



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

ISSN 1679-0154

Dezembro, 2008

## ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 04***

### **Microrganismos solubilizadores de fosfato isolados da rizosfera de genótipos de milho em plantio direto e convencional**

Christiane A. Oliveira  
Eliane Aparecida Gomes  
Ivanildo Evódio Marriel  
Ubiraci Gomes de Paula Lana  
Newton Portilho Carneiro  
Claudia Teixeira Guimarães  
Robert Eugene Schaffert  
Vera Maria Carvalho Alves

Sete Lagoas, MG  
2008

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Milho e Sorgo**

Rod. MG 424 Km 45 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Caixa Postal 151

Fone: (31) 3027 1100

Fax: (31) 3027 1188

Home page: [www.cnpms.embrapa.br](http://www.cnpms.embrapa.br)

E-mai: [sac@cnpms.embrapa.br](mailto:sac@cnpms.embrapa.br)

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: Antônio Carlos de Oliveira

Secretário-Executivo: Paulo César Magalhães

Membros: Carlos Roberto Casela, Flávia França Teixeira, Camilo

de Lelis Teixeira de Andrade, José Hamilton Ramalho, Jurandir

Vieira Magalhães

Supervisor editorial: Clenio Araujo

Revisor de texto: Clenio Araujo

Normalização bibliográfica: Maria Tereza Rocha Ferreira

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

**1ª edição**

1ª impressão (2008): 200 exemplares

**Todos os direitos reservados.**

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

# Sumário

Resumo .....	5
Introdução .....	6
Material e Métodos .....	8
Resultados .....	14
Discussão .....	21
Referências Bibliográficas .....	24

# Microrganismos solubilizadores de fosfato isolados da rizosfera de genótipos de milho em plantio direto e convencional

---

*Christiane A. Oliveira<sup>1</sup>*  
*Eliane Aparecida Gomes<sup>2\*</sup>*  
*Ivanildo Evódio Marrie<sup>2</sup>*  
*Ubiraci Gomes de Paula Lana<sup>2</sup>*  
*Newton Portilho Carneiro<sup>2</sup>*  
*Claudia Teixeira Guimarães<sup>2</sup>*  
*Robert Eugene Schaffert<sup>2</sup>*  
*Vera Maria Carvalho Alves<sup>2</sup>*

## Resumo

Microrganismos do solo são capazes de transformar o fósforo (P) de fontes indisponíveis em fontes solúveis, contribuindo para a nutrição das plantas como microrganismos promotores do crescimento das plantas. Este trabalho teve como objetivo isolar, selecionar e avaliar a atividade solubilizadora de microrganismos da rizosfera de milho, objetivando o uso destes isolados em futuras aplicações como bioinoculantes. Foram isoladas 371 colônias de microrganismos da rizosfera de milho cultivado em um latossolo com deficiência de P. Destes microrganismos, 45 foram selecionados com base no maior potencial de solubilização em meio de cultura líquido contendo como fontes orgânicas fosfato, fitato de sódio e lecitina de

---

<sup>1</sup>UNIFEMM - Centro Universitário de Sete Lagoas. Av. Marechal Castelo Branco, 2765, Santo Antônio, 35701-242, Sete Lagoas, MG.

<sup>2</sup>Pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, 35701-970, Sete Lagoas, MG. \*E.A. Gomes (autor correspondente): eliane@cnpmc.embrapa.br

soja e como fontes inorgânicas fosfato de alumínio ( $\text{AlPO}_4$ ) e fosfato de cálcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ).

Os isolados foram identificados utilizando-se a sequência de nucleotídeos da subunidade 16S do DNA ribossomal (rDNA) para bactérias, incluindo actinobactérias e a região ITS do rDNA para os fungos. A maior solubilização de P foi observada entre as bactérias em meio de fosfato de cálcio, sendo os isolados B17 e B5, identificados como *Bacillus* e *Burkholderia*, respectivamente, os mais eficientes, liberando 67% (B17) e 58,5% (B5) do fósforo total após 10 dias de crescimento. Estas bactérias foram isoladas da rizosfera da linhagem L3, eficiente para absorção de fósforo, cultivada sob estresse de P. Os fungos foram os maiores solubilizadores em meio de fosfato de alumínio, fitato e lecitina. A maior diversidade de microrganismos solubilizadores de fosfato foi encontrada na rizosfera de genótipos de milho eficientes no uso de fósforo, indicando que a eficiência destes cultivares pode ser explicada, em parte, pela interação com estes microrganismos.

**Termos para indexação:** microrganismos solubilizadores de fosfato, mineralização e solubilização de fósforo, rizosfera, *Zea mays*

## Introdução

Dois fatores limitantes da expansão agrícola no Cerrado são a toxidez de alumínio e a alta capacidade de fixação de fósforo (P), resultando em uma baixa disponibilidade deste nutriente para as plantas (Novais e Smyth, 1999). O P total do solo pode estar na forma orgânica ou inorgânica, sendo que o fósforo orgânico pode contribuir com até 50% da composição total de P nos solos, principalmente em sistema de plantio

direto (Bayer et al., 2001; Gyaneshwar et al., 2002). O P de origem orgânica ocorre principalmente na forma indisponível de fosfato inositol (fitato) e outras como fosfomonoésteres, fosfolipídios, ácidos nucleicos e fosfotriésteres (Gyaneshwar et al., 2002), podendo se tornar disponível pela mineralização por enzimas fosfatases liberadas pelas raízes e pelos microrganismos. Fósforo inorgânico, na forma de ânions fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), pode ser imobilizado no solo pela precipitação com cátions, tais como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$ , ou adsorvido aos óxidos de ferro e de alumínio, silicatos de alumínio e carbonatos de cálcio, dependendo das propriedades do solo (Marschner et al., 2006).

