

ANDRÉ MARCOS MASSENSINI

**SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS MEDIADA POR MICRORGANISMOS DO
SOLO DE PLANTIO DE EUCALIPTO.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANDRÉ MARCOS MASSENSINI

**SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS MEDIADA POR MICRORGANISMOS DO
SOLO DE PLANTIO DE EUCALIPTO.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 17 de agosto de 2007.

Prof. Antônio Galvão do Nascimento

Prof. Olinto Liparini Pereira

Prof. Marcos Rogério Tótola
(Co-orientador)

Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Co-orientador)

Prof. Maurício Dutra Costa
(Orientador)

Aos meus pais e minha irmã.
Aos meus amigos.
À Grasi.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realizar o curso.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Maurício Dutra Costa, pela orientação, aprendizagem e amizade.

Aos professores e conselheiros, Maria Catarina Megumi Kasuya, Arnaldo Chaer Borges e Marcos Rogério Tótola, pelo apoio e amizade.

Aos professores Paulo Roberto Cecon e Hélio Garcia Leite, pela preciosa ajuda nas análises estatísticas.

Ao Departamento de Microbiologia, pelo suporte técnico.

A todos os meus amigos, pelas experiências que passamos juntos.

À estagiária Samantha, por toda ajuda e amizade durante a produção deste trabalho.

Aos meus companheiros de trabalho do Laboratório de Micorrizas, pela amizade e apoio.

Aos funcionários do “trailer da biologia”, Rita e Carlos, pela descontração nas horas do cafezinho.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, Nilcéa, Laura, Aparecida, Danilo, Antônio e Paulo pela disposição em me ajudar.

Aos meus pais e minha irmã pelo amor, carinho, amizade e incentivo em todas as etapas da minha vida.

BIOGRAFIA

André Marcos Massenssini, filho de Carlos André Massenssini e Maria Aparecida Becari Massenssini, nasceu em Visconde do Rio Branco, Minas Gerais, no dia 2 de maio de 1983. Em 2001, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em Ciências Biológicas em julho de 2005. Em agosto de 2005, iniciou o curso de mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15

CAPÍTULO I

SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO MEDIADA POR MICRORGANISMOS DO SOLO DE PLANTIO DE EUCALIPTO

RESUMO.....	21
1. INTRODUÇÃO	22
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1. Amostragem	27
2.2. Potencial de solubilização de diferentes fontes inorgânicas de fósforo em solo sob mata de eucalipto	30
2.3. Potencial de solubilização de diferentes fosfatos naturais em solo sob mata de eucalipto	31
2.4. Atividade de fosfomonoesterases ácida e alcalina em solo de área plantada com eucalipto	31
2.5. Análises estatísticas	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33

3.1. Potencial de solubilização de diferentes fontes inorgânicas de fósforo em solo sob mata de eucalipto	33
3.2. Potencial de solubilização de diferentes fosfatos naturais em solo sob mata de eucalipto	39
3.3. Atividade de fosfomonoesterases ácida e alcalina em solo de área plantada com eucalipto	42
3.4. Conclusões.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

CAPÍTULO II

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO DA RIZOSFERA DE EUCALIPTO

RESUMO.....	50
1. INTRODUÇÃO	52
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
2.1. Caracterização da área	56
2.2. Isolamento de bactérias solubilizadoras de fosfato de solo sob mata de eucalipto	57
2.3. Determinação do índice de solubilização (IS) de fosfato de cálcio	59
2.4. Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio, ferro e alumínio em ágar Glicose - Extrato de Levedura	59
2.5. Solubilização de fosfato de cálcio, ferro e alumínio em meio NBRIP.....	60
2.6. Crescimento de isolados solubilizadores de fosfato na presença de herbicidas	60
2.7. Solubilização de fosfato de cálcio, ferro e alumínio na presença de herbicidas	61
2.8. Análises estatísticas	62
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
3.1. Índice de solubilização (IS) de fosfato de cálcio.....	63
3.2. Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio, ferro e alumínio em ágar Glicose - Extrato de Levedura	66
3.3. Solubilização de fosfato de cálcio, ferro e alumínio em meio NBRIP.....	68
3.4. Crescimento de isolados solubilizadores de fosfato na presença de herbicidas	72
3.5. Solubilização de fosfato de cálcio, ferro e alumínio na presença de herbicidas	82
3.6. Conclusões.....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

RESUMO

MASSESSINI, André Marcos, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2007. **Solubilização de fosfatos mediada por microrganismos do solo sob plantio de eucalipto.** Orientador: Maurício Dutra Costa. Co-Orientadores: Arnaldo Chaer Borges e Marcos Rogério Tótola.

Objetivou-se neste trabalho avaliar o papel dos microrganismos do solo na solubilização de fontes insolúveis de fósforo, bem como a sensibilidade de bactérias solubilizadoras de fosfato a formulações comerciais de glyphosate. A atividade de fosfatases e o potencial de solubilização, em meio NBRIP líquido, dos fosfatos de cálcio, ferro e alumínio, e dos fosfatos naturais de Araxá e Catalão pela microbiota total do solo rizosférico de plantas do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* com diferentes diâmetros à altura do peito, oriundas de posições topográficas distintas, a saber, topo, encosta e baixada, foram avaliados *in vitro*. Procedeu-se também o isolamento de bactérias da rizosfera destas plantas e a sua caracterização quanto à capacidade de solubilização de fosfato de cálcio, por meio da determinação do índice de solubilização em meio sólido. O crescimento e a capacidade de

solubilização de fosfato dessas bactérias foram também avaliados em meio líquido, na presença das formulações comerciais Roundup Transorb[®], Roundup NA[®], Zapp QI[®] e Scout[®]. Os solos coletados de plantas do topo e da baixada apresentaram maior solubilização de fosfato de cálcio pela microbiota, enquanto o solo da encosta não apresentou diferenças entre as fontes inorgânicas testadas. O fosfato de Catalão foi a fonte natural mais solubilizada pela microbiota do solo. O pH final do meio de cultura correlacionou-se negativamente com os valores de fósforo solubilizado. A atividade das fosfatases ácida e alcalina foi maior nos solos rizosféricos de plantas do topo. Os isolados obtidos apresentaram diferenças quanto ao índice de solubilização (IS) de fosfato de cálcio, apresentando valores entre zero, relativo aos isolados que perderam a capacidade de solubilização, e 4,07. Também foram observadas diferenças entre os isolados quanto à sua capacidade de solubilização de fosfato em meio líquido. A presença de herbicidas no meio de cultura reduziu significativamente o crescimento de todos os isolados testados. Os isolados To 66 e To 3 foram os mais sensíveis à presença do herbicida Roundup Transorb[®]. Para o isolado To 66, a adição ao meio de cultura de Roundup Transorb[®] e Zapp QI[®] reduziu significativamente o potencial de solubilização deste isolado, enquanto o herbicida Scout[®] teve efeito oposto. O potencial de solubilização do isolado To 11 não foi alterado na presença dos herbicidas. Os herbicidas testados afetam o crescimento e a capacidade de solubilização de alguns isolados *in vitro*, sendo necessário investigar se esse efeito também ocorre no solo.

