes de solubilização *in vitro*. Após o ajuste da DO, 100 µL de cada cultura foi adicionado em tubos falcon estéreis contendo 15 mL de meio de cultura NBRIP (Nautiyal, 1999) modificado para o uso de 40 g.L<sup>-1</sup> de glicose, sendo incubadas a 30 °C sob agitação constante.

Para determinação do fósforo solubilizado, foram consideradas três repetições por isolado, nos períodos de 3, 6 e 9 dias de incubação. Após cada período de incubação as culturas foram centrifugadas e o sobrenadante filtrado em papel de filtro Whatman n°42 para determinação da concentração de P solúvel e pH em água. Para determinação do P solubilizado em meio de cultura foi utilizado o método colorimétrico de Murphy & Riley (1962), subtraindo-se o P solúvel contido na amostra controle (meio de cultura com fosfato tricálcio sem inoculação). Todo o material utilizado nas medições foi descartável (Figura 2), para evitar contaminações com fósforo livre nas vidrarias e tubos, com exceção dos funis de vidro que foram tratados com ácido clorídrico (10% v/v).



**Figura 2** – Material descartável utilizado para análise de fósforo.

### **3.4 Eficiência de solubilização de fósforo por microrganismos endofíticos em meio de cultura líquido enriquecido com rochas fosfáticas**

Para determinação do P solubilizado foram selecionadas, aleatoriamente, 12 estirpes entre as 73 previamente isoladas. Foram consideradas três repetições por estirpe em esquema fatorial 3x12, sendo três fontes de rocha (hidroxiapatita, fosfato de Araxá e fosfato Itafós) como únicas fontes de P disponível no meio de cultura.

As estirpes foram cultivadas em tubos falcon contendo 20 mL de meio líquido NBRIP (Nautiyal, 1999) suplementado com as fontes de P citadas anteriormente e incubadas a 30 °C por 7 dias. Após período de incubação, as culturas foram centrifugadas e o sobrenadante filtrado em papel de filtro Whatman n°42 para determinação da concentração de P solúvel e pH em água. Para determinação do P solubilizado foi utilizado o método colorimétrico de Murphy & Riley (1962), subtraindo-se o P solúvel contido na amostra controle (meio de cultura com hidroxiapatita, fosfato de Araxá e fosfato de Itafós, separadamente, sem inoculação). Todo o material utilizado nas medições foi descartável (Figura 2) para evitar contaminações com fósforo livre nas vidrarias e tubos, com exceção dos funis de vidro que foram tratados com ácido clorídrico (10% v/v).

### **3.5 Quantificação de ácidos orgânicos**

A quantificação dos ácidos orgânicos acético, butírico, cítrico, glucônico, 2-cetoglucônico, 5-cetoglucônico, láctico, oxálico, propiônico e succínico foi realizada no Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Minas Gerais, por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). As estirpes foram inoculadas em meio líquido NBRIP (Nautiyal, 1999) e o sobrenadante da análise de solubilização de fósforo em meio líquido foi utilizado para a quantificação dos ácidos orgânicos.

A concentração dos ácidos orgânicos foi determinada utilizando um cromatógrafo modelo LC-20A Prominence, Shimadzu (Japão). Foi utilizada coluna SUPELCOGEL C-610H 30 cm x 7,8 mm (Sigma). A separação ocorreu a 65°C, sendo a fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM com um fluxo de 0,6mL.min<sup>-1</sup>. Foi utilizado detector de índice refrativo RID-10A, com a temperatura da célula do detector a 45°C. A área do pico gerada pelo índice de refração foi calculada para determinar-se a concentração de cada ácido orgânico.

### 3.6 Identificação molecular dos microrganismos endofíticos solubilizadores de fósforo

A extração de DNA e as análises de biologia molecular deste estudo foram realizadas no Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo.

#### 3.6.1 Extração do DNA genômico de bactérias

Os isolados bacterianos foram cultivados para saturação em 5mL de meio líquido LB (Luria-Bertani – triptona 10 g.L<sup>-1</sup>; NaCl 5 g.L<sup>-1</sup>; extrato de levedura 5 g.L<sup>-1</sup>) por 72 horas a 28°C, com agitação constante de 150 rpm. Depois desse período, as suspensões bacterianas foram recolhidas em microtubos de 1,5 mL e centrifugadas por 2 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado em 1 mL de solução salina 0,8%.

O precipitado foi ressuscitado em 567 µL de tampão TE pH 8,0 (10 mM Tris HCl pH 8,0 e 1 mM EDTA pH8,0) e posteriormente adicionado 30µL de SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 10% mais 3µL de proteinase k (20mg.mL<sup>-1</sup>), homogeneizado vigorosamente e incubado a 37 °C por 1 hora. Após a incubação foram adicionados 100µL de NaCl 5M em cada amostra que foi disposta para homogeneizar em vortex. Em seguida, foram adicionados às amostras 80µL de solução CTAB/NaCl 10% que foram homogeneizadas vigorosamente e submetidas à incubação por 10 minutos a 65 °C.

Após esta fase, foram adicionados 600µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) às amostras e estas homogeneizadas por 5 minutos e centrifugadas a 14000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo microtubo de 1,5mL e acrescentados 600µL de clorofórmio/álcool isoamílico e este conjunto foi homogeneizado por 5 minutos por inversão e centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos .

A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo microtubo de 1,5mL e acrescida de 600µL de isopropanol gelado para precipitar o DNA. A solução de DNA-isopropanol foi incubada por 1 hora a 20 °C ou a -80 °C por 30 minutos. Decorrido o período de incubação, a solução de DNA-isopropanol foi centrifugada a 14000 rpm por 20 minutos.

O isopropanol foi descartado e o *pellet* preservado. Esse *pellet* foi lavado com a adição de 100µL de etanol 70% (gelado), homogeneizado e centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos para concentrar o DNA. Após centrifugação, o etanol 70% foi descartado e o *pellet* disposto

em centrífuga a vácuo por 10 minutos para liofilização. Por fim, o *pellet* foi eluído em 100 $\mu$ L de tampão TE pH 8,0 mais 1 $\mu$ L de RNase 10mg.mL<sup>-1</sup> e estocado a -20 °C.

### 3.6.2 Quantificação do DNA genômico

O DNA genômico extraído foi quantificado por eletroforese em gel de agarose 1% comparando-se com marcador molecular de concentração conhecida e a visualização realizada em transiluminador sob radiação ultravioleta para verificação de uma única banda de DNA sem qualquer tipo de arraste.

Em seguida, foi realizada a quantificação em espectrofotômetro para verificar se a relação das leituras nos comprimentos de onda 260/280 nm estava entre 1,8 e 2,0. A concentração do DNA genômico foi ajustada para a concentração de 20 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup>, utilizando-se água Milli-Q esterilizada como diluente.

### 3.6.3 Amplificação de sequências do rDNA 16S de bactérias

Para amplificar as sequências de nucleotídeos da região 16S rDNA (DNA ribossomal) de bactérias foram utilizados os *primers* F968 e R1401 (Nubel et al., 1996). A reação de PCR consistiu de 5  $\mu$ L de DNA; 5  $\mu$ L tampão 10X; 2,5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 2,0  $\mu$ L de dNTP's (2,5 mM cada); 4,0  $\mu$ L de cada *primer* (5  $\mu$ M); 0,3  $\mu$ L de Taq DNA Polimerase (5 U $\mu$ L<sup>-1</sup>, Invitrogen); 0,5  $\mu$ L de formamida e 26,7  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O Milli-Q, perfazendo um volume final de 50  $\mu$ L. A amplificação foi realizada com desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 2 minutos e extensão final conduzida a 72 °C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% para visualização do DNA amplificado.

### 3.6.4 Purificação dos produtos de PCR em gel de agarose e sequenciamento de DNA

A identificação molecular das estirpes utilizadas neste estudo foi realizada com base na identidade de sequências 16S rDNA de isolados bacterianos endofíticos de raiz, seiva e folha de milho. Foram sequenciadas 42 estirpes selecionadas aleatoriamente entre os isolados bacterianos solubilizadores de fósforo deste trabalho.

Os produtos da amplificação da PCR foram removidos do gel e purificados utilizando-se o kit “*QIAquick Gel Extraction*” (Qiagen). As reações de sequenciamento foram preparadas

utilizando-se 2 µL do DNA purificado (entre 50 a 100 ng), 2 µL Big Dye V3.1 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA), 2 µL do tampão 5X (*Applied Biosystems*, Foster City, CA), 1 µL de *primer* (5 µM) e 3µL de água Milli-Q estéril, perfazendo um volume final de 10 µL. As reações foram submetidas a 96°C por 20 segundos, 55 °C por 15 segundos, 60 °C por 4 minutos, repetidos por 30 vezes cada.

Após o término da reação, foram adicionados 40 µL de isopropanol 75% (v/v), às amostras que foram homogeneizadas e dispostas no escuro à temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 45 minutos. O isopropanol foi descartado e adicionados 100 µL de etanol 70% (v/v) e as amostras foram novamente centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos.

O etanol foi descartado e as amostras dispostas em estufa a 65 °C por 3 minutos. As amostras injetadas no sequenciador foram previamente ressuspensas em 10 µL de formamida HI-DI (*Applied Biosystems*, Foster City, CA), desnaturadas a 95 °C por 5 minutos e mantidas no gelo até a injeção no sequenciador.

As amostras foram analisadas no sequenciador automático ABI Prism 3100® (*Applied Biosystems*), sendo as sequências de nucleotídeos editadas e comparadas com sequências depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) através do programa Blast N (Altschul et al., 1997).