O uso crescente de fertilizantes fosfatados para corrigir o problema da baixa disponibilidade de fósforo tem um forte impacto econômico e ambiental, uma vez que os processos químicos para a produção destes fertilizantes são de custo elevado em termos energéticos, além de utilizarem fontes não-renováveis e finitas de energia. Além disso, devido à alta capacidade de fixação de P nestes solos, são necessárias altas dosagens de adubos fosfatados para obtenção de alta produtividade, implicando em aumento dos custos para o produtor rural. De modo global, se persistir a atual quantidade de fertilizante utilizada as fontes de fosfato de rocha serão esgotadas nos próximos 60 a 90 anos (Graham e Vance, 2003).

Os microrganismos são componentes importantes no sistema solo-planta, onde estão envolvidos em uma rede de interações que afetam o desenvolvimento das plantas (Wakelin et al., 2004; Barea et al., 2005; Vassilev et al., 2006). Os microrganismos podem solubilizar e mineralizar fósforo de fontes inorgânicas e orgânicas, respectivamente, e podem ser usados como inoculantes visando um aumento da disponibilidade de

P para as plantas (Kucey et al., 1989; Richardson, 1994; 2001; Illmer et al., 1995; Whitelaw et al., 1999). Este trabalho pode contribuir no desenvolvimento de técnicas de manejo da comunidade microbiana do solo e também na seleção de microrganismos com potencial para serem usados como inoculantes ou como biofertilizantes (Wu et al., 2005; Vassilev et al., 2006; El-Tarabily et al., 2008; Hamed et al., 2008; Nishanth e Biswas, 2008). Os resultados obtidos podem ter um impacto significativo em mais de seis milhões de hectares de milho cultivados no sistema de plantio direto no Brasil, além da possibilidade de utilização dos microrganismos solubilizadores de fosfato (MSP) no bioprocessamento de fosfato de rocha (Vassilev e Vassileva, 2003; Reyes et al., 2006; Achal et al., 2007; Xiao et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi isolar e avaliar o potencial de solubilização e de mineralização de fosfato de microrganismos da rizosfera de genótipos de milho cultivados em plantio convencional e em sistema de plantio direto em solos de Cerrado. Além disso, foi também avaliado um novo método de selecionar MSP usando o extrator de fosfato P-Mehlich1.

## **Material e Métodos**

### *Amostras de solos*

Amostras de solos foram coletadas da rizosfera de quatro genótipos de milho contrastantes para eficiência do uso de fósforo: BRS3060 – híbrido eficiente; HS26x1113 – híbrido ineficiente; L3 – linhagem eficiente; e L22 – linhagem ineficiente, desenvolvidos pelo Programa de Melhoramento de Milho da Embrapa Milho e Sorgo (Parentoni et al., 2000) em Sete Lagoas-MG, Brasil. Estes genótipos foram cultivados em

sistemas de plantio convencional e em plantio direto. Os solos do sistema de plantio convencional foram caracterizados com baixo P ( $3 \text{ mg dm}^{-3}$ ), textura de argila com pH 5,2 (solo:água, 1:2,5 [m/v]), com 3% de matéria orgânica e 0,25, 2,29 e 0,36  $\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$  de Al, Ca e Mg, respectivamente, em uma extração com KCl  $1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $0,16 \text{ mg K cm}^{-3}$  em um extrator Mehlich1 (Mehlich, 1978).

Amostras de solos de plantio direto foram coletadas em oito localizações com 13 - 15 anos de plantio direto. As descrições de cada amostra estão na Tabela 1, incluindo a localização e as culturas em rotação com o milho. As amostras foram retiradas de cada genótipo e sistema de cultivo, 60 dias após o plantio, no estágio de florescimento. Foram coletadas aleatoriamente cinco plantas com o sistema radicular inteiro e, no laboratório, as raízes foram cuidadosamente separadas do solo e secas ao ar, sendo o solo aderido às raízes considerado como rizosférico.

**Tabela 1.** Descrição das amostras da rizosfera coletadas de milho cultivado em oxissolo, sistema de produção, número de microrganismos (fungos, bactérias e actinobactérias) isolados das amostras de solo e fontes de P insolúvel utilizadas; fosfato de cálcio (P-Ca), fosfato de alumínio (P-Al), fitato de sódio (P-fitato) e lecitina de soja (P-lecitina)

Amostra	Cidade/Estado	Sistema de produção <sup>a</sup>	Microrganismos isolados de P inorgânico <sup>b</sup>		Microrganismos isolados de P orgânico <sup>b</sup>	
			P-Ca	P-Al	P-fitato	P-lecitina
L3	Sete Lagoas-MG	PC/milho	34 (14)	13 (7)	-	-
L22	Sete Lagoas-MG	PC/ milho	23 (6)	18 (4)	-	-
BRS3060	Sete Lagoas-MG	PC/ milho	28 (9)	8 (4)	-	-
HS26x1113	Sete Lagoas-MG	PC/ milho	21 (7)	17 (6)	-	-
CNPMS	Sete Lagoas-MG	PD/milho	-	-	2 (1)	21 (6)
JSP	Jardinópolis-SP	PD/ milho	-	-	6 (0)	25 (3)
CNPS	Londrina-PR	PD/ milho	-	-	3 (1)	10 (0)
MGO	Morrinhos-GO	PD/milho (soja)	-	-	9 (3)	22 (7)
PGO	Planaltina-GO	PD/ milho (Pastagem/ soja)	-	-	9 (1)	20 (0)
GRGO	Rio Verde-GO	PD/milho (Pastagem)	-	-	13 (3)	15 (0)
SCRGO	Rio Verde-GO	PD/milho (cana-de-açúcar)	-	-	14 (10)	11 (3)
SMRGO	Rio Verde-GO	EP/PD/ milho	-	-	7 (0)	22 (5)
<b>Total</b>			<b>106 (36)</b>	<b>56 (21)</b>	<b>63 (19)</b>	<b>146 (24)</b>