ABSTRACT

MASSESSINI, André Marcos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2007. **Phosphate solubilization by soil microorganisms in a eucalypt plantation**. Adviser: Maurício Dutra Costa. Co-advisers: Arnaldo Chaer Borges and Marcos Rogério Tótola.

The objective of this work was to evaluate the role of soil microorganisms in the availability of insoluble phosphate sources and to study the sensibility of phosphate solubilizing bacteria to commercial formulations of glyphosate. Rhizosphere soil samples were collected from *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* hybrids with different diameters at breast height, planted at distinct topographical regions, namely top, slope, and lowland. Acid phosphatase activity varied from 24.40 to 190.07 $\mu\text{g p-nitrophenol g}^{-1} \text{ soil h}^{-1}$, while alkaline phosphatase showed values ranging from 0.70 to 20.55 $\mu\text{g p-nitrophenol g}^{-1} \text{ soil h}^{-1}$. The highest phosphatase activity was observed for the rhizosphere soil from plants located at the top region. The solubilization potential of Ca, Fe and Al phosphates by the soil microorganisms varied from 17.38 to 7949.71 $\mu\text{g P g}^{-1} \text{ dry soil}$. Calcium phosphate promoted the highest values for phosphate

solubilization. The solubilization potential for Catalão and Araxá rock phosphates varied from 27.08 to 1209.71 $\mu\text{g P g}^{-1}$ dry soil, and Catalão phosphate was the most soluble phosphate source. The final pH of the culture medium was negatively correlated to phosphate solubilization. Rhizosphere bacteria were isolated and characterized as to their phosphate solubilization capacity. The solubilization index (SI) for calcium phosphate by the bacterial isolates grown in solid medium varied from 0 to 4.07. The amount of solubilized phosphate in liquid medium varied from 80.17 to 22,259.33 $\mu\text{g P}$. The growth and the phosphate solubilization capacity of the isolates were also evaluated in the presence of the commercial formulations Roundup Transorb[®], Roundup NA[®], Zapp QI[®], and Scout[®]. The presence of the herbicides in the culture medium caused a significant reduction in the growth of the isolates tested. For the isolate To 66, the presence of Roundup Transorb[®] and Zapp QI[®] significantly reduced the phosphate solubilization potential of this isolate, while for Scout the reverse was observed. The tested formulations affected the growth and solubilization capacity of some of the isolates *in vitro*. It is hypothesized that such effect resulted from specific components of the tested formulations and not from glyphosate itself, once the herbicide was present at the same concentration in each of the commercial formulations tested. Further investigations on the action of these substances on the soil microbiota must be conducted *in situ* for a better understanding of the potential deleterious effects of such formulations on key processes that take place in the soil.

INTRODUÇÃO

Os latossolos constituem a classe de solos predominantes no Brasil e na região de Viçosa. São intensamente intemperizados, apresentando baixa soma de bases, elevada acidez (pH entre 4,0 e 5,5), baixa CTC, alto teor de ferro, estrutura bem desenvolvida e textura argilosa a franco-argilosa. Esses solos apresentam fertilidade relativamente baixa, com limitada disponibilidade de nutrientes essenciais ao crescimento vegetal, tais como o fósforo, o cálcio, o magnésio, o potássio, entre outros.

As formas de adubação fosfatada atuais baseiam-se na aplicação de fertilizantes químicos de alta solubilidade. Uma forma de se reduzir os custos com a aplicação de fósforo é a utilização dos fosfatos naturais, embora os mesmos tenham como inconveniente o fato de serem de baixa solubilidade e, portanto, pouco disponíveis às plantas. Uma alternativa que pode viabilizar a utilização de fosfatos naturais é o emprego de microrganismos com capacidade de solubilizar essa fonte de fósforo.

Sabe-se que muitos microrganismos presentes no solo, principalmente aqueles associados às raízes, são capazes de promover o crescimento das plantas. Os microrganismos solubilizadores de fosfato estão naturalmente presentes nos solos e constituem uma pequena fração da microbiota total (Kucey, 1983), sendo geralmente encontrados em quantidades aproximadas de 10^2 a 10^5 unidades formadoras de colônia por grama de solo seco (Sylvester-Bradley et al., 1982; Nahas et al., 1994).

Assim, a inoculação de plantas de eucalipto com fungos ectomicorrízicos, que aumentam a superfície de absorção de nutrientes e protegem as raízes contra patógenos, associada à inoculação de bactérias capazes de solubilizar fosfatos naturais, pode ser uma alternativa para suprir a necessidade de adubação química fosfatada em reflorestamentos de eucalipto.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de solubilização de fosfato da microbiota do solo e a atividade de fosfatases em solo sob plantio de eucalipto localizado em diferentes topografias. Efetuou-se também a caracterização de bactérias solubilizadoras de fosfato isoladas do solo rizosférico do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os latossolos constituem a classe de solos predominantes no Brasil e na região de Viçosa. São intensamente intemperizados, apresentando baixa soma de bases, elevada acidez (pH entre 4,0 e 5,5), baixa CTC, alto teor de ferro, estrutura bem desenvolvida e textura argilosa a franco-argilosa. Esses solos apresentam fertilidade relativamente baixa dada a limitada disponibilidade de nutrientes essenciais ao crescimento vegetal, tais como o fósforo, o cálcio, o magnésio, o potássio, entre outros (EMBRAPA, 1999).

A disponibilidade de nutrientes é um dos fatores determinantes para o desenvolvimento vegetal. No caso dos solos brasileiros, o fósforo é um dos elementos mais limitantes (Filho et al., 2002), e a utilização de formas solúveis para a adubação de eucalipto requer a aplicação de doses superiores às necessárias ao crescimento da planta, tendo em vista que cerca de 90% do fósforo aplicado é rapidamente adsorvido às partículas de argila (Gonçalves et al., 1985).

O fósforo, na solução do solo, se encontra na forma de íon fosfato mono ou dibásico, dependendo do pH, sendo que em pH ácido predomina a forma monobásica. Esse compartimento de fósforo no solo, que em solos agrícolas variam de 0,002 a 2 mg L⁻¹ de P (Fardeau, 1996), não é suficiente para suprir o crescimento vegetal sem que haja reposição, por outro compartimento, do fósforo consumido. Assim, as formas insolúveis de fósforo presentes no solo, principalmente as formas inorgânicas, atuam na reposição do fósforo consumido, havendo um equilíbrio dinâmico entre esses compartimentos (Novais e Smyth, 1999).