### **3.7 Análise estatística**

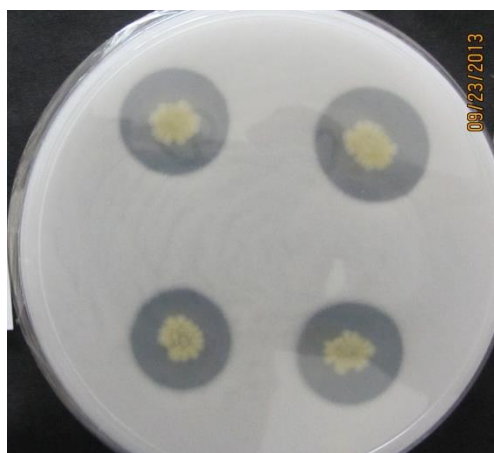
Todos os ensaios foram analisados segundo o delineamento inteiramente casualizado com três repetições por amostra, exceto para as análises de solubilização de fósforo em meio de cultura sólido em que foram realizadas quatro repetições por amostra. Os resultados de cada ensaio foram submetidos individualmente à análise de variância e, quando ocorreram diferenças significativas pelo teste F ( $p < 0,05$ ), os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando o programa Sisvar 5.3 (Ferreira, 2010). Para as análises de correlação de Pearson foi utilizado o programa R (R Development Core Team 2011).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Eficiência de solubilização de fósforo por microrganismos endofíticos em meio de cultura sólido

A eficiência de solubilização de fosfato em meio de cultura sólido foi determinada pela formação de halo transparente indicador de solubilização (Figura 3). O índice de solubilização variou significativamente ( $p < 0,05$ ) entre os isolados avaliados (Tabela 1).

Do total de 73 isolados, 25 não foram capazes de formar halo e a presença do halo de solubilização sugere a eficiência dos microrganismos em solubilizar P de fontes insolúveis. De acordo com os índices de solubilização (Tabela 1) os isolados foram classificados como estirpes de baixa solubilização ( $IS < 2$ ), média ( $2 \leq IS \leq 4$ ) e alta solubilização ( $IS > 4$ ) (Berraquero et al., 1976).



**Figura 3** - Halo de solubilização em meio sólido NBRIP formado por microrganismos capazes de solubilizarem fosfato tricálcio, fonte exclusiva de fósforo adicionado ao meio de cultura. Halo translúcido ao redor da colônia indica processo de solubilização de fósforo.

O meio de cultura utilizado contém fonte insolúvel de P na forma de fosfato tricálcio que na presença de cloreto de cálcio e substâncias liberadas pelos microrganismos, como ácidos orgânicos e enzimas no meio circundante, sofre processo de solubilização que é evidenciado pela formação de um halo translúcido ao redor das colônias que apresentam capacidade solubilizadora (Nautiyal, 1999; Souchie et al., 2005).

**Tabela 1** – Potencial de solubilização de fosfato, aos 7 dias de inoculação em meio de cultura sólido NBRIP, de 73 estirpes endofíticas isoladas de folha, raiz e seiva de milho.

Isolado	IS <sup>1</sup>	Capacidade solubilizadora	Origem	Isolado	IS <sup>1</sup>	Capacidade solubilizadora	Origem
Controle <sup>2</sup>	-	-	-	<b>1918</b>	1,39 f	Baixa	Seiva
<b>1919</b>	3,71 a	Média	Seiva	<b>1923</b>	1,33 f	Baixa	Seiva
<b>1925</b>	3,61 a	Média	Seiva	<b>1915</b>	1,30 f	Baixa	Seiva
<b>1929</b>	2,88 b	Média	Seiva	<b>2106</b>	1,24 f	Baixa	Raiz
<b>1962</b>	2,42 c	Média	Raiz	<b>2103</b>	1,21 f	Baixa	Folha
<b>2011</b>	2,35 c	Média	Seiva	<b>2084</b>	1,13 g	Baixa	Folha
<b>2091</b>	2,21 d	Média	Raiz	<b>1912</b>	1,00 g	Baixa	Seiva
<b>2102</b>	2,11 d	Média	Raiz	<b>1982</b>	1,00 g	Baixa	Raiz
<b>1930</b>	2,06 d	Média	Seiva	<b>2094</b>	1,00 g	Baixa	Folha
<b>2105</b>	2,06 d	Média	Folha	<b>2109</b>	1,00 g	Baixa	Raiz
<b>1922</b>	2,05 d	Média	Seiva	<b>1974</b>	1,00 g	Baixa	Raiz
<b>1961</b>	2,00 d	Média	Raiz	<b>2089</b>	1,00 g	Baixa	Raiz
<b>1924</b>	1,94 d	Baixa	Seiva	<b>1937</b>	-	-	Folha
<b>1936</b>	1,94 d	Baixa	Folha	<b>1942</b>	-	-	Raiz
<b>1935</b>	1,90 d	Baixa	Folha	<b>1944</b>	-	-	Raiz
<b>1939</b>	1,90 d	Baixa	Folha	<b>1964</b>	-	-	Raiz
<b>2100</b>	1,80 e	Baixa	Folha	<b>1972</b>	-	-	Raiz
<b>2087</b>	1,79 e	Baixa	Raiz	<b>1979</b>	-	-	Raiz
<b>1916</b>	1,76 e	Baixa	Seiva	<b>1981</b>	-	-	Raiz
<b>1920</b>	1,71 e	Baixa	Seiva	<b>1984</b>	-	-	Raiz
<b>2009</b>	1,71 e	Baixa	Seiva	<b>2006</b>	-	-	Seiva
<b>2012</b>	1,69 e	Baixa	Seiva	<b>2007</b>	-	-	Seiva
<b>1917</b>	1,69 e	Baixa	Seiva	<b>2008</b>	-	-	Seiva
<b>2013</b>	1,69 e	Baixa	Seiva	<b>2079</b>	-	-	Folha
<b>2014</b>	1,67 e	Baixa	Seiva	<b>2080</b>	-	-	Folha
<b>2112</b>	1,66 e	Baixa	Raiz	<b>2081</b>	-	-	Folha
<b>1921</b>	1,64 e	Baixa	Seiva	<b>2082</b>	-	-	Folha
<b>2099</b>	1,64 e	Baixa	Raiz	<b>2083</b>	-	-	Folha
<b>1976</b>	1,62 e	Baixa	Raiz	<b>2085</b>	-	-	Folha
<b>1932</b>	1,58 e	Baixa	Folha	<b>2086</b>	-	-	Raiz
<b>1934</b>	1,55 e	Baixa	Folha	<b>2088</b>	-	-	Raiz
<b>2095</b>	1,53 e	Baixa	Raiz	<b>2096</b>	-	-	Folha
<b>1928</b>	1,50 f	Baixa	Seiva	<b>2097</b>	-	-	Folha
<b>2010</b>	1,49 f	Baixa	Seiva	<b>2107</b>	-	-	Folha
<b>2093</b>	1,42 f	Baixa	Raiz	<b>2108</b>	-	-	Raiz
<b>1931</b>	1,42 f	Baixa	Folha	<b>2110</b>	-	-	Folha
<b>1926</b>	1,40 f	Baixa	Seiva	<b>2111</b>	-	-	Raiz

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup> Índice de solubilização (Berraquero et al., 1976).

<sup>2</sup> Meio de cultura sem microrganismo.

- Indica que não houve formação de halo de solubilização.

IS < 2: baixa solubilização; 2 ≤ IS ≤ 4: média solubilização; IS > 4: alta solubilização.

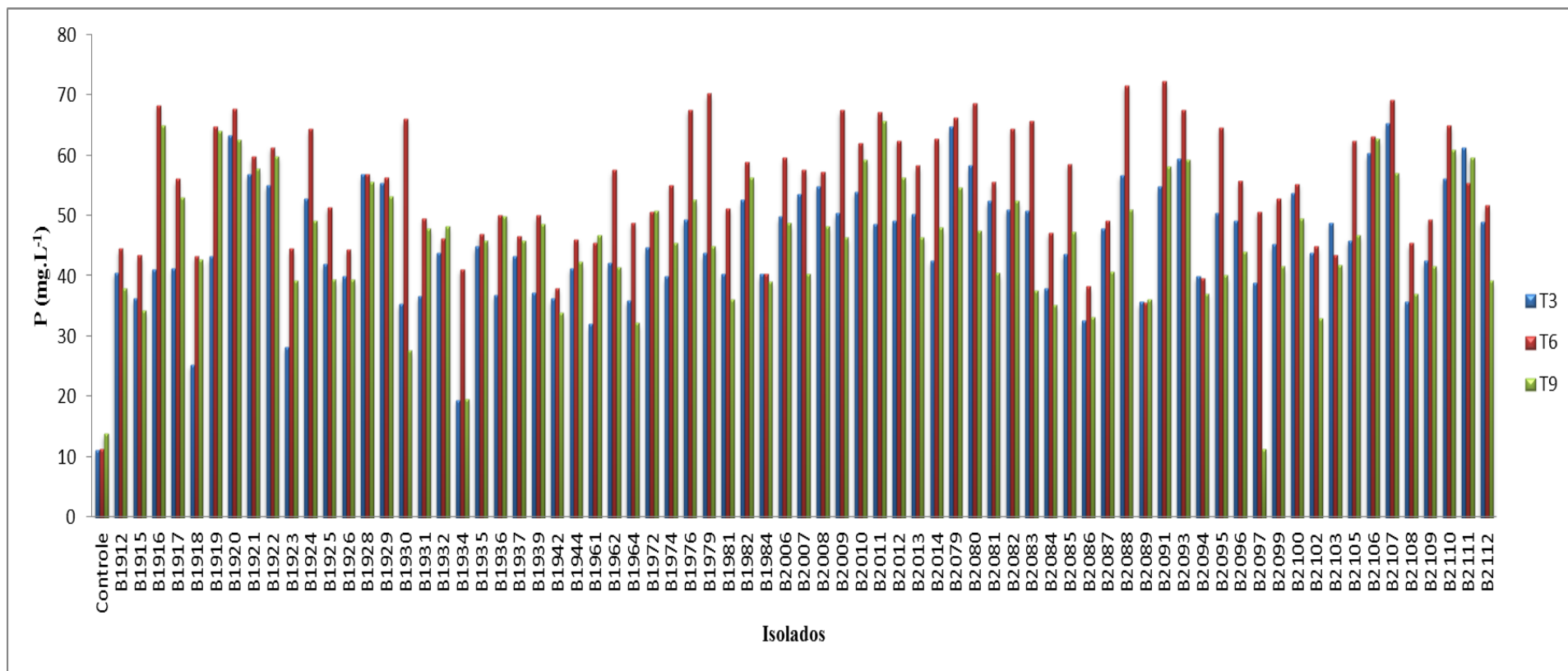
Segundo Whitelaw et al., (2000), o potencial de solubilização de fosfato é proporcional ao tamanho do halo e a sua relação com o tamanho da colônia. No entanto, a confiabilidade desta técnica é questionável uma vez que isolados que não produzem qualquer

halo visível indicativo de solubilização podem solubilizar formas insolúveis de fosfatos inorgânicos em meio líquido (Oliveira et al., 2009, Sousa, 2010). Desta forma, a utilização de meio sólido como ferramenta para *screening* de microrganismos solubilizadores de fosfato não deve ser o único método a ser empregado para seleção desses microrganismos, visto que em trabalhos como o de Sousa (2010) alguns isolados selecionados como não solubilizadores em meio sólido pela avaliação do IS, apresentaram eficiência de solubilização em meio líquido.