<sup>a</sup> Sistema de produção: PC, Plantio convencional; PD, plantio direto; EP, esterco de porco. Em parênteses, a cultura crescida em rotação com o milho

<sup>b</sup> Número total de isolados obtidos em cada meio de cultura sólido (número em parênteses representa o número de isolados com atividade de solubilização de P em 10 dias de crescimento em meio de cultura líquido)

### *Isolamento de microrganismos solubilizadores de P*

Amostras de solo rizosférico das plantas de milho cultivadas em solos com baixo P, em sistema convencional, foram diluídas em série e inoculadas em meio de cultura Pikovskaya ágar modificado (Pikovskaya, 1948) contendo as formas insolúveis de P,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  e  $\text{AlPO}_4$ . As amostras de solo coletadas no sistema de plantio direto foram inoculadas no mesmo meio de cultura contendo as formas orgânicas de P, fitato de sódio e

lecitina de soja. Os compostos P-Ca, P-Al, P-fitato e P-lecitina foram adicionados ao meio Pikovskaya sólido nas concentrações de 5, 3,5, 10 e 15 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. As placas de Petri foram incubadas em temperatura ambiente por 10 dias. As colônias morfológicamente distintas, apresentando halos ou não, foram isoladas por repetidos subcultivos, mantidas em meio batata dextrose e incubadas em temperatura ambiente. Os isolados foram agrupados em fungos filamentosos, actinobactéria ou bactéria com base em observações macro e microscópicas.

#### *Seleção de isolados eficientes na solubilização de fósforo*

Um experimento preliminar foi conduzido com a finalidade de avaliar a capacidade dos isolados de produzir fosfato solúvel em meio de cultura líquido. Três frascos contendo meio de cultura líquido Pikovskaya modificado foram inoculados, separadamente, com discos de micélio de 8mm de fungos e actinobactérias e suspensão bacteriana (10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup>) obtidos de culturas crescidas por 10 dias. Fontes insolúveis de P, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, AlPO<sub>4</sub>, fitato de sódio e lecitina de soja foram adicionadas ao meio nas concentrações de 1,5 g L<sup>-1</sup> (300 mg L<sup>-1</sup> de P), 1 g L<sup>-1</sup> (250 mg L<sup>-1</sup> de P), 1 g L<sup>-1</sup> (280 mg L<sup>-1</sup> de P) e 15 g L<sup>-1</sup> (101,1 mg L<sup>-1</sup> de P), respectivamente. Três repetições do controle, sem inoculação, foram incluídas em cada experimento, cada uma contendo uma fonte insolúvel de P. O pH inicial foi ajustado para 6,0. Depois de 10 dias de incubação a 27°C com agitação, as culturas foram centrifugadas (7.000 x g, 10min) e uma alíquota de 5mL do sobrenadante foi filtrada em papel filtro Whatman nº42 para remover os exsudatos mais espessos de polissacarídeos. A concentração de P solúvel no filtrado foi analisada utilizando o método colorimétrico de Murphy e Riley (1962), subtraindo o P solúvel da amostra

inoculada do controle não inoculado (i.e. o fósforo liberado pela autoclavagem da suspensão de P).

*Avaliação da solubilização de fosfato, pH e atividade de fosfatase*

Os 45 melhores isolados na solubilização de P, selecionados a partir do experimento preliminar, foram inoculados novamente em meio de cultura líquido de Pikovskaya e a capacidade de solubilização de P foi novamente avaliada, como descrito acima. O pH, a produção de fosfatase e a atividade solubilizadora de P com o extrator P-Mehlich1 foram avaliados. O pH da solução foi medido após 10 dias e a atividade de fosfatase de alíquotas de 150  $\mu\text{L}$  foi analisada de acordo com o protocolo modificado de Freitas et al. (1997). As alíquotas de cada amostra foram adicionadas a 0,48mL de tampão universal 0,1mol L<sup>-1</sup>, pH 6,5 ou pH 11 para determinação da atividade de fosfatase ácida ou alcalina, respectivamente, e 0,12mL de 0,05 mol L<sup>-1</sup> de solução de fosfato de p-Nitrophenil (pNPP), seguido de uma hora de incubação a 37°C. Tratamentos controle contendo somente meio líquido foram incluídos em cada experimento com pNPP adicionado depois da incubação. A cor amarela foi medida a 410nm (Tabatai e Bremmer, 1969) em um espectrofotômetro modelo LAMBDA Bio (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA).

Os efeitos dos tratamentos foram analisados por ANOVA e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância.

*Atividade solubilizadora usando P-Mehlich1 – Fósforo incorporado na matriz orgânica de polissacarídeos*

Um experimento simultâneo foi conduzido utilizando as mesmas amostras dos quatro experimentos citados acima para

determinar a quantidade de fósforo incorporada na matriz orgânica de polissacarídeos formada durante o crescimento da cultura. Depois de 10 dias de incubação, alíquotas de 10  $\mu$ L foram incubadas por 24h com 100mL de extracto P-Mehlich1 (HCl 0,05mol L<sup>-1</sup> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,012 mol L<sup>-1</sup>), referido como método de extração de “duplo ácido” (Mehlich, 1978). Depois da incubação, alíquotas de 5mL do sobrenadante foram centrifugadas, filtradas e o teor de P solúvel foi analisado usando o método de Murphy e Riley (1962). A quantidade de P solubilizado (P-Mehlich1) foi obtida subtraindo a concentração de P solúvel da amostra inoculada do controle não inoculado.

Fatorial ANOVA foi usada para analisar os efeitos dos tratamentos e dos métodos de determinação de fósforo e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância.