As formas insolúveis de fósforo presentes no solo podem ser divididas em formas orgânicas, que estão ligadas a complexos de matéria orgânica do solo, e formas inorgânicas, que podem se encontrar precipitadas com íons Ca²⁺, Fe³⁺ e Al³⁺ ou adsorvidas à superfície de partículas minerais do solo (Novais e Smyth, 1999).

O fósforo orgânico está ligado à matéria orgânica por ligações éster, podendo esta ser mono ou diéster, dependendo do material de origem ou das reações que ocorreram entre o fósforo em solução e a fase orgânica do solo. A liberação dessa forma de fósforo, que pode chegar a 80% do fósforo total em solos florestais (Chen, 2003) e varia de 13 a 47% nos solos brasileiros (Guerra et al., 1996), geralmente envolve a ação de enzimas denominadas de maneira geral como fosfatases. Estas enzimas podem ser classificadas como fosfomonoesterases ou fosfodiesterases, dependendo do tipo de clivagem que elas catalisam (Turner e Haygarth, 2005). Dessa forma, esse compartimento não está em equilíbrio direto com o fósforo em solução, uma vez que sua mobilização depende da ação de tais enzimas.

As formas inorgânicas insolúveis de fósforo atuam como reservatório de fósforo, suprindo o fósforo retirado da solução do solo. Geralmente, sua liberação independe de reações enzimáticas. Dentre essas formas encontram-se os minerais apatita, strengita e variscita, formados a partir da precipitação do íon fosfato com os íons Ca^{2+} , Fe^{3+} e Al^{3+} , respectivamente, e o fósforo ligado às superfícies de aluminossilicatos e oxidróxidos de ferro e de alumínio (Novais e Smyth, 1999). Os fatores que afetam o equilíbrio entre o fósforo em solução e o fósforo inorgânico são estritamente físico-químicos, e alterações nesses fatores promovem o deslocamento do equilíbrio para um ou outro compartimento (Novais e Smyth, 1999).

O íon fosfato possui uma grande afinidade às superfícies das partículas de argila do solo, o que explica sua baixa concentração na solução do solo. Ao contrário de cátions como Ca^{2+} e K^+ , que interagem apenas eletrostaticamente com as superfícies carregadas das argilas, o íon fosfato se liga covalentemente a radicais OH presentes nessas superfícies, fenômeno conhecido como adsorção, o que o torna indisponível às plantas (Parfitt, 1978).

A adsorção de fósforo no solo possui duas fases (Ker, 1995): uma fase inicial rápida, dirigida pela atração eletrostática dos íons fosfato pelas cargas positivas do solo, e conseqüente troca de ligantes OH^- e OH_2^+ da superfície dos óxidos pelos íons fosfato; e uma fase lenta, que se caracteriza pela movimentação do fosfato para o interior da estrutura cristalina dos óxidos, denominada difusão em fase sólida, que torna o fósforo cada vez mais indisponível às plantas.

Na primeira fase, cerca de 75% do fósforo solúvel adicionado ao solo é adsorvido em menos de meia hora de contato (Gonçalves et al., 1985). Com aumento do pH do solo, pode-se aumentar o tempo de permanência do fósforo

na fase solúvel, em decorrência de alterações nas cargas superficiais das partículas do solo, que se tornam mais negativas, o que gera uma força de repulsão eletrostática entre o íon fosfato e as partículas do solo (Parfitt, 1978).

O íon fosfato pode também precipitar-se com íons Ca^{2+} , Fe^{3+} e Al^{3+} , formando minerais insolúveis (Iguar et al., 2001). A retenção de fósforo pelo solo é, geralmente, dependente do pH e do tipo de solo. Em solos ácidos, oxidróxidos de Fe^{3+} e Al^{3+} são os principais envolvidos na adsorção de fósforo, enquanto em solos alcalinos, o fósforo é precipitado com íons Ca^{2+} (Iguar et al., 2001). Esse processo é particularmente importante durante a dissolução de grânulos de fertilizantes fosfatados no solo, que proporciona maior concentração de íons fosfato na solução do solo, deslocando o equilíbrio no sentido da formação dos produtos insolúveis (Novais e Smyth, 1999).

O deslocamento do equilíbrio no sentido dos produtos solúveis pode ser obtido com alterações de fatores como pH, que altera as cargas superficiais das partículas do solo, restringindo a primeira fase da adsorção do íon fosfato, que depende de atração eletrostática (Parfitt, 1978). Dessa forma, solos com valores de pH mais elevados tendem a apresentar prevalência de cargas negativas nas superfícies, e conseqüente repulsão dos íons fosfato (Parfitt, 1978).

No entanto, esse efeito pode variar, uma vez que, em valores mais elevados de pH, há prevalência da forma dibásica do íon fosfato, que é preferencialmente adsorvida. Outros fatores, como a presença de cátions, podem diminuir a carga líquida negativa na superfície das partículas, favorecendo a atração do íon fosfato. Esse efeito é mais intenso para cátions de maior valência, como o Ca^{2+} (Vasconcellos et al., 1976).

A solubilização das formas insolúveis de fósforo presentes no solo pode ser realizada por meio de alterações no pH e nas concentrações de fosfato na solução. A redução do pH geralmente favorece a solubilização de apatitas, mas desfavorece a solubilização de variscita e de strengita, que são mais estáveis em valores baixos de pH (Igual et al., 2001). A solubilização dessas formas inorgânicas de fósforo é estimulada pelo consumo dos produtos solúveis, como os cátions e o íon fosfato. Isso altera a constante de equilíbrio, favorecendo a solubilização (Bolan et al., 1997). Essas alterações podem ser efetuadas pelas plantas e por microrganismos do solo, que são capazes de acidificar o meio, consumindo o fosfato e os cátions resultantes da solubilização. Dessa forma, a solubilização de fosfatos inorgânicos geralmente é maior na rizosfera do que em solo não-rizosférico (Bolan et al., 1997).

A utilização de fosfatos naturais é uma alternativa de baixo custo para aumentar os teores de fósforo no solo. No entanto, esses fosfatos possuem baixa solubilidade em solos com valores médios de pH acima de 5,5-6,0 (Reddy et al., 2002). Dessa forma, o fósforo é liberado lentamente e em pequenas quantidades, o que é insuficiente para suprir a planta na fase de crescimento rápido.