#### **4.2 Eficiência de solubilização de fósforo por microrganismos endofíticos em meio de cultura líquido**

Para se determinar o período de incubação necessário para a quantificação do P a ser solubilizado pelos microrganismos, foram realizados ensaios com 3, 6 e 9 dias de incubação. Desta forma, a taxa de solubilização foi expressa como sendo o somatório do valor absoluto de P solubilizado pelos microrganismos durante 9 dias de incubação. A comparação entre os valores obtidos de P demonstram que aos 6 dias de incubação a maioria dos isolados apresentou, em média, maiores valores absolutos de P solubilizado (Figura 4).

Isso indica que, para este estudo, é recomendado que a incubação das amostras ocorra até o 6º dia, o que viabiliza os ensaios do ponto de vista de tempo e economia, pois no término do 9º dia de incubação a diferença nos valores de P foi pequena quando comparada ao 6º dia. Outro fator que corrobora para esta recomendação é que a redução do P solubilizado do 6º para o 9º dia de incubação pode ser decorrente do maior consumo de P pelas estirpes que, possivelmente, atingiram a população máxima suportada no meio de cultura (Sousa, 2010), incorporando à biomassa microbiana boa parte do P que foi solubilizado, associado a mecanismos de reimplantação do P solubilizado.



**Figura 4** – Valores absolutos médios de três repetições de fósforo solubilizado em meio NBRIP líquido nos períodos de 3, 6 e 9 dias por estirpes bacterianas endofíticas de milho.

De acordo com os resultados da biossolubilização de P, observou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para os isolados. Dentre as 73 estirpes avaliadas, as estirpes 1934 e 1920 apresentaram, respectivamente, menor ( $80,32 \text{ mg.L}^{-1}$  de P) e maior ( $193,71 \text{ mg.L}^{-1}$  de P) taxa de solubilização de fosfato em relação à solubilização de P no controle (Tabela 2).

Os valores de pH em água de cada cultura foram mensurados antes de se proceder a quantificação de P. Observou-se redução significativa ( $p < 0,05$ ) para os valores de pH entre os isolados testados (Tabela 2).

Foi observada uma correlação de Pearson negativa de  $-0,58$  ( $p < 0,05$ ) entre a eficiência solubilizadora dos isolados em meio líquido e a acidificação do meio, resultados que também foram encontrados em outros trabalhos (Sousa, 2010) e esperados, uma vez que um dos mecanismos desenvolvidos por microrganismos solubilizadores de P é liberar metabólitos capazes de acidificarem o meio de cultivo. Sousa (2010) observou que para alguns isolados a acidificação do meio pode ser a etapa inicial do processo de solubilização o que, no decorrer do tempo pode ser maximizado ou até mesmo permanecer estável de acordo com as características de cada microrganismo.

**Tabela 2** – Valores de pH e liberação de fósforo disponível por bactérias endofíticas cultivadas em meio líquido contendo fosfato tricálcio como fonte exclusiva de fósforo.

Isolado	Taxa solubilização P ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) <sup>1</sup>	pH <sup>2</sup>	Isolado	Taxa solubilização P ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) <sup>1</sup>	pH <sup>2</sup>
<b>Controle</b> <sup>3</sup>	36,20 i	6,51 a	<b>2096</b>	149,01 d	4,98 d
<b>1920</b>	193,71 a	4,25 g	<b>2081</b>	148,47 d	4,42 f
<b>2107</b>	191,46 a	4,26 g	<b>1972</b>	146,28 d	4,15 h
<b>2106</b>	186,17 a	4,19 h	<b>1962</b>	141,18 e	4,38 g
<b>2093</b>	186,13 a	4,04 i	<b>1974</b>	140,55 e	5,10 c
<b>2079</b>	185,55 a	3,90 i	<b>2112</b>	140,01 e	4,38 g
<b>2091</b>	185,15 a	4,14 h	<b>2099</b>	139,57 e	4,25 g
<b>2110</b>	181,98 a	3,90 i	<b>1932</b>	138,29 e	4,32 g
<b>2011</b>	181,32 a	4,13 h	<b>2087</b>	137,75 e	4,74 e
<b>2088</b>	179,39 a	4,73 e	<b>1935</b>	137,54 e	4,28 g
<b>2111</b>	176,33 b	4,83 e	<b>1936</b>	136,88 e	4,30 g
<b>1922</b>	176,30 b	3,97 i	<b>1939</b>	135,92 e	4,28 g
<b>2010</b>	175,38 b	4,37 g	<b>1937</b>	135,90 e	4,24 g
<b>2080</b>	174,53 b	4,26 g	<b>1931</b>	134,21 e	4,23 g
<b>1916</b>	174,52 b	3,97 i	<b>2103</b>	134,14 e	4,41 f

Médias seguidas de mesma letra, para cada parâmetro analisado, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup> Somatório do valor absoluto de P solubilizado pelos microrganismos durante 9 dias de incubação.

<sup>2</sup> pH em água mensurados aos 9 dias de incubação.

<sup>3</sup> Meio de cultura sem microrganismo.

**Tabela 2 – Continuação**

Isolado	Taxa solubilização P (mg.L <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	pH <sup>2</sup>	Isolado	Taxa solubilização P (mg.L <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	pH <sup>2</sup>
<b>1921</b>	174,47 b	4,21 g	<b>2109</b>	133,57 e	4,76 e
<b>1919</b>	172,08 b	4,09 h	<b>1925</b>	132,88 e	4,73 e
<b>1976</b>	169,50 b	4,14 h	<b>1944</b>	129,71 e	4,77 e
<b>1928</b>	169,23 b	4,03 i	<b>1930</b>	129,06 e	4,26 g
<b>2082</b>	167,97 b	4,94 d	<b>1981</b>	127,83 e	4,68 e
<b>2012</b>	167,89 b	4,16 h	<b>1961</b>	124,33 f	4,54 f
<b>1924</b>	166,27 c	3,99 i	<b>1912</b>	122,98 f	5,17 c
<b>1929</b>	165,01 c	3,99 i	<b>2102</b>	121,81 f	4,58 f
<b>2009</b>	164,23 c	5,12 c	<b>2084</b>	120,42 f	4,80 e
<b>2008</b>	160,38 c	4,69 e	<b>1984</b>	119,77 f	4,71 e
<b>1979</b>	159,09 c	5,14 c	<b>2108</b>	118,24 f	5,00 d
<b>2100</b>	158,63 c	4,03 i	<b>1964</b>	117,14 f	4,82 e
<b>2006</b>	158,18 c	5,67 b	<b>2094</b>	116,81 f	4,92 e
<b>2095</b>	155,25 d	4,45 f	<b>1915</b>	114,19 f	5,25 c
<b>2105</b>	155,19 d	4,31 g	<b>1923</b>	111,93 g	5,50 b
<b>2013</b>	155,11 d	4,51 f	<b>1918</b>	111,35 g	4,68 e
<b>2083</b>	154,11 d	5,34 c	<b>1942</b>	108,27 g	4,86 e
<b>2014</b>	153,38 d	4,53 f	<b>2089</b>	107,47 g	5,02 d
<b>2007</b>	151,62 d	4,26 g	<b>2086</b>	104,07 g	5,17 c
<b>1917</b>	150,47 d	4,41 f	<b>2097</b>	100,82 g	4,69 e
<b>2085</b>	149,75 d	4,96 d	<b>1934</b>	80,32 h	4,23 g

Médias seguidas de mesma letra, para cada parâmetro analisado, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup> Somatório do valor absoluto de P solubilizado pelos microrganismos durante 9 dias de incubação.

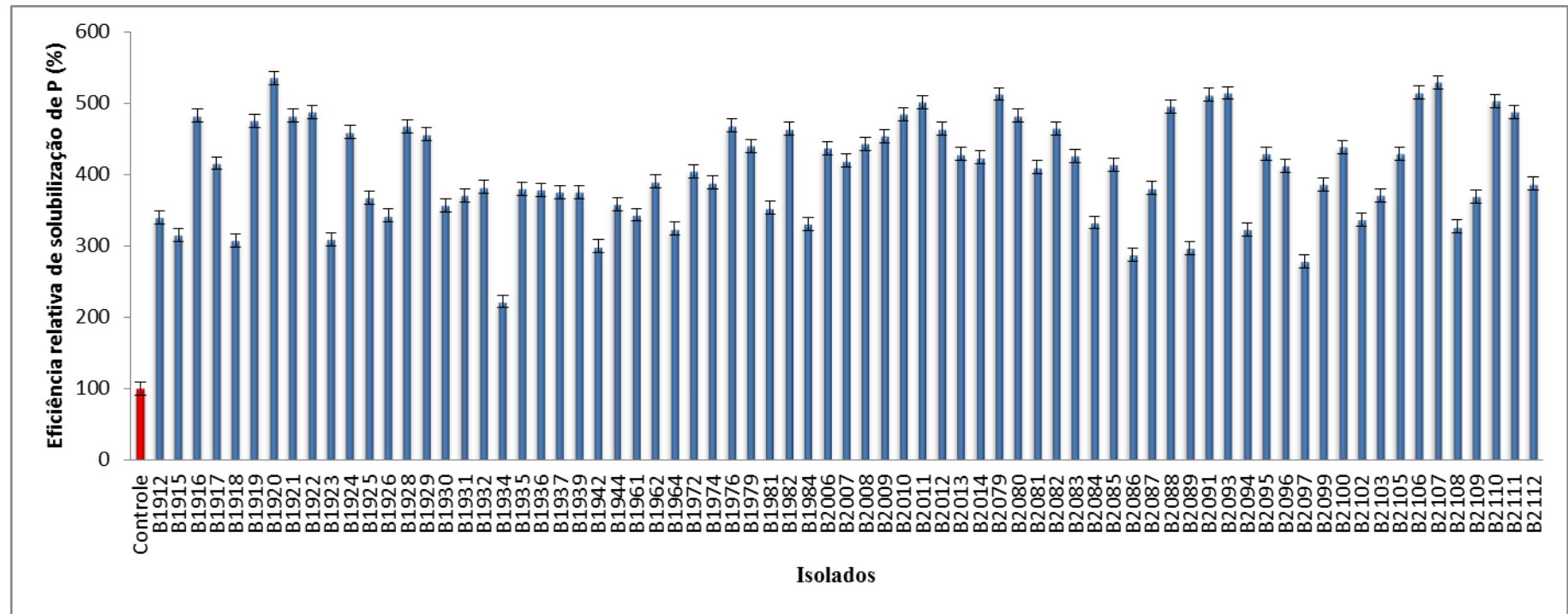
<sup>2</sup> pH em água mensurados aos 9 dias de incubação.