#### *Identificação dos isolados*

Os 45 isolados mais eficientes na solubilização de P-fitato, P-lecitina, P-Ca e P-Al foram identificados baseados na sequência de nucleotídeos da região ITS do rDNA de fungos e de 16S rDNA para bactérias, incluindo actinobactérias. O DNA total foi extraído usando o kit BIO 101 (FastDNA SPIN Kit, Bio 101 Inc., Vista, CA, USA) de culturas crescidas em meio líquido batata-dextrose depois de 10 dias de crescimento à temperatura ambiente sem agitação. Os fragmentos de rDNA foram amplificados usando os primers universais para fungos ITS1 e ITS4 ou ITS2 e ITS5 (White et al., 1990) e os fragmentos 16S rDNA de bactérias e actinobactérias foram amplificados usando os primers F968 e R1401 (Nubel et al., 1996).

Os produtos da amplificação foram purificados usando o kit "QIAquick Gel Extraction", de acordo com a recomendação dos fabricantes (Qiagen, Hilden, Alemanha) e sequenciados usando kit "Big Dye Terminator v3.1. Cycle Sequencing" (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As amostras foram analisadas no sequenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) e as sequências de nucleotídeos obtidas foram editadas e comparadas com sequências depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o programa Blast N (Altschul et al., 1997).

## Resultados

### *Isolamento de microrganismos solubilizadores de P e análise da solubilização de fontes de P orgânicas e inorgânicas*

Trezentos e setenta e um morfotipos (116 fungos e 255 bactérias, das quais 126 eram actinobactérias) foram isolados da rizosfera de plantas de milho cultivadas em um latossolo do bioma Cerrado nos sistemas de plantio convencional e plantio direto (Tabela 1). Um total de 36 isolados no meio com P-Ca solubilizaram mais que 80mg L<sup>-1</sup> de P (30% do P total, em 10 dias e, destes, 14 (39%) foram isolados da linhagem P eficiente, L3.

Neste estudo, 63 colônias foram avaliadas no meio P-fitato e, destas, 19 apresentaram atividade de solubilização de P após 10 dias de incubação, sendo que 10 destas colônias (53%) foram isoladas de solos coletados de milho em plantio direto cujo plantio anterior era cana-de-açúcar (SCRGO) (Tabela 1). O número de isolados solubilizadores de P-lecitina variou entre as

amostras, sendo que o maior número de isolados com atividade solubilizadora foi obtido do plantio direto milho-soja (MGO) (Tabela 1).

*Identificação e avaliação de isolados com atividade de solubilização de fosfato, pH e atividade de fosfatase*

Um total de 45 isolados eficientes na solubilização de P, selecionados em meio de cultura líquido, foram identificados molecularmente pela comparação das sequências de rDNA com sequências depositadas no GenBank (Tabelas 2-5). A identificação morfológica confirmou a maioria dos gêneros e espécies identificados por técnicas moleculares.

Os isolados de bactérias, fungos e a maioria das actinobactérias (Tabelas 2-5) foram confirmados como MSP com alta taxa de solubilização de P, sendo o gênero *Kitasatospora* de actinobactérias (Tabela 5) identificado como um novo MSP. Entre as bactérias, os isolados identificados como *Bacillus* sp. (B17) e *Burkholderia* sp. (B5) foram os mais eficientes solubilizadores de P-Ca (Tabela 2), solubilizando 67% a 58,5% do P total, respectivamente. No isolado B5, foi observada a maior redução no pH do meio de crescimento, chegando a 4,46. A actinobactéria mais eficiente na solubilização de P-Ca foi o isolado A4, identificado como *Streptomyces platensis* (Tabela 2), de acordo com os critérios moleculares e morfológicos.

Os isolados mais eficientes na solubilização de P-AI foram B58 (*Burkholderia cepacia*) e F39 e F50 (*Aspergillus terreus*), obtidos dos genótipos de milho ineficientes no uso de P, L22 e HS26x1113 (Tabela 3). Não foi encontrada nenhuma correlação entre pH e solubilização de P-AI ( $R = -0,001$ ;  $P < 0,001$ ).

**Tabela 2.** Identificação molecular, quantidade de P solubilizado e atividade de fosfatase de microrganismos isolados da rizosfera de milho cultivados em meio de cultura líquido contendo fosfato de cálcio (P-Ca) como fonte inorgânica de P

Isolado (Amostra) <sup>a</sup>	Identificação molecular Espécie (número de acesso no GenBank) – Índice de similaridade	Quantidade de P solubilizado (mg L <sup>-1</sup> de P) <sup>b*</sup>		Atividade de fosfatase (µg pNPP mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) <sup>*</sup>	
		Método Convencional <sup>c</sup>	Método P- Mehlich1 <sup>d</sup>	Ácida	Alcalina
A4 (L3)	<i>Streptomyces platensis</i> (AB163439.1) - 99%	68,0 A abc	39,8 A ab	1,88 a	0,59 a
A14 (L3)	<i>S. tumescens</i> (AF346485.1) - 99%	43,1 A abc	29,6 A ab	0	1,89 a
A19 (L22)	<i>S. chartreusis</i> (SCH399468) - 99%	23,5 A abc	37,3 A ab	0	0
A20 (L22)	<i>S. griseochromogenes</i> (SGR310923) - 98%	4,1 A ab	30,5 A ab	0	0
A26 (BRS3060)	<i>S. collinus</i> (SCO306623) - 99%	1,8 A a	9,4 A a	0	0
A29 (HS26x1113)	<i>S. avermitilis</i> (AB078897.2) - 98%	3,7 A ab	29,9 A ab	0	0
B2 (L3)	<i>Pantoea ananatis</i> (AF364846.1) - 99%	81,8 A c	179,9 B c	2,62 a	7,24 a
B5 (L3)	<i>Burkholderia</i> sp. (AY224513.1) - 97%	175,4 A d	167,2 A c	0	0
B7 (L22)	<i>Bacterium</i> H3 (AY345547.1) - 97%	77,1 A c	63,0 A ab	0	0
B17 (L3)	<i>Bacillus</i> sp. (AF507879) - 89%	200,0 A d	211,1 A c	0	6,15 a
B46 (BRS3060)	<i>Burkholderia cepacia</i> (AY268142.1)- 90%	70,6 A bc	54,9 A ab	0	18,71 a
B48 (HS26x1113)	<i>B. cepacia</i> (AY741360.1) - 96%	64,3 A abc	67,9 A b	0	70,98 b
F14 (BRS3060)	<i>Penicillium pinophilum</i> (AF176660) - 98%	25,9 A abc	8,9 A ab	0	0