Alguns microrganismos do solo são capazes de promover o aumento da solubilização de fosfatos naturais no solo. Esse grupo de microrganismos solubilizadores de fosfato há muito vem sendo estudado (Kucey, 1983; Illmer e Schinner, 1992; Rodríguez e Fraga, 1999) e o seu isolamento geralmente é realizado utilizando-se meio sólido contendo fosfato de cálcio, que pode ser facilmente solubilizado por meio da acidificação do meio de cultivo (Gyaneshwar et al., 1999). No entanto, muitos microrganismos que são capazes de solubilizar essa fonte de fósforo mostram-se incapazes de solubilizar fosfato

de alumínio ou fosfato de ferro, que são as fontes mais abundantes em solos tropicais (Igal et al., 2001).

A solubilização de fontes insolúveis de fosfato pode ocorrer em razão da excreção de ácidos orgânicos pelos microrganismos, que solubilizam fosfatos insolúveis, como o fosfato de cálcio, de ferro e de alumínio, por meio da acidificação do ambiente (Nautiyal et al., 2000). No entanto, Kpombrekou-A e Tabatabai (1994) demonstraram que a habilidade dos ácidos orgânicos em solubilizar fosfatos não é dependente apenas do pH, mas também de características estruturais desses ácidos, que estão envolvidas na quelação de cátions. De modo geral, ácidos orgânicos alifáticos, com maior número de grupos carboxil, com grupos β -hidroxil e com grupos carboxil próximos são mais efetivos na quelação de cátions polivalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} e Al^{3+} , presentes na estrutura de fosfatos de rocha. Os autores demonstraram também que, em baixas concentrações (1 mmol L^{-1}), os ácidos orgânicos são mais efetivos na solubilização de fosfatos de rocha menos reativos, provavelmente em razão da menor quantidade de carbonatos livres presentes nessas rochas. Esses carbonatos consomem a acidez, com formação de dióxido de carbono, diminuindo a reação do ácido com o fosfato.

A exudação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular pode ser tanto constitutiva como induzida por deficiência de fósforo. Goldstein e Liu (1987) observaram que a solubilização de fosfatos naturais por um isolado de *Erwinia herbicola* foi reprimida pelo aumento da concentração de fósforo solúvel em solução. No entanto, o efeito de promoção de crescimento de plantas de trigo por mutantes bio-luminescentes de *Rhizobium leguminosarum* não foi afetado pela adubação fosfatada, sendo que a solubilização de fosfato é mecanismo efetivo de promoção de crescimento dessa estirpe (Chabot et al., 1998). Além

disso, isolados da mesma espécie bacteriana podem secretar composições diferentes de ácidos orgânicos, podendo variar de um único ácido orgânico a vários ácidos diferentes (Chen et al., 2006).

Alguns organismos podem solubilizar fosfatos naturais pela extrusão de prótons acompanhada pela assimilação de NH_4^+ (Asea et al., 1988). Os autores observaram que a solubilização de fosfato foi diretamente ligada ao decréscimo do pH, apesar da correlação entre essas variáveis não ser sempre observada.

Geralmente, bactérias gram-negativas são mais eficientes em solubilizar fosfato como resultado da oxidação extracelular de glicose a ácido glucônico pela quinoproteína glicose desidrogenase (Goldstein et al., 1999). Nesse caso, o fator responsável pela solubilização de fosfato tricálcico é a liberação de prótons pelo ácido glucônico (Lin et al., 2006). Entretanto, os organismos com maior capacidade de solubilização são isolados fúngicos de *Aspergillus* e *Penicillium* (Nahas, 1996; Filho et al., 2002).

A importância desses microrganismos no suprimento de fósforo para as plantas já foi demonstrado em vários trabalhos (Azcon et al., 1976; Freitas et al., 1997; Gyaneshwar et al., 2002), e sua efetividade depende da interação destes com a planta hospedeira. Isso é justificado pela variação que existe na composição dos exudatos radiculares em relação à espécie da planta e sua condição nutricional (Grayston et al., 1996).

A fonte de carbono do meio e o microrganismo determinam os níveis de solubilização de fontes de fosfato. Assim, isolados bacterianos obtidos da rizosfera de plantas de grão de bico apresentaram máximos de solubilização de fosfato em fontes de carbono distintas (Nautiyal et al., 2000). Em *Aspergillus aculeatus* lizuca, o nível de solubilização de fosfato de rocha mostrou-se dependente da fonte de carbono fornecida ao fungo, sendo maior quando a

arabinose foi utilizada como fonte de carbono (Narsian e Patel, 2000). Entretanto, outros estudos são necessários para esclarecer a influência da fonte de carbono sobre a solubilização de fosfatos de rocha.

Variações na fonte de nitrogênio também podem levar à alteração no potencial de solubilização dos microrganismos. Maior solubilização de fosfato foi obtida com isolados de *Penicillium* quando uma das fontes de nitrogênio presentes no meio era o amônio (Asea et al., 1988). Da mesma forma, maiores níveis de solubilização por *A. aculeatus* são obtidos fornecendo-se sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, seguido de asparagina e uréia (Narsian e Patel, 2000). Contrariamente, a presença de amônio como fonte de nitrogênio levou a significativo decréscimo na solubilização de fosfatos de rocha por mutantes mps^{++} e mps^{-} (mutante super positivo e mutante negativo, respectivamente, quanto à capacidade de solubilização de fosfatos) e, também, pela linhagem selvagem de *Penicillium rugulosum* Thom (Reyes et al., 1999). Essas variações no potencial de solubilização também podem ser observadas quando diferentes tipos de fosfatos de rocha são utilizados (Reyes et al., 1999).

A participação dos microrganismos produtores de fosfatases na dinâmica do fósforo no solo aumenta com o teor de matéria orgânica (Chen, 2003). Os fungos micorrízicos também têm papel importante nas transformações do fósforo no solo, uma vez que eles atuam como drenos de fosfato e íons Ca^{2+} , favorecendo o deslocamento do equilíbrio no sentido dos produtos de solubilização (Bolan et al., 1997; Gyaneshwar et al., 2002). Fungos micorrízicos são capazes de armazenar grandes quantidades de cálcio na parede celular na forma de oxalato de cálcio (Arocena et al., 2001). Além disso, os fungos micorrízicos trazem benefícios às plantas em razão do aumento da absorção de nutrientes e água, acarretado pela presença das hifas fúngicas no

sistema radicular (Hayman et al., 1972). A infecção de plantas por fungos micorrízicos é influenciada pela concentração de fósforo solúvel, sendo que o grau máximo de micorrização é obtido quando o fosfato é limitante ao crescimento vegetal (Valentine et al., 2001).