<sup>3</sup> Meio de cultura sem microrganismo.

Comparando os resultados para eficiência de solubilização em meio sólido (Tabela 1) e em meio líquido (Tabela 2), observou-se que maioria dos microrganismos em estudo possuem baixo potencial solubilizador. Contudo, as estirpes que não solubilizaram em meio sólido apresentaram eficiência solubilizadora relativa superior ao controle em meio líquido. Então, para melhor visualização dos resultados da taxa biossolubilização em meio líquido, os dados foram dispostos em porcentagem média de solubilização dividindo-se o valor da taxa de solubilização pela taxa do controle (Figura 5), considerando a % média de solubilização do controle igual a 100%.

Resultados semelhantes foram encontrados por Nautiyal, (1999) e Alikhany et al., (2006) em que os autores observaram que isolados com pouca capacidade de solubilização em meio sólido obtiveram capacidade maior de solubilizar P quando inoculados em meio líquido e isso pode ser explicado pela difusão de ácidos orgânicos e metabólitos produzidos pelos

microrganismos de acordo com o tipo de ácido e o meio de cultura utilizado (Delvasto et al., 2006).



**Figura 5** – Eficiência relativa média de solubilização de fósforo por estirpes endofíticas isoladas de milho. Barras verticais indicam o erro padrão da média de três repetições. Barra em vermelho indica a porcentagem de solubilização do controle utilizado (meio de cultura sem adição de microrganismo).

### 4.3 Eficiência de solubilização de fósforo por microrganismos endofíticos em meio de cultura líquido enriquecido com rochas fosfáticas

Observou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para as três fontes de rochas fosfáticas utilizadas. A estirpe 1934 apresentou maior eficiência solubilizadora tanto para a hidroxiapatita quanto para o fosfato de Itafós (Tabela 3). Os tratamentos com adição de hidroxiapatita apresentaram, em média, melhor eficiência solubilizadora (Tabela 3). As estirpes 1912, 1923 e 1934 foram as que mais solubilizaram P proveniente da hidroxiapatita e fosfato de Itafós, enquanto que a estirpe 2082 foi a que apresentou, em média, maior solubilização quando o fosfato de Araxá foi adicionado ao meio de cultura como fonte de P (Tabela 3). Tal fato sugere que a solubilização de fosfato de rocha por MSP depende da composição química de cada tipo de rocha, ou seja, sugere que a composição mineral interfere diretamente na disponibilidade de P.

**Tabela 3** – Liberação de fósforo disponível por bactérias endofíticas cultivadas em meio líquido contendo rochas fosfáticas como fonte de fósforo.

Isolado	Fosfato de Araxá		Hidroxiapatita		Fosfato de Itafós	
	P (mg.L <sup>-1</sup> )	pH	P (mg.L <sup>-1</sup> )	pH	P (mg.L <sup>-1</sup> )	pH
Controle <sup>1</sup>	0,22 b	7,22 a	0,50 c	6,32 a	0,12 c	6,88 a
<b>1934</b>	28,50 a	3,18 e	59,59 a	4,15 e	41,88 a	2,94 e
<b>1921</b>	18,29 a	3,74 d	54,82 a	4,18 e	18,01 c	3,52 d
<b>1912</b>	20,04 a	3,57 d	51,43 a	4,70 d	37,11 a	2,89 e
<b>1923</b>	18,51 a	3,79 d	50,32 a	4,25 e	37,00 a	2,98 e
<b>2097</b>	17,00 a	4,02 c	49,73 a	4,65 d	5,44 c	4,14 c
<b>1918</b>	15,52 a	7,20 a	49,19 a	4,89 c	11,25 c	4,04 c
<b>1964</b>	10,82 b	4,77 b	48,97 a	4,50 d	22,06 b	3,26 d
<b>2083</b>	12,88 b	3,36 e	44,06 a	5,70 b	22,15 b	3,50 d
<b>1929</b>	4,63 b	4,51 b	40,73 a	5,22 c	6,09 c	3,84 c
<b>2084</b>	12,68 b	3,52 d	39,92 a	6,15 a	7,71 c	4,59 b
<b>1915</b>	6,63 b	4,29 c	31,35 b	5,14 c	24,48 b	3,09 e
<b>2082</b>	32,93 a	3,50 d	25,29 b	4,43 d	17,51 c	3,54 d

Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup>Meio de cultura sem microrganismo.

Os resultados da mensuração do pH demonstram que houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) nos valores de pH entre os isolados testados para a adição das três fontes de rocha no meio de cultivo (Tabela 3). Foram observadas correlações de Pearson não significativas ( $p > 0,05$ ) de -0,41 e de -0,33 entre P solubilizado e pH para, respectivamente, hidroxiapatita e fosfato de Araxá, ao passo que para o fosfato de Itafós a correlação foi de -0,90 e significativa ( $p < 0,05$ ).

Estudos têm demonstrado a potencialidade de rochas fosfáticas serem utilizadas como biofertilizantes em associação com microrganismos solubilizadores de fósforo. Yadav et al. (2013) concluíram que a utilização de hidroxiapatita em ensaio de solubilização por *Brevibacillus* sp proporcionou os melhores valores de liberação de P quando comparado a outras fontes de fosfato. Kurek et al. (2013) relataram que a associação entre hidroxiapatita e outras fontes de P promoveram ganhos de eficiência no processo de solubilização por *Pseudomonas luteola*.

#### 4.4 Quantificação de ácidos orgânicos

A análise cromatográfica para determinação de ácidos orgânicos produzidos por microrganismos endofíticos solubilizadores de fósforo foi realizada considerando-se o tempo de incubação de 6 dias, pois nesse período observou-se que a maioria dos isolados apresentou, em média, maiores valores absolutos de P solubilizado. O tempo de retenção dos ácidos orgânicos analisados variou entre 9,6 e 22 minutos (Tabela 4).

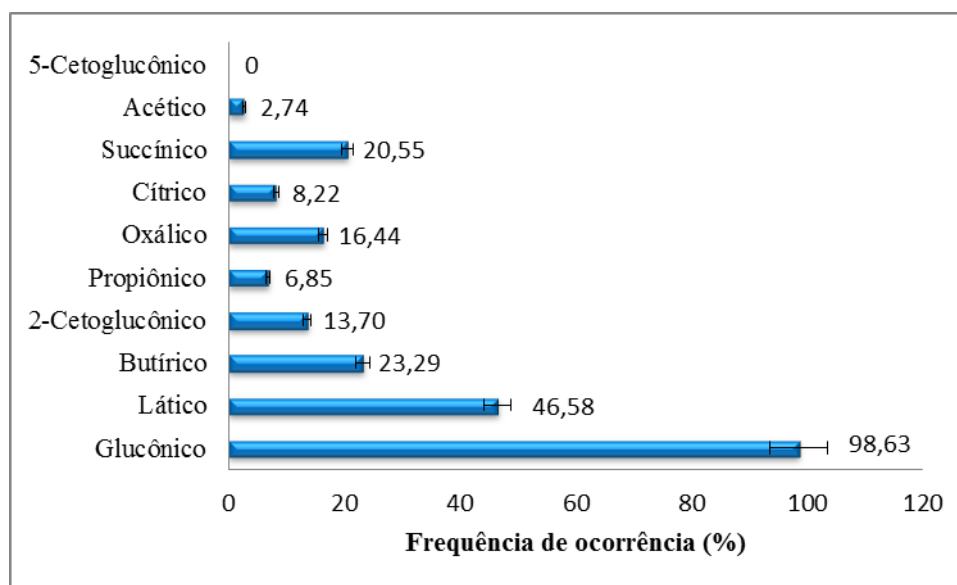
**Tabela 4** – Tempo médio de retenção dos ácidos orgânicos analisados por cromatografia líquida de alta performance.