\* Média seguida pela mesma letra não difere significativamente ao nível de 5% de significância no teste Tukey

<sup>a</sup> Identificação das amostras de acordo com a Tabela 1

<sup>b</sup> Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas, em cada linha, representam diferenças entre os isolados solubilizadores de P e letras minúsculas, em cada coluna, representam diferenças entre os métodos convencionais e o método P-Mehlich1

<sup>c</sup> Quantidade de P solubilizado pelo método de Murphy e Riley (1962) depois de 10 dias de crescimento em um meio de cultura líquido contendo 300mg P L<sup>-1</sup> de fosfato insolúvel

<sup>d</sup> Quantidade de P solubilizado extraído pelo método de P-Mehlich1 (Mehlich, 1978) depois de 10 dias de crescimento em um meio de cultura líquido contendo 300mg P L<sup>-1</sup> de fosfato insolúvel

**Tabela 3.** Identificação molecular, quantidade de P solubilizado e atividade de fosfatase de microrganismos isolados da rizosfera de milho cultivados em meio de cultura líquido contendo fosfato de alumínio (P-Al) como fonte inorgânica de P

Isolado (Amostra) <sup>a</sup>	Identificação molecular Espécie (número de acesso no GenBank) – Índice de similaridade	Quantidade de P solubilizado (mg L <sup>-1</sup> de P) <sup>b*</sup>		Atividade de fosfatase (μg pNPP mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) <sup>*</sup>	
		Método Convencional <sup>c</sup>	Método P- Mehlich1 <sup>d</sup>	Ácida	Alcalina
B52 (L3)	<i>Pantoea ananatis</i> (AF364846.1) - 96%	10,3 A b	10,8 A a	3,57 a	19,5 a
B53 (L3)	<i>Pantoea agglomerans</i> (AY924376.1) - 89%	13,3 A b	14,6 A ab	0,36 a	50,1 b
B56 (L22)	<i>Paenibacillus elgii</i> (AY090110.1) - 98%	0,03 A a	16,0 B ab	0	53,1 b
B58 (L22)	<i>Burkholderia cepacia</i> (F3AY509957.1) - 95%	20,3 A c	38,4 B c	0	64,8 b
F39 (HS26x1113, L22)	<i>Aspergillus terreus</i> (AY373871.1) - 98%	14,9 A bc	16,3 A ab	48,1 b	0
F40 (L22)	<i>Penicillium pimateouiense</i> (AF037436.1) - 96%	12,1 A b	20,8 B b	57,9 b	0
F50 (HS26x1113)	<i>A. terreus</i> (AJ413985.1) - 95%	13,7 A bc	18,3 A ab	50,2 b	0

\* Média seguida pela mesma letra não difere significativamente ao nível de 5% de significância no teste Tukey

<sup>a</sup> Identificação das amostras de acordo com a Tabela 1

<sup>b</sup> Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas, em cada linha, representam diferenças entre os isolados solubilizadores de P e letras minúsculas, em cada coluna, representam diferenças entre os métodos convencionais e o método P-Mehlich1

<sup>c</sup> Quantidade de P solubilizado pelo método de Murphy e Riley (1962) depois de 10 dias de crescimento em um meio de cultura líquido contendo 250mg P L<sup>-1</sup> de fosfato insolúvel

<sup>d</sup> Quantidade de P solubilizado extraído pelo método de P-Mehlich1 (Mehlich, 1978) depois de 10 dias de crescimento em um meio de cultura líquido contendo 250mg P L<sup>-1</sup> de fosfato insolúvel

A mineralização de P-fitato, em geral, não reduziu o pH do meio (Tabela 4). As espécies *Talaromyces rotundus* (F80, F102 e F105), *A. terreus* (F79) e *B. cepacia* (B116) foram as mais eficientes na mineralização de P e o isolado F102 de *T. rotundus* produziu os níveis mais altos de fosfatase.

Entre os microrganismos capazes de mineralizar P-lecitina, *Penicillium citrinum* (F95) e *A. terreus* (F93) foram os mais eficientes, solubilizando 44% e 42% do P total, respectivamente, sendo os três maiores produtores de fosfatase ácida (Tabela 5).

#### *Quantificação da solubilização de P pelo método P-Mehlich1*

A capacidade dos microrganismos de solubilizar P foi também avaliada em meio líquido usando P-Mehlich1 como extrator (Mehlich, 1978). A quantidade de P solubilizado variou significativamente entre os métodos, com e sem extrator e entre os isolados (Tabelas 2-5). Em geral, os valores de P solúvel pelo método P-Mehlich1 para fungos, actinobactérias e bactérias foram maiores que os valores do método convencional de leitura direta sem extração, descrito por Murphy e Riley (1962). Uma grande quantidade de compostos semelhantes a polissacarídeos foi observada em alguns dos meios de crescimento de bactérias e fungos que podem ter funcionado como uma matriz orgânica, adsorvendo o P liberado pelos microrganismos no meio de cultura.