A resposta de plantas de eucalipto à inoculação de fungos ectomicorrízicos é diferente das plantas não inoculadas apenas quando há pouco fósforo disponível no solo. O peso da massa seca das plantas inoculadas e não-inoculadas não apresenta diferenças significativas quando há 12 mg P Kg⁻¹ de areia, sendo que alguns isolados podem diminuir o crescimento das plantas (Burgess et al., 1993). No entanto, quando há 4 mg P Kg⁻¹ de areia, as plantas inoculadas atingem até 13 vezes o peso da massa seca das plantas não-inoculadas, aumento este que está associado à maior absorção de fósforo pelas plantas (Burgess et al., 1993).

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos visando a utilização de microrganismos do solo como biofertilizantes, uma vez que os microrganismos solubilizadores de fosfato natural presentes nos solos constituem uma pequena fração da microbiota total (Kucey, 1983), sendo geralmente encontrados em quantidades aproximadas de 10² a 10⁵ unidades formadoras de colônia por grama de solo seco (Sylvester-Bradley et al., 1982; Nahas et al., 1994). No entanto, a frequência de isolamento desses microrganismos é determinada por fatores sítio-específicos, podendo variar dentro de uma área com o mesmo tipo de solo e sob cultura de uma única espécie vegetal ou entre localidades diferentes (Wakelin et al., 2004).

As bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium* e *Erwinia* possuem a capacidade de solubilizar fosfatos

naturais (Rodríguez et al., 1999). Alguns desses gêneros possuem espécies com capacidade de promover o crescimento vegetal e são denominadas PGPR (*plant growth promoting bacteria*). O gênero *Burkholderia* contém 29 espécies, sendo que várias delas são capazes de fixar N₂ atmosférico (Kennedy et al, 2004). Alguns gêneros da família Enterobacteriaceae, entre os quais *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*, possuem espécies fixadoras de N₂ atmosférico, além de exibirem a capacidade de promoção do crescimento vegetal (Kennedy et al, 2004).

Fungos micorrízicos arbusculares podem aumentar a absorção de fósforo pelas plantas e, quando as plantas são co-inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares e bactérias solubilizadoras de fosfato, o fungo pode aumentar a capacidade de solubilização das bactérias e as bactérias podem estimular a colonização das raízes pelo fungo (Toro et al., 1997). O fungo micorrízico pode também favorecer o estabelecimento e a manutenção de bactérias solubilizadoras de fosfato nas primeiras semanas após a inoculação (Azcon et al., 1976). As hifas fúngicas fornecem uma maior área de interação com outros microrganismos, funcionando como uma via de transporte de fotossimilados para o solo (Johansson et al.,2004). No entanto, a população do inóculo bacteriano, geralmente, tende a diminuir após 60 dias (Azcon et al., 1976; Toro et al., 1997).

Bactérias solubilizadoras de fosfato podem afetar a colonização micorrízica positivamente ou negativamente. Alguns isolados de *Bacillus* estimulam o crescimento de *Suillus luteus* (L.) Gray ao longo das raízes de plantas de pinho, além de promover a formação de ectomicorrizas, enquanto isolados de *Pseudomonas* e *Serratia* inibem a colonização das raízes pelo fungo e também a formação de ectomicorrizas (Bending et al., 2002). A co-

inoculação de *Bacillus* sp. e *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Conch diminuiu o crescimento de plantas de *Quercus ilex* L., provavelmente por meio da inibição do crescimento do fungo ao longo das raízes da planta (Domenech et al., 2004).

Estudos realizados com átomos de fósforo radioativo (^{32}P), visando determinar qual a fonte de fósforo utilizada pela planta, demonstram que até 75% do fósforo absorvido por plantas de cebola inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices* N.C. Schenck & G.S. Sm. e isolados bacterianos solubilizadores de fosfato dos gêneros *Enterobacter* e *Bacillus* foi derivado do fosfato de rocha adicionado (Toro et al., 1997). No entanto, plantas de cebola inoculadas apenas com fungos micorrízicos arbusculares do gênero *Endogone* utilizam a mesma fonte de fósforo que plantas não-inoculadas, apesar de absorverem maior quantidade do elemento em razão apenas do aumento do volume de solo explorado (Hayman e Mosse, 1972). Isso demonstra que algumas interações que ocorrem na micorrizosfera podem contribuir com a ciclagem do fósforo e promover um suprimento sustentável de nutrientes para as plantas.

A co-inoculação de um fungo micorrízico [*Glomus mosseae* (T.H. Nicolson & Gerd.) Gerd. & Trappe] e uma bactéria capaz de formar nódulos em raízes de leguminosas (*Azorhizobium caulinodans*) leva ao maior crescimento e maior acúmulo de fosfato e nitrogênio nas folhas e raízes de plantas de *Sesbania rostrata* Bremek. & Oleerm. (Rahman e Parsons, 1997). Aumentos na produção de matéria seca e na absorção de nutrientes por plantas de trigo em solos com baixa disponibilidade de nutrientes podem ser obtidos pela inoculação com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares (Singh e Kapoor, 1999).

A inoculação de plantas de canola com rizobactérias solubilizadoras de fosfato proporciona maior crescimento e produção das plantas, mas não aumenta a absorção de fósforo em solos de baixa fertilidade adubados com fosfato de rocha (Freitas et al., 1997). Concluiu-se que a promoção de crescimento das plantas não estava diretamente relacionada à solubilização de fosfato, mas provavelmente a hormônios de crescimento sintetizados pelo isolado bacteriano.

A inoculação de *Glomus deserticola* Trappe, Bloss & J.A. Menge e *Yarrowia lipolytica*, utilizando a técnica de imobilização em alginato de cálcio, promove maiores níveis de crescimento e absorção de fósforo em plantas de tomate quando os microrganismos são imobilizados conjuntamente, em comparação aos tratamentos em que as espécies microbianas foram inoculadas separadamente ou não foram imobilizadas (Vassilev et al., 2001).

A dinâmica do fósforo no solo é dependente de características do solo como acidez, teor de matéria orgânica e textura, todas influenciam incisivamente na disponibilidade de fósforo às plantas. O estudo da dinâmica desses processos e da atividade desses microrganismos em diferentes ambientes é necessário para conhecer o seu papel na sustentabilidade dos ecossistemas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AROCENA J.M., GLOWA K.R., MASSICOTE, H.R. Calcium-rich hypha encrustations on *Piloderma*. **Mycorrhiza**, **10**: 209-215, 2001.
- ASEA P. E. A., KUCEY R. M. N., STEWART J. W. B. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. **Soil Biology and Biochemistry**, **20**: 459-464, 1988.
- AZCON R., BAREA J. M., HAYMAN D. S. Utilization of rock phosphate in alkaline soils by plants inoculated with mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, **8**: 135-138, 1976.
- BENDING G. D., POOLE E. J., WHIPPS J. M., READ D. J. Characterisation of bacteria from *Pinus silvestris*-*Suillus luteus* mycorrhizas and their effects on root-fungus interactions and plant growth. **FEMS Microbiology Ecology** **39**: 219-227, 2002.
- BOLAN N. S., ELLIOTT J., GREGG P. E. H., WEIL S. Enhanced dissolution of phosphate rocks in the rhizosphere. **Biology and Fertility of Soils**, **24**: 169-174, 1997.
- BURGESS T. I., MALAJCZUK N., GROVE T. S. The ability of 16 ectomycorrhizal fungi to increase growth and phosphorus uptake of *Eucalyptus globules* Labill. and *E. diversicolor* F. Muell. **Plant and Soil** **153**: 155-164, 1993.
- CHABOT R., BEAUCHAMP C. J., KLOEPPER J. W., ANTOUN H. Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. **Soil Biology and Biochemistry** **30**: 1615-1618, 1998.