Ácido orgânico	Tempo de retenção (minutos)	Ácido orgânico	Tempo de retenção (minutos)
2 Cetoglucônico	10.2 – 10.6	Glucônico	11.3 -12
5 Cetoglucônico	10.6 - 11	Lático	14.5 - 15
Acético	16 -17	Oxálico	9.6 - 10
Butírico	22 - 23	Propiônico	18.5 - 19
Cítrico	10 – 10.2	Succínico	13.3 - 14

Dos dez ácidos orgânicos analisados, apenas o ácido 5-Cetoglucônico não foi detectado na análise cromatográfica, enquanto que o ácido glucônico foi o ácido detectado na

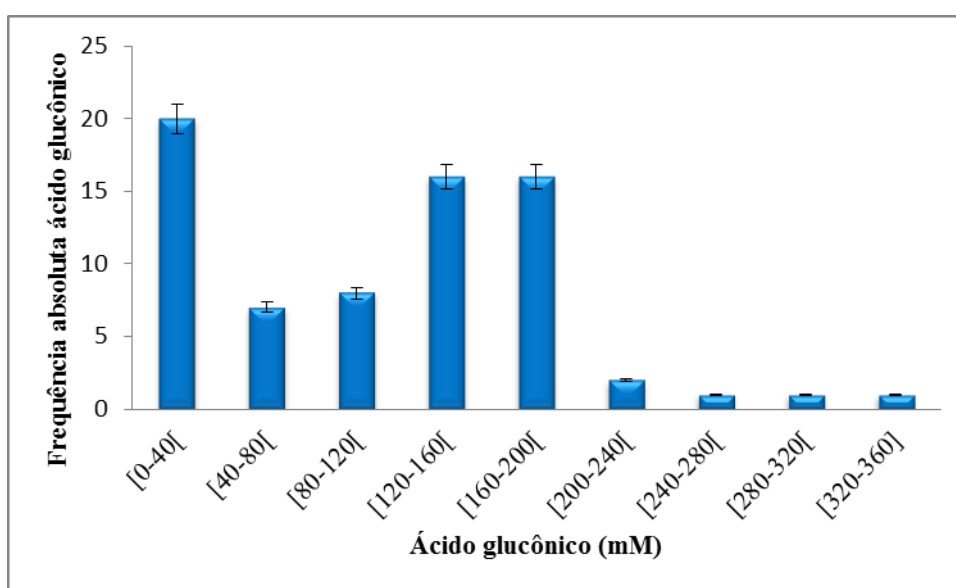
maioria das estirpes analisadas (Figura 6). A produção dos ácidos orgânicos variou significativamente ( $p < 0,05$ ) entre os isolados analisados (Tabela 5), assim como o tipo de ácido produzido por cada isolado. Observou-se que, em média, 98,63% das estirpes produziram ácido glucônico; 46,58% das estirpes produziram ácido lático; 23,29% das estirpes produziram ácido butírico; 13,70% das estirpes produziram ácido 2-cetoglucônico; 6,85% das estirpes produziram ácido propiônico; 16,44% das estirpes produziram ácido oxálico; 8,22% das estirpes produziram ácido cítrico; 20,55% das estirpes produziram ácido succínico e 2,74% das estirpes produziram ácido acético.

Para a produção dos ácidos lático e oxálico observou-se que a estirpe 2106 foi a que produziu, em média, maior quantidade de ácido lático (308,21 mM) e oxálico (413,31 mM), enquanto que a estirpe 2099 foi a que se destacou para a produção dos ácidos cítrico (246,82 mM) e acético (162,46 mM) (Tabela 5). Este resultado pode ser explicado pelo fato da detecção desses ácidos orgânicos contar com a presença interferentes tais como composição e concentração de substratos utilizados no meio de cultivo dos microrganismos (He et al., 2013, Giles et al., 2014).



**Figura 6** – Produção relativa de ácidos orgânicos por bactérias endofíticas de milho, detectados pelo índice de refração em cromatografia líquida de alta eficiência. Barras horizontais indicam o erro padrão da média de três repetições.

Entre os padrões de ácidos analisados, o ácido glucônico foi o mais frequente entre as estirpes analisadas (Figura 7), o que já era esperado uma vez que, dentre os ácidos produzidos pelo metabolismo de MSP, os mais frequentemente detectados são o glucônico, 2-cetoglucônico (Rodríguez & Fraga, 1999; Yu et al., 2011); oxálico, succínico, cítrico (Kan et al., 2010; lático (Bidondo et al., 2012). A predominância do ácido glucônico pode ser explicada pelo seu mecanismo de metabolismo oxidativo direto em que ocorre oxidação da glicose mediada por ação enzimática e formação dos ácidos glucônico e 2-cetoglucônico como produtos finais da via metabólica (Figura 1).



**Figura 7** – Frequência absoluta de ácido glucônico (mM) dentro dos intervalos de classes [0-360 mM] para as estirpes endofíticas solubilizadoras de fósforo. Barras verticais indicam o erro padrão da média de três repetições.

Miller et al. (2010) reportaram em estudo de solubilização de fosfato inorgânico por *Pseudomonas* que o ácido glucônico foi detectado em maior proporção que o ácido 2-cetoglucônico. Chuang et al. (2011) trabalhando com solubilização por *Aspergillus niger* também detectou a presença de ácido glucônico em maior frequência quando comparado aos ácidos cítrico e oxálico. Behera et al. (2013) relataram que a produção de ácidos orgânicos por bactérias envolvidas na solubilização de P tem sido frequentemente documentada e que os ácidos glucônico e 2-cetoglucônico são encontrados na maioria dos MSP.

**Tabela 5** – Produção de ácidos orgânicos pelas estirpes endofíticas solubilizadoras de fosfato.

Isolado	Produção de Ácidos Orgânicos (mM)									
	Acético	Butírico	Cítrico	Glucônico	2-Cetoglucônico	Lático	Oxálico	Propiônico	Succínico	Total <sup>1</sup>
2084	-	-	-	324,08 a	-	101,00 g	27,35 i	-	-	252,42 g
2014	-	-	-	264,17 b	-	167,35 d	-	-	-	331,53 f
2111	-	-	-	212,80 c	-	166,03 d	147,59 d	-	62,15 c	588,56 d
1923	-	-	-	202,77 c	-	-	-	-	-	202,77 g
2105	-	-	-	195,12 c	-	37,25 n	71,88 f	-	18,39 f	322,65 f
1925	-	16,46 k	-	194,59 c	-	56,86 j	-	-	-	267,92 g
2006	-	-	-	190,10 c	-	103,71 g	-	41,20 d	-	335,01 f
2007	-	-	-	189,62 c	-	46,57 l	-	-	-	236,19 g
1934	-	116,84 e	-	188,31 c	87,98 b	162,91 e	-	-	-	556,05 d
2082	-	-	-	183,75 c	-	22,06 o	-	-	-	205,81 g
2009	-	-	-	183,71 c	-	62,84 i	-	-	-	246,55 g
2095	-	-	-	183,34 c	-	35,55 n	-	-	-	218,88 g
2110	-	43,42 h	-	179,49 c	52,09 d	37,34 n	-	-	191,56 a	503,90 e
1982	-	-	22,38 e	178,47 c	-	59,10 j	-	20,08 e	-	280,02 f
2079	-	-	-	177,38 c	-	271,58 b	-	-	-	448,96 e
2088	-	-	-	171,46 c	-	46,37 l	-	102,33 c	-	320,16 f
1972	-	-	-	170,88 c	25,23 g	233,64 c	-	112,79 b	-	542,54 d
1964	-	257,35 d	-	167,17 d	-	50,98 k	60,15 g	-	-	509,92 e
2010	-	-	-	165,60 d	-	117,37 f	-	-	-	253,97 g
2081	-	27,10 j	-	161,17 d	-	18,23 p	133,03 e	-	-	339,53 f
2008	-	-	-	157,99 d	-	36,07 n	-	-	-	194,07 g
2100	-	48,01 g	-	156,21 d	91,28 b	37,71 n	-	-	100,66 b	541,87 d
2012	-	-	-	155,47 d	-	-	-	-	-	155,47 h
2107	-	407,22 b	-	150,94 d	-	45,89 l	161,14 c	-	51,82 d	817,02 b
1979	-	-	228,82 b	148,18 d	-	116,75 f	-	983,32 a	-	1477,06 a
2083	-	-	-	147,01 d	-	17,39 p	48,34 h	-	-	212,83 g
1984	-	16,47 k	105,47 c	146,53 d	-	-	-	-	-	268,47 g
1944	-	37,49 i	-	143,96 d	-	41,46 m	-	-	-	366,24 f

Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

-Indica que não houve produção de ácido orgânico.

<sup>1</sup>Total de ácido orgânico produzido por cada estirpe bacteriana endofítica de milho.

**Tabela 5 - Continuação**

Produção de Ácidos Orgânicos (mM)										
Isolado	Acético	Butírico	Cítrico	Glucônico	2-Cetoglucônico	Lático	Oxálico	Propiônico	Succínico	Total <sup>1</sup>
2089	-	-	-	143,48 d	-	-	-	-	-	91,31 h
1936	-	-	-	142,50 d	-	-	-	-	-	142,50 h
2106	-	-	-	136,70 e	-	308,21 a	413,31 a	-	16,29 f	874,51 b
2013	-	-	-	135,72 e	-	160,56 e	-	-	-	283,76 f
2086	-	-	-	127,40 e	-	-	-	-	-	127,40 h
1974	-	-	-	127,40 e	-	-	-	-	-	127,40 h
2093	109,86 b	407,58b	-	125,72 e	65,66 c	-	-	-	24,96 e	720,46 c
2091	-	47,61 g	-	125,10 e	19,12 g	42,73 m	-	-	51,60 d	292,81 f
2112	-	-	-	124,51 e	43,31 e	-	318,50 b	-	19,29 f	531,16 d
2096	-	-	-	119,50 e	-	40,66 m	-	-	-	146,82 h
1942	-	16,22 k	-	117,44 e	-	-	-	-	-	133,65 h
2094	-	-	-	111,76 e	-	16,68 p	-	-	-	128,43 h
2080	-	453,04 a	-	109,45 e	-	-	-	-	-	562,50 d
2085	-	-	-	97,81 f	-	61,26 i	-	-	-	159,07 h
1935	-	-	-	94,68 f	-	-	-	-	-	94,68 h
2099	162,46 a	-	246,82 a	85,76 f	-	59,66 j	39,77 h	-	23,44 e	591,26 d
2109	-	42,25 h	28,84 e	81,36 f	-	-	-	-	192,13 a	357,92 f
1939	-	-	-	72,51 f	-	-	-	-	-	72,51 i
2087	-	17,09 k	-	70,40 f	-	-	-	-	-	87,49 h
2108	-	-	43,01 d	61,80 f	-	-	-	-	100,04 b	198,27 g
1981	-	337,06 c	-	60,62 f	31,00 f	-	-	-	-	462,92 e
2097	-	-	-	47,28 g	-	-	-	-	27,51 e	68,13 i
1932	-	-	-	44,67 g	-	-	-	-	-	44,67 i
1937	-	-	-	42,58 g	-	-	-	-	-	42,58 i
2102	-	56,31 f	-	33,96 g	34,00 f	-	60,46 g	-	16,37 f	202,00 g
1931	-	-	-	30,65 g	-	-	-	-	-	30,65 i
2103	-	-	-	30,47 g	251,02 a	-	60,01 g	-	24,28 e	365,78 f
1976	-	-	-	27,16 g	-	-	-	-	-	27,16 i

Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

-Indica que não houve produção de ácido orgânico.

<sup>1</sup>Total de ácido orgânico produzido por cada estirpe bacteriana endofítica de milho.