**Tabela 4.** Identificação molecular, quantidade de P solubilizado e atividade de fosfatase de microrganismos isolados da rizosfera de milho cultivados em meio de cultura líquida contendo fitato de sódio (P-fitato) como fonte orgânica de P

Isolado (Amostra) <sup>a</sup>	Identificação molecular Espécie (número de acesso no GenBank) – Índice de similaridade	Quantidade de P solubilizado (mg P L <sup>-1</sup> ) <sup>b*</sup>		Atividade de fosfatase ( $\mu$ g pNPP mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) *	
		Método Convencional <sup>c</sup>	Método P- Mehlich1 <sup>d</sup>	Ácida	Alcalina
B116 (MGO)	<i>Burkholderia cepacia</i> (AY741355.1) - 98%	52,7 A de	92,8 B f	0	9,7 a
B118 (MGO)	<i>Arthrobacter</i> sp. (AF408967.1) - 99%	28,0 A abc	28,2 A ab	0	23,6 de
B119 (PGO)	<i>Bacillus megaterium</i> (AY167865.1) - 98%	19,5 A ab	37,3 B bc	46,4 bc	21,6 cd
B121 (GRGO)	Uncultured gamma prokaryote (AJ575715.1) - 94%	4,9 A a	1,5 A a	0	20,9 cd
B122 (GRGO)	<i>Pantoea agglomerans</i> (AY924376.1) - 90%	25,5 A abc	24,9 A ab	0	31,9 e
B124 (GRGO)	<i>Arthrobacter</i> sp. (AF408952.1) - 99%	30,5 A bcd	31,4 A b	0	20,7 bcd
F79 (SCRGO)	<i>Aspergillus terreus</i> (ATE413985) - 96%	46,5 A cde	9,1 A cd	26,4 ab	10,8 a
F80 (SCRGO)	<i>Talaromyces rotundus</i> (AF285115) - 96%	57,5 A e	67,6 A e	12,4 a	13,4 abc
F102 (SCRGO)	<i>T. rotundus</i> (AF285115) - 97%	48,6 A cde	54,2 A cde	62,6 c	12,0 a
F105 (SCRGO)	<i>T. rotundus</i> (AF285115) - 96%	47,4 A cde	60,3 B de	45,4 bc	12,2 ab

\* Média seguida pela mesma letra não difere significativamente ao nível de 5% de significância no teste Tukey

<sup>a</sup> Identificação das amostras de acordo com a Tabela 1

<sup>b</sup> Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas, em cada linha, representam diferenças entre os isolados solubilizadores de P e letras minúsculas, em cada coluna, representam diferenças entre os métodos convencionais e o método P-Mehlich1

<sup>c</sup> Quantidade de P solubilizado pelo método de Murphy e Riley (1962) depois de 10 dias de crescimento em um meio de cultura líquido contendo 280mg P L<sup>-1</sup> de fosfato insolúvel

<sup>d</sup> Quantidade de P solubilizado extraído pelo método de P-Mehlich1 (Mehlich, 1978) depois de 10 dias de crescimento em um meio de cultura líquido contendo 280mg P L<sup>-1</sup> de fosfato insolúvel.

**Tabela 5.** Identificação molecular, quantidade de P solubilizado e atividade de fosfatase de microrganismos isolados da rizosfera de milho cultivados em meio de cultura líquida contendo lecitina de soja (P-lecitina) como fonte orgânica de P

Isolado (Amostra) <sup>a</sup>	Identificação molecular Espécie (número de acesso no GenBank) – Índice de similaridade	Quantidade de P solubilizado (mg P L <sup>-1</sup> ) <sup>b*</sup>		Atividade de fosfatase ( $\mu\text{g pNPP mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) <sup>*</sup>	
		Método Convencional <sup>c</sup>	Método P- Mehlich1 <sup>d</sup>	Ácida	Alcalina
A62 (CNPMS)	<i>Kitasatospora putterlickiae</i> (AY189976.1) - 98%	14,9 A ab	13,2 A ab	76,1 cde	0
A65 (CNPMS)	<i>K. paracochleatus</i> (U93328) - 99%	17,4 A ab	24,9 A bc	67,1 cde	0
A68 (JSP)	<i>Streptomyces ipomoeae</i> (AY207593.1) - 98%	19,0 A abc	22,4 A bc	53,9 abcd	0
A80 (MGO)	<i>S. hygrosopicus</i> (SH16SRR) - 98%	2,1 A a	24,4 B bc	66,1 bcde	0
A83 (MGO)	<i>S. hygrosopicus</i> (SH16SRR) - 98%	3,4 A a	34,3 B c	64,6 bcde	0
B62 (CNPMS)	<i>Arthrobacter</i> sp. (AF408967.1) - 99%	2,1 a	0	5,1 ab	0,7 a
B65 (JSP)	<i>Methylobacterium</i> sp. (D32232.1) - 98%	0	36,5 c	1,1 a	0,7 a
B70 (MGO)	<i>Arthrobacter</i> sp. (AF408967.1) - 99%	0,6 A a	15,5 B ab	16,4 abc	8,2 b
B76 (SMRGO)	Uncultured bacterium (P reactor) (AF527601.1) - 96%	0	24,8 bc	0	8,1 b
B86 (JSP)	<i>Arthrobacter</i> sp. (AY177350.3) - 97%	0,9 A a	24,4 B bc	26,0 abc	4,2 ab
B104 (SCRGO)	Uncultured <i>Bacillus</i> sp. (AY242537.1) - 93%	6,7 A ab	7,1 A ab	4,9 ab	7,9 b
F87 (MGO)	<i>Acremonium strictum</i> (AY138846.1) - 93%	29,8A bcd	23,8 A bc	77,5 cde	19,4 c
F93 (SCRGO)	<i>Aspergillus terreus</i> (AF516138.1) - 98%	42,9 B cd	24,7 A bc	0	0
F94 (SCRGO)	<i>Talaromyces rotundus</i> (AF285115) - 95%	24,0 A abcd	20,3 A bc	117,6 e	0,8 a
F95 (SCRGO)	<i>Penicillium citrinum</i> (AY373904.1) - 99%	44,0 B d	20,2 A bc	95,8 de	0