- CHEN H. Phosphatase activity and P fractions in soils of an 18-year-old Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) plantation. **Forest Ecology and Management**, **178**: 301-310, 2003.
- 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**, **34**: 33-41, 2006.
- DOMENECH J., RAMOS-SOLANO B., PROBENZA A., LUCAS-GARCÍA J. A., COLÓN J. J., GUTIÉRREZ-MAÑERO F. J. *Bacillus* spp. and *Pisolithus tinctorius* effects on *Quercus ilex* ssp. *ballota*: a study on tree growth, rhizosphere community structure and mycorrhizal infection. **Forest Ecology and Management** **194**: 293-303, 2004.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. EMBRAPA Solos, Brasília, 1999.
- FARDEAU J. C. Dynamics of phosphate in soils. An isotopic outlook. **Fertility Research**, **45**: 91-100, 1996.
- FILHO G. N. S., NARLOCH C., SCHARF R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **37**: 847-854, 2002.
- FREITAS J. R. DE, BANERJEE M. R., GERMIDA J. J. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not uptake of canola (*Brassica napus* L.). **Biology and Fertility of Soils**, **24**: 358-364, 1997.
- GOLDSTEIN A.H., LIU S.T. Molecular cloning and regulation of mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola*. **Biotechnology**, **5**: 72-74, 1987.
- GOLDSTEIN A. H., BRAVERMAN K., OSORIO N. Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limiting desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium. **FEMS Microbiology Ecology**, **30**: 295-300, 1999.
- GONÇALVES J. L. M., FIRME D. J., NOVAIS R. F., RIBEIRO A. C. Cinética de adsorção de fósforo em solos de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, **9**: 107-111, 1985.
- GRAYSTON S. J., VAUGHAN D., JONES D. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. **Applied Soil Ecology**, **5**: 29-56, 1996.
- GUERRA J. G. M., ALMEIDA D. L., SANTOS G. A. & FERNANDES M. S. Conteúdo de fósforo orgânico em amostras de solos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **31**: 291-299, 1996.

- GYANESHWAR P., PAREKH L. J., ARCHANA G., POOLE P. S., COLLINS M. D., HUTSON R. A., KUMAR G. N. Involvement of a phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter asburiae*. **FEMS Microbiology Letters**, **171**: 223-229, 1999.
- GYANESHWAR P., KUMAR G. N., PAREKH L. J., POOLE P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, **245**: 83-93, 2002.
- HAYMAN D. S., MOSSE B. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. III. Increase uptake of labile P from soil. **New Phytologist**, **71**: 41-47, 1972.
- IGUAL J. M., VALVERDE A., CERVANTES E., VELÁZQUEZ E. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. **Agronomie**, **21**: 561-568, 2001.
- ILLMER P., SCHINNER F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, **24**: 389-395, 1992.
- JOHANSSON J. F., PAUL L. R., FINLAY R. D. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. **FEMS Microbiology Ecology**, **48**: 1-13, 2004.
- KENNEDY I.R., CHOUDHURY A.T.M.A., KECSKÉS M.L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, **36**: 1229-1244, 2004
- KER J. C. Mineralogia, sorção e dessorção de fosfato, magnetização e elementos traços de Latossolos do Brasil. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1995. 181p. (Tese de Doutorado)
- KPOMBLEKOU-A K., TABATABAI M.A. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. **Soil Science**, **158**: 442-453, 1994.
- KUCEY R. M. N. Phosphate solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. **Canadian Journal of Soil Science**, **63**: 671-678, 1983.
- LIN T.F., HUANG H.I., SHEN F.T., YOUNG C.C. The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. **Bioresource Technology**, **97**: 957-960, 2006.
- MARX D. H. **The role of mycorrhizae in forest production**. TAPPI Conference Papers, Annual Meeting, February 14-16, 1977, Atlanta, G.A. pp 151-161.

- NAHAS E., CENTURION J. F. & ASSIS L. C. Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, **18**: 43-48, 1994.
- NAHAS E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, **12**: 567-572, 1996.
- NARSIAN V., PATEL H. H. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. **Soil Biology and Biochemistry**, **32**: 559-565, 2000.
- NAUTIYAL C. S., BHADAURIA S., KUMAR P., LAL H., MONDAL R., VERMA D. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. **FEMS Microbiology Letters**, **182**: 291-296, 2000.
- NOVAIS R. F. & SMYTH T. J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa-MG: UFV, DPS, 1999. 399 p.
- PARFITT R. L. Anion adsorption by soils and soil materials. **Advances in Agronomy**, **30**: 1-50, 1978.
- RAHMAN M. K., PARSONS J. W. Effects of inoculation with *Glomus mosseae*, *Azorhizobium caulinodans* and rock phosphate on the growth of and nitrogen and phosphorus accumulation in *Sesbania rostrata*. **Biology and Fertility of Soils**, **25**: 47-52, 1997.
- REDDY M. S., KUMAR S., BABITA K., REDDY M. S. Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, **84**: 187-189, 2002.
- REYES I., BERNIER L., SIMARD R. R., ANTOUN H. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. **FEMS Microbiology Ecology**, **28**: 281-290, 1999.
- RODRÍGUEZ H., FRAGA R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, **17**: 319-339, 1999.
- SINGH S., KAPOOR K. K. Inoculation with phosphate solubilizing microorganisms and a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. **Biology and Fertility of Soils**, **28**: 139-144, 1999.
- SYLVESTER-BRADLEY R., ASAKAWA N., TORRACA S. LA, MAGALHÃES F. M. M., OLIVEIRA L. A. E PEREIRA R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazônica**, **12**: 15-22, 1982.
- TORO M., AZCÓN R., BAREA J. M. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (^{32}P) and nutrient cycling. **Applied and Environmental Microbiology**, **63**: 4408-4412, 1997.