**Tabela 5 – Continuação**

Isolado	Produção de Ácidos Orgânicos (mM)									Total <sup>1</sup>
	Acético	Butírico	Cítrico	Glucônico	2-Cetoglucônico	Lático	Oxálico	Propiônico	Succínico	
1915	-	-	-	26,23 g	-	-	-	-	-	26,23 i
1962	-	-	-	22,78 g	-	-	-	-	-	22,78 i
1929	-	-	-	20,63 g	-	-	-	-	-	20,63 i
1918	-	-	-	20,58 g	-	-	-	-	-	20,58 i
1920	-	-	-	20,53 g	-	-	-	-	--	20,53 i
1921	-	-	-	20,43 g	-	-	-	-	-	20,43 i
1961	-	-	-	20,43 g	-	-	-	-	-	20,43 i
1924	-	-	-	20,42 g	-	-	-	-	-	20,42 i
1928	-	-	-	20,17 g	-	-	-	-	-	20,17 i
1912	-	-	-	18,76 g	-	-	-	-	-	18,76 i
1917	-	-	-	18,49 g	-	-	-	-	-	18,49 i
1930	-	-	-	18,32 g	-	-	-	-	-	18,32 i
1919	-	-	-	18,23 g	-	-	-	-	-	18,23 i
1916	-	-	-	16,39 g	-	-	-	-	-	16,39 i
1922	-	-	-	16,33 g	-	-	-	-	-	16,33 i
1926	-	-	-	16,17 g	-	57,42 j	-	-	-	16,17 i
2011	-	-	-	16,17 g	-	71,40 h	-	-	-	71,39 i

Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

-Indica que não houve produção de ácido orgânico.

<sup>1</sup>Total de ácido orgânico produzido por cada estirpe bacteriana endofítica de milho.

#### 4.5 Produção de ácidos orgânicos x eficiência de solubilização

Efetivamente, observou-se uma correlação significativa entre a produção de ácido butírico e a solubilização de P, ao passo que para os demais ácidos analisados observou-se uma correlação não significativa (Tabela 6). A correlação entre produção de ácidos orgânicos e a acidificação do meio foi significativa apenas para o ácido glucônico, enquanto que as correlações entre pH e os demais ácidos analisados foram negativas e isso indica que na proporção em que ocorre acidificação do meio de cultura há um acréscimo na produção desses ácidos, o mesmo se verifica para o P solubilizado e a produção dos ácidos acético, 2-cetoglucônico e lático (Tabela 6).

Barroso & Nahas (2008) associaram o mecanismos de solubilização à produção de ácidos orgânicos e, conseqüentemente, à diminuição de pH e atribuíram a produção de ácidos orgânicos ao processo de solubilização em que há diminuição do pH circundante. Khan et al. (2010) relataram que os ácidos orgânicos são produtos do metabolismo secundário de MSP. Segundo Behera et al.(2013), o principal mecanismo envolvido na solubilização de fósforo é a e mineralização do P orgânico por fosfatases ácidas e a produção de ácidos orgânicos e este processo envolve excreção de prótons  $H^+$  que, por sua vez, acidificam o meio circundante ocasionando a redução do pH (Giles et al., 2014).

Os resultados de correlação entre P solubilizado e produção de ácidos orgânicos não foram os esperados baseando-se na literatura, pois o esperado é que quanto maior for a eficiência do microrganismo em solubilizar P maior seja a produção dos ácidos orgânicos, pois estes ácidos são produtos do metabolismo secundário de MSP (Khan et al., 2010; Ahmad et al., 2013). Portanto, pode-se inferir que a redução de pH do meio sugere a liberação desses ácidos de acordo com características intrínsecas de cada microrganismo.

**Tabela 6** – Coeficientes de correlação de Pearson entre o fósforo solubilizado, acidez e produção de ácidos orgânicos.

Variáveis	Produção de Ácidos Orgânicos										
	P (mg.L <sup>-1</sup> )	pH	Acético	Butírico	Cítrico	Glucônico	2-Cetoglucônico	Lático	Oxálico	Propiônico	Succínico
<b>P (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	1	-0,41*	-1 <sup>ns</sup>	0,53*	0,44 <sup>ns</sup>	0,17 <sup>ns</sup>	-0,40 <sup>ns</sup>	-0,07 <sup>ns</sup>	0,34 <sup>ns</sup>	0,52 <sup>ns</sup>	0
<b>pH</b>		1	-1 <sup>ns</sup>	-0,20 <sup>ns</sup>	-0,05 <sup>ns</sup>	0,26*	-0,17 <sup>ns</sup>	-0,30 <sup>ns</sup>	-0,45 <sup>ns</sup>	0,52 <sup>ns</sup>	-0,13 <sup>ns</sup>

\*Significativo a 5% de probabilidade.

<sup>ns</sup>Não significativo a 5% de probabilidade.

#### 4.6 Caracterização molecular dos microrganismos endofíticos solubilizadores de fósforo

Os dados da caracterização molecular das estirpes bacterianas testadas na biossolubilização de P podem ser visualizados na tabela 8. Observou-se valores de similaridade entre 90% e 100% para as estirpes sequenciadas. Treze isolados apresentaram 100% de similaridade com as espécies de *Enterobacter* sp, *Pantoea ananatis*, *Bacillus* sp, *Bacillus subtilis*, espécie bacteriana não cultivada e *Serratia* sp. Dos 42 isolados sequenciados, 57,14% são do gênero *Bacillus* e 33,33% do gênero *Pantoea*, isto é, dados consonantes com os encontrados na literatura sobre MSF.

As espécies *Bacillus amyloliquefaciens*, *Enterobacter asburiae* e *Bacillus methylotrophicus* foram identificadas neste estudo, embora não sejam tão frequentemente relatadas em trabalhos de solubilização de P. A espécie *Bacillus amyloliquefaciens* atua colonizando a rizosfera, promovendo a atividade biótica no solo, a resistência das plantas aos estresses abióticos causados por patógenos habitantes do solo, aumentando o crescimento e o rendimento das plantas desencadeando precursores de auxinas e outros compostos liberados pela bactéria e em efeito biofertilizante desencadeado pela enzima fitase (Bettiol et al., 2012). *Enterobacter asburiae* inoculada em milho não contribuiu para a promoção de crescimento vegetal em tratamento sem e com fosfato de rocha (Marra, 2012). *Bacillus methylotrophicus* foi identificada em estudo com bactérias endofíticas de bananeira avaliando-se os parâmetros fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato de cálcio e produção de auxina (Andrade, 2012).

Em estudo com MSP, Oliveira et al. (2009), selecionaram as espécies *Pantoea ananatis*, *Burkholderia* sp e *Bacillus* sp como potenciais solubilizadoras de P. Santos e Varavallo (2011) relataram que as bactérias endofíticas dos gêneros *Acetobacter*, *Actinomyces*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pantoea* e *Pseudomonas*, entre outros, têm sido frequentemente utilizadas em promoção de crescimento de plantas associadas à solubilização de P.

Park et al. (2011) relataram que as espécies *Pantoea* sp e *Enterobacter cloacae* foram isoladas no estudo sobre potencial de imobilização de P no solo. Kaur & Reddy (2014) estudaram o potencial de solubilização das bactérias *Pantoea* sp para a melhoria de milho e trigo em locais com e sem adubação fosfatada em diferentes regiões agroclimáticas e ambas foram eficientes na solubilização de P.

**Tabela 7** – Identificação molecular de espécies de bactérias endofíticas solubilizadoras de fosfato isoladas de milho.

Isolado	Origem	Espécie	Acesso Gen Bank	E-value	Similaridade (%)
1915	Seiva	<i>Bacillus pumilus</i>	KF765926.1	0.0	99
1916	Seiva	<i>Klebsiella</i> ssp	HM597960.1	0.0	99
1917	Seiva	<i>Pantoea</i> ssp	HM598011.1	0.0	99
1918	Seiva	<i>Bacillus</i> sp	KF824499.1	0.0	99
1919	Seiva	<i>Bacillus subtilis</i>	KF840407.1	0.0	99
1921	Seiva	<i>Enterobacter</i> sp	EF585402.1	0.0	100
1922	Seiva	<i>Pantoea ananatis</i>	AB297969.1	0.0	100
1923	Seiva	<i>Bacillus pumilus</i>	KF765926.1	0.0	99
1924	Seiva	<i>Klebsiella</i> ssp	HM597968.1	0.0	99
1925	Seiva	<i>Pantoea ananatis</i>	JX967707.1	0.0	99
1928	Seiva	<i>Burkholderia gladioli</i>	JX566503.1	0.0	99
1929	Seiva	Bactéria	JF689909.1	0.0	99
1930	Seiva	<i>Pantoea ananatis</i>	JX967707.1	0.0	100
1931	Folha	<i>Pantoea</i> sp	JF262566.1	0.0	99
1932	Folha	<i>Pantoea</i> sp	JX266366.1	0.0	99
1934	Folha	<i>Pantoea ananatis</i>	AB297969.1	0.0	100
1935	Folha	Bactéria	AB858936.1	0.0	99
1936	Folha	<i>Pantoea ananatis</i>	JX967707.1	0.0	100
1937	Folha	<i>Pantoea ananatis</i>	AB297969.1	0.0	100
1939	Folha	<i>Enterobacter asburiae</i>	KF758838.1	0.0	99
1944	Raiz	Bactéria não cultivada	JF964694.1	0.0	99
1961	Raiz	<i>Pantoea dispersa</i>	KF770988.1	0.0	99
1962	Raiz	<i>Bacillus</i> sp	KF824499.1		99
1964	Raiz	<i>Bacillus</i> sp	JQ863379.1	0.0	99
1974	Raiz	<i>Bacillus</i> sp	JQ863379.1	0.0	99
1976	Raiz	<i>Bacillus</i> sp	JQ863379.1	0.0	99
1979	Raiz	<i>Pantoea ananatis</i>	JX967707.1	0.0	100
1982	Raiz	<i>Bacillus</i> sp	JQ863379.1	0.0	99
1984	Raiz	<i>Pantoea dispersa</i>	KF770988.1	0.0	99
2006	Seiva	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	CP003838.1	0.0	98
2008	Seiva	<i>Pantoea ananatis</i>	AB297969.1	0.0	100
2009	Seiva	<i>Bacillus</i> sp	KF824499.1	0.0	99
2010	Seiva	<i>Enterobacter aerogenes</i>	GQ916507.1	0.0	99
2011	Seiva	<i>Bacillus</i> sp	EU864320.1	0.0	100
2012	Seiva	<i>Bacillus</i> sp	KF824498.1	0.0	99
2013	Seiva	Bactéria	AB858936.1	0.0	99
2014	Seiva	<i>Bacillus subtilis</i>	KF758805.1	0.0	99
2079	Folha	Bactéria	AB858936.1	0.0	99
2080	Folha	Bactéria	AB858936.1	0.0	99
2081	Folha	<i>Bacillus cereus</i>	DQ884352.1	0.0	99
2082	Folha	Bactéria	AB858936.1	0.0	99
2083	Folha	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	KF818651.1	0.0	99
2084	Folha	<i>Bacillus subtilis</i>	KJ162241.1	0.0	99
2085	Folha	Bactéria	AB858936.1	0.0	99
2086	Raiz	<i>Bacillus subtilis</i>	HQ220121.1	0.0	100
2088	Raiz	<i>Bacillus</i> sp	KF824499.1	0.0	99
2096	Folha	Bactéria não cultivada	JF332195	0.0	100
2099	Raiz	<i>Bacillus</i> sp	JQ863379.1	0.0	99
2100	Folha	<i>Serratia</i> sp	HM598009.1	0.0	100
2103	Folha	<i>Pantoea ananatis</i>	AB297969.1	0.0	100
2105	Folha	<i>Pantoea</i> sp	KC833511.1	0.0	99