\* Média seguida pela mesma letra não difere significativamente ao nível de 5% de significância no teste Tukey

<sup>a</sup> Identificação das amostras de acordo com a Tabela 1

<sup>b</sup> Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas, em cada linha, representam diferenças entre os isolados solubilizadores de P e letras minúsculas, em cada coluna, representam diferenças entre os métodos convencionais e o método P-Mehlich 1

<sup>c</sup> Quantidade de P solubilizado pelo método de Murphy e Riley (1962) depois de 10 dias de crescimento em um meio de cultura líquido contendo 101,1mg P L<sup>-1</sup> de fosfato insolúvel

<sup>d</sup> Quantidade de P solubilizado extraído pelo método de pelo método P-Mehlich 1 (Mehlich, 1978), depois de 10 dias de crescimento em um meio de cultura líquido contendo 101,1mg P L<sup>-1</sup> de fosfato insolúvel

## Discussão

A frequência de isolados variou entre os genótipos de milho avaliados (Tabela 1). Um maior número de microrganismos foi isolado da rizosfera dos genótipos de milho L3 e BRS3060, considerados eficientes no uso de P pelo Programa de Melhoramento de Milho da Embrapa Milho e Sorgo (Parentoni et al., 2000). Os microrganismos mais eficientes na solubilização de P-Ca, identificados como *Bacillus* sp. (B17), *Burkholderia* sp. (B5) e *Streptomyces platensis* (A4), foram isolados da rizosfera da linhagem L3. Este resultado suporta a hipótese de que os microrganismos podem contribuir para a eficiência destes genótipos na aquisição de P do solo. Vários estudos indicam que a presença de diferentes espécies de plantas ou de genótipos influencia a comunidade microbiana devido à resposta diferencial dos microrganismos a diferentes padrões de sinalização e de exsudação das raízes, especialmente quando as plantas estão sob estresse ambiental (Lynch and Whipps, 1990; Richardson, 1994), como por exemplo estresse de fósforo (Hinsinger, 2001).

As taxas de solubilização de P-Al foram menores que as taxas de solubilização de P-Ca (Tabela 3), como encontrado por Narsian et al. (1994) testando 8 microrganismos em meios de P-Al e P-Ca, por Whitelaw et al. (1999) e por Barroso e Nahas (2005). Alguns autores têm observado que o fósforo liberado das argilas minerais com  $\text{AlPO}_4$  pode aumentar os níveis de  $\text{Al}^{3+}$  tóxicos na solução (Illmer et al., 1995), o que pode, possivelmente, explicar a supressão da atividade de solubilização dos MSP observada no meio P-Al.

Neste estudo, os fungos foram os mais eficientes na liberação de fósforo de P-fitato. Vários autores têm relatado resultados

similares, afirmando que *Aspergillus* é o gênero mais eficiente na solubilização de fitato (Yadav e Tarafdar, 2003). Neste estudo, *A. terreus* foi também capaz de solubilizar P de fosfato de alumínio, fitato e lecitina (Tabelas 3-5). Um isolado de *Talaromyces* (F102) produzindo níveis elevados de fosfatase ácida nos meios de fitato (Tabela 4) e de lecitina (Tabela 5) foi isolado neste estudo e é o primeiro relato de um microrganismo deste gênero com potencial de mineralização de fontes orgânicas de P. A capacidade de microrganismos do solo de solubilizar diferentes fontes de fosfato inorgânico é bem documentada na literatura (Kucey et al., 1989; Richardson, 1994; Whitelaw et al., 1999; Goldstein et al., 2003). No entanto, existem poucos relatos sobre a mineralização de P a partir de fontes orgânicas como fitato.

As bactérias *Pantoea agglomerans* e *Burkholderia* sp. produziram fosfatase e mineralizaram fitato (Tabela 4). De acordo com Nacamulli et al. (1997), *B. cepacia* representa uma espécie predominante na rizosfera de milho. Embora este seja o primeiro relato de isolamento de *B. cepacia* com a capacidade de solubilizar fontes indisponíveis de P em milho, vários estudos mostram que esta bactéria é capaz de competir com a microflora indígena do solo, sobreviver, colonizar as raízes de várias cultivares de milho (Nacamulli et al., 1997; Bevivino et al., 2000), aumentar a produção de outras culturas (Rodrigues e Fraga, 1999; Baldani et al., 2001), além de antagonizar e reprimir os principais patógenos de milho do solo (Bevivino et al., 2000). Os mecanismos envolvidos no aumento da disponibilização de fósforo necessitam de estudos adicionais para que esta bactéria possa ser utilizada como biofertilizante em sistemas de produção de milho.

Neste trabalho, foi observada uma variação significativa entre os métodos de determinação da solubilização de P, utilizando extrator P-Mehlich1, e o método convencional descrito por Murphy e Riley (1962) (Tabelas 2-5). Isto indica que a quantidade de P solubilizado produzida neste e em outros estudos pode ter sido subestimada e pode ter resultado no descarte de isolados com potencial de solubilização de P. Wakelin et al. (2004), estudando *Penicillium* isolado de raízes de trigo, relataram um nível menor de P na solução quando a produção de polissacarídeos foi alta. Ajustes adicionais na metodologia de extração de P precisam ser implementados objetivando uma melhoria dos métodos de determinação de quantificação de P solúvel produzidos por microrganismos solubilizadores de P.