- TURNER B. L., HAYGARTH P. M. Phosphatase activity in temperate pasture soils: Potential regulation of labile organic phosphorus turnover by phosphodiesterase activity. **Science of the Total Environment**, **344**: 27-36, 2005.
- VALENTINE A. J., OSBORNE B. A., MITCHELL D. T. Interactions between phosphorus supply and total nutrient availability on mycorrhizal colonization, growth and photosynthesis of cucumber. **Scientia Horticulturae**, **88**: 177-189, 2001.
- VASCONCELLOS C. A., BRAGA J. M., NOVAIS R. F. & PINTO O. C. B. Fósforo em dois Latossolos do Estado de Mato Grosso: I Sorção de fosfato. **Experientiae**, **18**: 267-285, 1974.
- VASSILEV N., VASSILEVA M., AZCON R., MEDINA A. Application of free and Ca-entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* in a soil-plant system. **Journal of Biotechnology**, **91**: 237-242, 2001.
- WAKELIN S. A., WARREN R. A., HARVEY P. R., RYDER M. H. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. **Biology and Fertility of Soils**, **40**: 36-43, 2004.

CAPÍTULO I

SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO MEDIADA POR MICRORGANISMOS DO SOLO DE PLANTIO DE EUCALIPTO.

André Marcos Massenssini, Maurício Dutra Costa, Arnaldo Chaer Borges, Marcos Rogério Tótola

RESUMO – Objetivou-se neste trabalho avaliar o papel dos microrganismos do solo na solubilização de diversas fontes insolúveis de fósforo. Desta forma, determinou-se a atividade de fosfatases e também o potencial de solubilização, em meio NBRIP líquido, dos fosfatos de cálcio, ferro e alumínio, e dos fosfatos naturais de Araxá e Catalão pela microbiota total do solo rizosférico de plantas de eucalipto com diferentes diâmetros à altura do peito, oriundas de posições topográficas distintas. O fosfato de cálcio foi o mais solubilizado no topo e na baixada, enquanto na encosta não foi observada diferença entre as fontes de fósforo avaliadas. Apenas o fosfato de cálcio teve sua solubilização afetada dependendo da posição topográfica. O fosfato de Catalão foi o fosfato natural mais solubilizado pela microbiota do solo. O pH final do meio de cultura correlacionou-se negativamente com os valores de fósforo solubilizado. A atividade das fosfatases ácida e alcalina foi maior nos solos rizosféricos de plantas do topo. Mesmo com os resultados obtidos, as diferenças no potencial de solubilização das fontes de fosfato e na atividade das fosfatases não foram suficientes para explicar as variações no crescimento das plantas entre as posições topográficas ou entre as classes de diâmetro das árvores.

1. INTRODUÇÃO

A área reflorestada com eucalipto no Brasil é de, aproximadamente, 3,4 milhões de hectares (Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2006). A utilização de eucalipto para fins de reflorestamento é interessante devido às características dessa planta, a exemplo da sua capacidade de tolerar baixa fertilidade e elevada acidez (Barros et al., 1981), comuns nos solos predominantes no Brasil e na região de Viçosa.

A região de Viçosa se caracteriza por possuir o relevo acidentado, chamado de “mares de morros”, com topografia típica em meia-laranja de vertente côncavo-convexa. Essa conformação topográfica típica resulta em heterogeneidade no crescimento das plantas de eucalipto, o que reduz a produtividade dessas áreas. Isso pode ser causado por diferenças físico químicas do solo em cada posição topográfica, que podem afetar o crescimento microbiano e a disponibilidade de nutrientes como o fósforo.

Mesmo com a tolerância do eucalipto à baixa fertilidade, para obtenção de boa produtividade, torna-se necessária a utilização de fertilizantes (Barros et al., 1981). As formas de adubação fosfatada atuais baseiam-se na aplicação de fertilizantes químicos de alta solubilidade. A utilização de formas solúveis para a adubação requer a aplicação de doses superiores às necessárias ao crescimento da planta, tendo em vista que cerca de 90% do fósforo aplicado é rapidamente adsorvido às partículas de argila (Gonçalves et al., 1985). Devido à constante aplicação de formas solúveis de fósforo na agricultura, estimativas teóricas sugerem que o fósforo acumulado em solos agrícolas é suficiente para sustentar máxima produção de culturas por um período de 100 anos (Goldstein et al., 1993 citado por Gyaneshwar et al., 2002).

Uma forma de se reduzir os custos com a aplicação de fósforo é a utilização dos fosfatos naturais, embora tenham como inconveniente o fato de serem de baixa solubilidade e, portanto, pouco disponíveis às plantas. Uma alternativa que pode viabilizar a utilização de fosfatos naturais é o emprego de microrganismos com capacidade de solubilizar essa fonte de fósforo. Esses microrganismos, principalmente os associados às raízes, são capazes de promover o crescimento das plantas. Nesse contexto, constituem importante grupo capaz de afetar o desenvolvimento das plantas, apesar de constituírem uma pequena parcela da microbiota total do solo (Kucey, 1983). Esses microrganismos são geralmente encontrados em quantidades aproximadas de 10^2 a 10^5 unidades formadoras de colônia por grama de solo seco (Sylvester-Bradley et al., 1982; Nahas et al., 1994 b).

Entre as bactérias solubilizadoras de fosfato, que são encontradas em maior número no solo (Nahas et al., 1994 b), as gram-negativas são mais eficientes em solubilizar fosfato, como resultado da oxidação extracelular de

glicose a ácido glucônico pela quinoproteína glicose desidrogenase (Goldstein et al., 1999). Entretanto, os organismos com maior capacidade de solubilização são isolados fúngicos de *Aspergillus* e *Penicillium* (Nahas, 1996; Filho et al., 2002).

A solubilização de fontes insolúveis de fosfato pode ocorrer em razão da excreção de ácidos orgânicos pelos microrganismos, que solubilizam fosfatos insolúveis, como o fosfato de cálcio, de ferro e de alumínio, por meio da acidificação do ambiente (Nautiyal et al., 2000). No entanto, Kpombrekou-A e Tabatabai (1994) demonstraram que a habilidade dos ácidos orgânicos em solubilizar fosfatos não é dependente apenas do pH, mas também de características estruturais desses ácidos, que estão envolvidas na quelação de cátions. De modo geral, ácidos orgânicos alifáticos com maior número de grupos carboxil, com grupos β -hidroxil e com grupos carboxil próximos são mais efetivos na quelação de cátions polivalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} e Al^{3+} , presentes na estrutura de fosfatos de rocha. Os autores demonstraram também que, em baixas concentrações (1mmol L^{-1}), os ácidos orgânicos são mais efetivos na solubilização de fosfatos de rocha menos reativos, provavelmente devido à menor quantidade de carbonatos livres, que consomem a acidez, diminuindo a reação do ácido com o fosfato.