**Tabela 7** – Continuação.

<b>Isolado</b>	<b>Origem</b>	<b>Espécie</b>	<b>Acesso Gen Bank</b>	<b>E-value</b>	<b>Similaridade (%)</b>
<b>2106</b>	Raiz	<i>Bacillus</i> sp	JQ863379.	0.0	99
<b>2108</b>	Raiz	<i>Bacillus</i> sp	JQ863379.	0.0	99
<b>2110</b>	Folha	<i>Bacillus</i> sp	JQ863379.1	0.0	99
<b>2111</b>	Raiz	<i>Bacillus</i> sp	JQ863379.1	0.0	99

## 5 CONCLUSÃO

Há variabilidade genética e quanto ao potencial de solubilização de P entre as estirpes bacterianas endofíticas avaliadas, de acordo com a fonte de P.

A estirpe 2083 (*Bacillus methylophilus*) é solubilizadora para as três fontes de rochas fosfáticas (Araxá, hidroxiapatita e Itafós) utilizadas, bem como para a fonte tricálcio fosfato.

A estirpe 1921 (*Enterobacter sp* ) é solubilizadora para o fosfato de Araxá e hidroxiapatita, bem como para a fonte tricálcio fosfato.

Dentre os fosfatos de rocha, a adição de hidroxiapatita proporciona, em média, melhores resultados de biossolubilização de fósforo.

A produção de ácido glucônico é o principal mecanismo de solubilização de fosfato.

O gênero *Bacillus*, predomina entre os solubilizadores de P endofíticos avaliados e possui maior eficiência na solubilização de P em meio de cultura contendo tricálcio fosfato. Em segundo lugar, predomina o gênero *Pantoea*, com maior eficiência de solubilização nas fontes de P, hidroxiapatita e fosfato de Itafós.

A inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato incrementa a disponibilidade de fósforo.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional para difusão de adubos (ANDA).<http://www.anda.org.br/> acesso em 09 de setembro de 2013.

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. **Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities**. Microbiol. Res., v.163,p. 173-181, 2013.

AKINTOKUN, A.K.; AKANDE, G.A.; AKINTOKUN ,P.O.;POPOOLA, T.O.S.; BABALOLA, A.O. **Solubilization of insoluble phosphate by organic acid producing fungi isolated from Nigerian soil**. Int J Soil Sci., v. 2, p.301–307, 2007.

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

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs**. Nucleic Acids Research, London, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ANDRADE, L.F. BARROSO, C.B. **Bactérias endofíticas de bananeira “prata-anã”: fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato de cálcio e produção de ácido indol-3-acético**. 2012. 67 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Montes Claros, MG.

ARAÚJO, J.M.; SILVA, A.C.; AZEVEDO, J.L. **Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.)**. Brazilian Archives of Biology Technology ,v. 43, p. 447-451, 2000.

AZEVEDO, J.L. **Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico**. In: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. (coords) Ecologia microbiana. Jaguariuna: Editora Embrapa/CNPMA, 1998. p.445-461.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.V.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DOBEREINER, J. **Recent advances in BFN with non-legume plants**. Soil Biol. Biochem. , v. 29, p. 911-922, 1997.

BARROSO, C.B. **Produção de pellets livres e imobilizados e mecanismo de solubilização de fosfatos inorgânicos por *Aspergillus niger***. 2006. 94 f. Tese (Obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-UNESP, Jaboticabal.

BARROSO, C.B.; NAHAS, E. **Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura**. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.43, n.4, p.529-535, abr. 2008.

BEHERA, B.C.; SINGDEVSACHAN, S.K.; MISHRA, R.R.; DUTTA, S.K.; THATOI, H.N. **Diversity,mechanism and biotechnology of phosphate solubilising**

**microorganism in mangrove – a review.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, P.1-14, 2013.

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

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B.; PINTO, Z.V.; JÚNIOR, T.J.P.; CORRÊA, E.B.; MOURA, A.B.; LUCON, C.M.M.; COSTA, J.C.B.; BEZERRA, J.L. **Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas.** Documentos 88, 155 p. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, 2012.

BIDONDO, L.F.; BOMPADRE, J.; PERGOLA, M.; SILVANI, V.; COLOMBO, R.; BRACAMONTE, F.; GODEAS, A. **Differential interaction between two *Glomus intraradices* strains and a phosphate solubilizing bacterium in maize rhizosphere.** Pedobiologia, V.55, P.227-232, 2012.

BUSATO, J.G.; LIMA, L.S.; AGUIAR, N.O.; CANELLAS, L.P.; OLIVARES, F.L. **Changes in labile phosphorus forms during maturation of vermicompost enriched with phosphorus-solubilizing and diazotrophic bacteria.** Bioresource Technology, v. 110 , p.390–395, 2012.

CHAI, B et al. **Isolation and phosphate-solubilizing ability of a fungus, *Penicillium* sp. from soil of an alum mine.** Journal of Basic Microbiology, v. 51, p.5–14, 2011.

CHALLIS, G.L.; HOPWOOD, D.A. **Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiply secondary metabolite production by *Streptomyces* species.** In Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100: 14555-14561, 2003.

CHAVES, D.P.; ZUCARELI, C.; JUNIOR, A.O. **Fontes de fósforo associadas à inoculação com *Pseudomonas fluorescens* no desenvolvimento e produtividade do milho.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 34, n. 1, p. 57-72, jan./fev. 2013.

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

CHUANG, C.C.; KUO, Y.L.; CHAO, C.C.; CHAO, W.L. **Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*.** Biol Fertil Soils, V. 43, p.575–584, 2011.

CHUEIRE, L. M. O. et al. **Classificacao taxonomica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, v. 27, p.833-840, 2003.

CONAB. Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento. Companhia Nacional de Abastecimento-Conab 2012. **Boletim grãos 2012.** Disponível em : <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12\\_09\\_06\\_09\\_18\\_33\\_boletim\\_graos\\_-\\_setembro\\_2012.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_09_06_09_18_33_boletim_graos_-_setembro_2012.pdf)> Acesso em: 20 ago. 2013.

DE LA PAZ JIMENES, M.; DE LA HORRA, A. M.; PRUZZO, L.; PALMA, R. M. **Soil quality: a new index based on microbiological and biochemical parameters.** *Biology and Fertility of Soil*, v. 35, p. 302-306, 2002.

Dellagi, A., Segond, D. Rigault, M. Fagard, M., Simon, C. Saindrenan, P. & Expert D. **Microbial siderophores exert a subtle role in arabidopsis during infection by manipulating the immune response and the iron status.** *Plant Physiology*, 150: 1687-1696, 2009.

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

DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DOS EUA- Serviço Agrícola Estrangeiro. **Tabela da Área de Milho 04. Rendimento e Produção.** Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/psdonline>> Acesso em: 20 de jan. 2014.

FAVORETTO, N.B. **Produção de substâncias bioativas por microrganismos endofíticos isolados do cerrado de São Carlos – SP.** 2010. 39p. Dissertação (mestrado) Universidade Federal de São Carlos, SP.

FERREIRA, D.F. SISVAR - **Sistema de análise de variância.** Versão 5.3. DEX.Lavras-MG: UFLA, 2010.

FORCHETTI, G.; MASCIARELLI, O.; ALEMANO, S.; ALVAREZ, D.; ABDALA, G. **Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium.** *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 76, p.1145–1152, 2007.

GILES, C.D.; HSU, P.C.; RICHARDSON, A.E.; HURST, M.R.H.; HILL, J.E. **Plant assimilation of phosphorus from an insoluble organic form is improved by addition of an organic anion producing *Pseudomonas* sp.** *Soil Biology & Biochemistry*, v.68, p. 263-269, 2014.

GOLDSTEIN, A.; LESTER, T.; BROWN, J. **Research on the metabolic engineering of the direct oxidation pathway for extraction of phosphate from ore has generated preliminary evidence for PQQ biosynthesis in *Escherichia coli* as well as a possible role for the highly conserved region of quinoprotein dehydrogenases.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1647, p. 266–271, 2003.

GOLDSTEIN, A.H. **Bioprocessing of rock phosphate ore: essential technical considerations for the development of a successful commercial technology.** In: *Proceedings of the International Fertilizer Technical Association Conference*, New Orleans, United States, pp. 1–21, 2000.

GREINER, R.; LIM, B.L.; CHENG, C.; CARLSSON, N.G. **Pathway of phytate dephosphorylation by b-propeller phytases of different origins.** *Can J Microbiol* 53: 488–495, 2007.

GREINER, R. **Phytate-degrading enzymes: regulation of synthesis in microorganisms and plants.** In: Turner BL, Richardson AE, Mullaney EJ (eds) *Inositol phosphates: linking agriculture and environment.* CAB International, London, pp 78–96, 2006.