Na comparação da eficiência relativa de diferentes microrganismos solubilizadores de P usando diferentes fontes insolúveis, foi observado que os mecanismos de solubilização e mobilização de P dependem da natureza da fonte de P e dos organismos envolvidos no processo. Estes microrganismos estão sendo mantidos em uma coleção biológica para pesquisas futuras e para aplicações biotecnológicas no desenvolvimento de sistemas de produção mais sustentáveis, sendo de interesse como potenciais inoculantes para melhorar a eficiência de aquisição de P do solo e das fontes de fertilizantes, especialmente fosfato de rocha.

### **Agradecimentos**

Este trabalho foi financiado pela Embrapa Milho e Sorgo e pela Fundação McKnight. C.A. Oliveira recebeu bolsa de doutorado do CNPq.

## Referências Bibliográficas

ACHAL, V., SAVANT, V.V., REDDY, M.S. Phosphate solubilization by a wild type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus tubingensis*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, p. 695–699, 2007

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**, v. 25, p. 3389-3402, 1997

BALDANI, V.L.D., BALDANI, J.I., DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, p. 485–491, 2001

BAREA, J.M., POZO, M.J., AZCÓN, R., AZCÓN-AGUILAR, C. Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p.1761–1778, 2005

BARROSO, C.B., NAHAS, E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. **Applied Soil Ecology**, v. 29, p.73–83, 2005

BAYER, C., MARTIN-NETO, L., MIELNICZUK, J., SANGOI, L. Changes in soil organic matter fractions under subtropical no-till cropping systems. **Soil Science Society of America Journal**, v. 65, p.1473-1478, 2001

BEVIVINO, A., DALMASTRI, C., TABACCHIONI, S., CHIARINI, L. Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 in disease suppression and growth promotion of maize. **Biology and Fertility of Soils**, v. 31, p. 225–231, 2000

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

FREITAS, J.R., BANERJEE, M.R., GERMIDA, J.J. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L). **Biology and Fertility of Soils**, v. 24, p. 358-364, 1997

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

GRAHAM, P.H; VANCE, C.P. Legumes: Importance and Constraints to Greater Use **Plant Physiology**, v. 131, p: 872-877, 2003

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

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

HINSINGER, P.. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. **Plant and Soil**, v. 237, p. 173-195, 2001

ILLMER, P., BARBATO, A., SCHINNER, F., 1995. Solubilization of hardly soluble  $AlPO_4$  with P-solubilizing microorganisms. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, p. 265–270, 1995

KUCEY, R.M.N., JANZEN, H.H., LEGGETT, M.E. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. **Advanced Agronomy**, v. 42, p. 199–228, 1989

LYNCH, J.M., WHIPPS, J.M. Substrate flow in the rhizosphere. **Plant and Soil**, v. 129, p. 1-10, 1990

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

MEHLICH, A. New extractant for soil test evaluation of phosphorus, potassium, magnesium, calcium, sodium, manganese, and zinc. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 9, p. 477-492, 1978

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

NACAMULLI, C., BEVIVINO, A., DALMASTRI, C., TABACCHIONI, S., CHIARINI, L. Perturbation of maize rhizosphere microflora following seed bacterization with *Burkholderia cepacia* MCI 7. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 23, p. 183–193, 1997

NARSIAN, V., THAKKAR, J., PATEL, H.H. Isolation and screening of phosphate solubilizing fungi. **Indian Journal of Microbiology**, v. 34, p.113-118, 1994

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

NOVAIS, R.F., SMYTH, T.J. **Fósforo em Solo e Planta em Condições Tropicais**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 399 pp. 1999

NUBEL, U., ENGELEN, B., FELSKE, A., SNAIDR, J., WIESHUBER, A., AMANN, R.I., LUDWIG, W., BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 5636–5643, 1996

PARENTONI, S.N., VASCONCELLOS, C. A., ALVES, V.M.C., PACHECO, C.A.P., SANTOS, M.X., GAMA, E.E.G., MEIRELLES, W.F., CORREA, L.A., PITTA, G.V.E., BAHIA FILHO, A.F.C., 2000. Eficiência na utilização de fósforo em genótipos de milho. In: **Anais do Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, 23, Uberlândia, Brasil, p.92

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

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

RICHARDSON, A.E. Soil **Microorganisms and Phosphorus Availability**. In: Pankhurst, C.E., Doulose, B.M., Gupta, V.V.S.R., Grace, P.R. (Eds.), *Soil Biota Management in Sustainable Farming System*, CSIRO, Australia, pp. 50–62. 1994

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

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

TABATAI, M.A., BREMMER, J.M. Use of pNitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 1, p. 301-307, 1969

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

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

- WAKELIN, S.A., WARREN, R.A., HARVEY, P.R., RYDER, M.H.P. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. **Biology and Fertility of Soils**, v. 40, p. 36-43, 2004
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.). **PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications**. Academic Press, San Diego, CA, 1990. p. 315–322
- WHITELAW, M.A., HARDEN, T.J., HELYAR, K.R. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, p. 655–665, 1999
- WU, S.C.; CAO, Z.H.; LI, Z.G.; CHEUNG, K.C.; WONG, M.H. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and L solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. **Geoderma**, v. 125, p.155-166, 2005
- XIAO, C.Q; CHI, R.A.; HUANGB, X.H., ZHANG, W.X., QIUA, G.Z., WANGA, D.Z. Optimization for rock phosphate solubilization by phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines. **Ecological Engineering**, v. 33, p. 187–193, 2008
- YADAV, R.S., TARAFDAR, J.C. Phytase and phosphatase producing fungi in arid and semi-arid soils and their efficiency in hydrolyzing different organic P compounds. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, p. 1–7, 2003