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

HE, Z. L.; BIAN, W.; ZHU, J. **Screening and identification of microorganisms capable of utilizing phosphate adsorbed by goethite.** *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* v.33, p.647-663, 2002.

HUANG, X. Q.; WEI, Z. M. **High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea Mays* L.)** . *Plant Cell Reportes*, v. 22, p. 793-800, 2004.

JORQUERA, M.A.; SAAVEDRA, N.; MARUYAMA, F.; RICHARDSON, A.E.; CROWLEY, D.E.; CATRILAF, R.C.; HENRIQUEZ, E.J.; MORA, M.L. **Identification of b-propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. from the rhizosphere of pasture plants on volcanic soils.** *FEMS Microbiol Ecol* V.75, P.163–172, 2012.

KAUR, G.; REDDY, M.S. **Influence of P-solubilizing bacteria on crop yield and soil fertility at multilocal sites.** *European Journal of Soil Biology*, v. 61, P.35-40, 2014.

KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; AHMED, M.; OVES, M.; WANI, P.A. **Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective.** *Archives of Agronomy and Soil Science*, V. 56, n. 1, Feb. 2010, 73–98 p.

KOPPELAAR, R.H.E.M.; WEIKARD, H.P. **Assessing phosphate rock depletion and phosphorus recycling options.** *Global Environmental Change*, v. 23, p. 1454–1466, 2013.

KUKLINSKY-SOBRAI, J.; ARAUJO, W.; MENDES, R.; , GERALDI, I.; PIZZIRANI-KLEINER, A.; AZEVEDO, J. **Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion.** *Environ Microbiol*, v. 6, p.1244–1251, 2004.

KUREKA, E.; OZIMEK, E.; SOBICSEWSKIB, P.; STOMKA, A.; JAROSZUK, J. **Effect of *Pseudomonas luteola* on mobilization of phosphorus and growth of young apple trees (Ligol)—Pot experiment.** *Scientia Horticulturae*, v. 164, p. 270–276, 2013.

LAHEURTE, F.; BERTHELIN, J. **Effect of a phosphate solubilizing bacteria on maize growth and root exudation over four levels of labile phosphorus.** *Plant and Soil*, v.105, p.11- 17, 1987.

LEITE, T.S.; FASSONI, A.C.; PEREIRA, O.L.; MIZUBUTI, E.S.G.; ARAÚJO, E.F.; QUEIROZ, M.V. **Novel and highly diverse fungal endophytes in soybean revealed by the consortium of two different techniques.** Journal of Microbiology, v.51,n.1, p. 56-69, 2013.

LI, H.G.; SHEN, J.B.; ZHANG, F.S.; MARSCHNER, P.; CAWTHRAY, G.; RENGEL, Z. **Phosphorus uptake and rhizosphere properties of intercropped and monocropped maize, faba bean, and white lupin in acidic soil.** Biology and Fertility of Soils v.46, p. 79-91, 2010.

LOPES, M. J. C. **Estresse oxidativo e análise anatômica em plantas de diferentes ciclos de seleção do milho ‘Saracura BRS-4154’ sob encharcamento contínuo.** (2005), 1675 65 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MANDER, C.; WAKELIN, S.; YOUNG, S.; CONDRON, L.; CALLAGHAN, M. **Incidence and diversity of phosphate-solubilising bacteria are linked to phosphorus status in grassland soils.** Soil Biology & Biochemistry, v.44 ,p.93-101, 2012.

MAPA- Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento - Assessoria de gestão estratégica. **Brasil projeções do agronegócio 2011/2012 a 2021/2022.** Resumo executivo. Brasília, abril de 2012.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. **Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável.** Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.

MARRA, L.M. **Solubilização de fosfatos por bactérias e sua contribuição no crescimento de leguminosas e gramíneas.** 2012. 141 f. Tese (Obtenção do título de Doutor em Ciência do Solo). Universidade Federal de Lavras, MG.

MARRIEL, I.E.; VALICENTE, F.; SANTOS. C.G.; PAIVA, E.; SELDIN, L. **Ocorrência de endófitos do gênero *Bacillus* em seiva de plantas de milho.** Comunicado técnico 35, 6p. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, 2001.

MARSCHNER, P., CROWLEY D.; RENGELET Z. **Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis e model and research methods.** Soil Biology and Biochemistry, doi:10.1016/j.soilbio.2011.01.005, 2011.

MARSCHNER, P; SOLAIMAN, Z; RENGEL, Z. **Rhizosphere properties of *Poacea* genotypes under P-limiting conditions.** Plant and Soil, v. 283, p.11-24, 2006.

MECHRI, B.; ATTIA, F.; TEKAYA, M.; CHEHEB, H., HAMMAMI, M. **Agronomic application of olive mill wastewaters with rock phosphate increase the 10Me18:0 fatty acid marker of actinomycetes and change rhizosphere microbial functional**

**groups under long-term field conditions.** Soil Biology & Biochemistry, v. 70, p.62-65, 2014.

MENDES, G.O.; FREITAS, A.L.M.; PEREIRA, O.L.; SILVA, I.R.; VASSILEV, N.B.; COSTA, M.D. **Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources.** Ann Microbiol, doi:10.1007/s13213-013-0656-3, 2013.

MENDES, I.C.; REIS JUNIOR, F.B. **Microrganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos: uma análise crítica.** Documentos 85, 26 p. Embrapa Cerrados, Planaltina, 2003.

MILLER, S.H.; BROENE, P.; PRIGENT-COMBARET, C.; COMBES-MEYNET, E.; MORRISSEY, J.P.; O'GARA, F. **Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in Pseudomonas species.** Environmental Microbiology Reports, v.2, n.3, p. 403–411, 2010.

Ministério do desenvolvimento, indústria e comércio exterior. **Balança comercial Brasileira Novembro/2013.** Disponível em: [http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivos/dwnl\\_1386017020.pdf](http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivos/dwnl_1386017020.pdf). Acesso 08 de dezembro de 2013.

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

MURPHY, J., AND J.P. RILEY. **A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters.** Anal. Chim. Acta, v. 27, p.31-36, 1962.

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.

NANNIPIERI, P.; GIAGNONI, L.; LANDI, L.; RENELLA, G. **Role of Phosphatase Enzymes in Soil. In: Phosphorus in action.** Soil Biology, v. 100, part 2, p. 215-243, 2011.

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

NETO, P.A.S.P.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. **Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico.** Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. n. 2, 2003.

NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais.** Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999. 399p.

OLIVEIRA, C.A.; ALVES, V.M.; MARRIEL, I.E.; GOMES, E.A.; MUZZI, M.R.S., CARNEIRO, N.P.; GUIMARAES, C.T., SCHAFFERT, R.E; SÁ, N.M.H. **Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an**

**oxisol of the Brazilian Cerrado Biome.** Soil Biology and Biochemistry, v.41,p.1782–1787, 2009.

PALANIAPPAN, P. et al. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. **Biology Fertility Soils**, Berlin, v.46, n.8, p.807-816, 2010. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/g385407120575151/>>. Acesso em: 03 mar. 2010. doi: 10.1007/s00374-010-0485-5.

PARK, H.J.; BOLAN, N.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. **Isolation of phosphate solubilizing bacteria and their potential for lead phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines.** ecological engineering, v. 33, p. 187–193, 2011.

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

R Development Core Team. R: (2011) A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <http://www.R-project.org>.

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

RESENDE, A.V. **Fontes e modos de aplicação de fósforo para o milho em solo cultivado da região do cerrado.** 2004. 169p. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras.

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

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

SANTOS, T.T. dos ; VARAVALLO, M.A. **Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico.** Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 32, n. 2, p. 199-212, jul./dez. 2011.

SHIN, W.; RYU, J.; KIM, Y.; YANG, J.; MADHAIYAN,M.; SÁ, T. **Phosphate solubilization and growth promotion of maize (*Zea mays* L.) by the rhizosphere soil fungus *Penicillium oxalicum*.** 18th World Congress of Soil Science. July 9–15, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2006.

SOUCHIE, E.L.; ÁZCON, R.; BAREA, J.M.; SAGGIN-JUNIOR, O.J.; SILVA, E.M.R. **Solubilização de fosfatos em meio sólido e líquido por bactérias e fungos do solo.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.40, n.11, p.1149-1152, 2005b.

SOUSA, C.B. **Solubilização de fósforo por bactérias endofíticas**. 2010. 38p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SOUSA, D.M.G.; LOBATO, E.; REIN, T.A. **Adubação com fósforo**. In: SOUSA, D.M.G.; LOBATO, E.(Ed.). *Cerrado: correção do solo e adubação*. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. p.147-168.

SOUZA, S.A. **Diversidade de bactérias endofíticas em bananeira ‘prata anã’**.2011.101p. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Montes Claros.

STAMFORD, N.P.; LIMA, R.A.; SANTOS, C.R.S.; DIAS, S.H.L. **Rock Biofertilizers with *Acidithiobacillus* on Sugarcane Yield and Nutrient Uptake in a Brazilian Soil**. *Geomicrobiology Journal*, V.23, P.261–265, 2006.

TISDALE et al. **Soil fertility and fertilizers**. 5 th ed. New York: Mac Millan, 1993.

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

VIDEIRA, S.S. et al. **Ocorrence and diversity of nitrogen-fixing *Sphingomonas* bacteria associated with rice plants grown in Brazil**. *FEMS Microbiol Letters*, Ireland, v. 293, p. 11-19, 2009.

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

YADAV, H.; GOTHWAL, R.K.; NIGAM, V.K.; SINHA-ROY, S.; GHOSH, P. **Optimization of culture conditions for phosphate solubilization by athermo-tolerantphosphate-solubilizingbacterium *Brevibacillus* sp. BISR-HY65 isolated fromphosphate mines**. *Biocatalysisand Agricultural Biotechnology*, v.2, p.217–225, 2013.

YU, X.; LIU, X.; ZHU, T.H.; LIU, G.H.; MAO, C. **Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization**. *Biol Fertil Soils*, V. 47, P.437–446, 2011.

ZHANG, D.X., NAGABHYRU, P., SCHARDL, C.L. **Regulation of a chemical defense against herbivory produced by symbiotic fungi in grass plants**. *Plant Physiology*, v. 150, n.2, p.1072-1082, 2009.