Alguns organismos podem solubilizar fosfatos naturais pela extrusão de prótons acompanhada pela assimilação de NH_4^+ (Asea et al., 1988). Os autores observaram que a solubilização de fosfato foi diretamente ligada ao decréscimo do pH, apesar da correlação entre essas variáveis não ser muito sempre observada.

A importância desse grupo de microrganismos no suprimento de fósforo para as plantas já foi demonstrado em vários trabalhos (Azcon et al., 1976;

Freitas et al., 1997; Gyaneshwar et al., 2002), e sua efetividade depende da interação destes com a planta hospedeira. Isso é justificado pela variação que existe na composição dos exudatos radiculares em relação à espécie da planta e sua condição nutricional (Grayston et al., 1996).

A fonte de carbono do meio e o microrganismo determinam os níveis de solubilização de fontes de fosfato. Assim, isolados bacterianos obtidos da rizosfera de plantas de grão de bico apresentaram máximos de solubilização de fosfato em fontes de carbono distintas (Nautiyal et al., 2000). Em *Aspergillus aculeatus* lizuca o nível de solubilização de fosfato de rocha mostrou-se dependente da fonte de carbono fornecida ao fungo, sendo maior quando a arabinose foi utilizada como fonte de carbono (Narsian e Patel, 2000).

Variações na fonte de nitrogênio podem levar à alteração no potencial de solubilização dos microrganismos. Maior solubilização de fosfato foi realizada por isolados de *Penicillium* quando uma das fontes de nitrogênio presentes no meio era o amônio (Asea et al., 1988). Da mesma forma, maiores níveis de solubilização por *A. aculeatus* são obtidos fornecendo-se sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, seguido de asparagina e uréia (Narsian et al., 2000). Contrariamente, a presença de amônio como fonte de nitrogênio levou a um significativo decréscimo na solubilização de fosfatos de rocha por mutantes mps^{++} e mps^{-} (mutante super positivo e mutante negativo, respectivamente, quanto à capacidade de solubilização de fosfatos) e também pela linhagem selvagem de *Penicillium rugulosum* Thom (Reyes et al., 1999). Essas variações no potencial de solubilização também podem ser observadas quando diferentes tipos de fosfatos de rocha são utilizados (Reyes et al., 1999).

Compostos utilizados no manejo de culturas, como herbicidas e inseticidas, podem alterar a capacidade de solubilização dos microrganismos,

A presença de inseticidas no solo aumenta da capacidade de solubilização da microbiota (Das et al., 1998). A presença de herbicidas promove aumento na densidade populacional e na solubilização de fosfato de cálcio por microrganismos do solo rizosférico de arroz (Debnath et al., 2002).

Dessa forma, entender os processos mediados por esses microrganismos torna-se importante para o estabelecimento de práticas de manejo adequadas, que visem reduzir a dependência dos produtores em relação aos fertilizantes comerciais, promovendo o bom desenvolvimento das plantas e maior produtividade por área.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de solubilização de fósforo pela microbiota da rizosfera de plantas do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* e do solo não-rizosférico em áreas situadas em diferentes posições topográficas na região de Viçosa, MG.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Associações Simbióticas Micorrízicas do Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, BIOAGRO, Viçosa, MG.

2.1. Amostragem

A área avaliada foi um plantio clonal do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* com 2,5 anos de idade e espaçamento 3 x 3 m, localizada no município de Viçosa, MG. A área apresenta topografia típica em meia-laranja de vertente côncavo-convexa, resultando em três posições topográficas distintas: Topo (S, 20° 48' 10,0" e O, 42° 54' 08,4"), Encosta (S, 20° 48' 07,0" e O, 42° 54' 0,57") e Baixada (S, 20° 48' 03,2" e O, 42° 54' 05,7"). Essa conformação topográfica resulta em heterogeneidade no crescimento do

eucalipto, com árvores mais desenvolvidas no topo e na baixada, e árvores menos desenvolvidas na encosta. Em cada posição topográfica foi delimitada uma parcela de 60 m², sendo cada uma delas caracterizada por apresentar diferenças marcantes no crescimento das árvores e no depósito de serapilheira, a saber: Topo = área com árvores de diâmetro médio de 9,7 cm e contendo 2.460 kg ha⁻¹ de serapilheira; Encosta = área com árvores de diâmetro médio de 7,8 cm e contendo 1.239 kg ha⁻¹ de serapilheira; Baixada = área com árvores de diâmetro médio de 11,7 cm e contendo 1.730 kg ha⁻¹ de serapilheira. O diâmetro médio representa a média de diâmetro à altura do peito (DAP) das 100 árvores constituintes da parcela em cada posição topográfica. As árvores foram divididas em três classes de diâmetro com base na média geral de DAP e o desvio. Na posição Topo, as árvores de classe Inferior apresentaram DAP < 7,3 cm, as de classe Média, DAP entre 9 e 10 cm, e as de classe Superior, DAP > 12,2 cm. Da mesma forma, na posição Encosta, as árvores da classe Inferior apresentaram DAP < 5,3 cm, as de classe Média, DAP entre 7,6 e 8,6 cm, e as de classe Superior, DAP > 10,5 cm. Finalmente, na posição Baixada, as árvores de classe Inferior foram aquelas com DAP < 8,7 cm, as de classe Média, com DAP entre 11,7 e 12,5 cm, e as de classe Superior com DAP > 14,7 cm.

Amostras compostas do solo das três parcelas foram coletadas na camada de 0-20 cm para a caracterização física e química (Tabela 1). Para a quantificação do potencial de solubilização da microbiota do solo e para determinação da atividade de fosfomonoesterases foram coletadas, na camada de 0-20 cm, três amostras simples de solo rizosférico de cada árvore para a confecção de uma amostra composta. Coletaram-se três amostras compostas

Tabela 1. Características químicas e físicas do solo de área plantada com o híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* com 2,5 anos de idade, plantado em três posições topográficas distintas (Topo, Encosta, Baixada) da região de Viçosa - MG.

Característica	Posição Topográfica		
	Topo	Encosta	Baixada
pH-H ₂ O (1:2,5)	4,86	4,43	4,75
Al ³⁺ (cmol _c dm ⁻³) ^{1/}	0,82	0,67	0,43
Ca ²⁺ (cmol _c dm ⁻³) ^{1/}	0,17	0,00	0,56
Mg ²⁺ (cmol _c dm ⁻³) ^{1/}	0,40	0,05	0,40
H+Al (cmol _c dm ⁻³) ^{2/}	10,5	8,6	6,8
K (mg dm ⁻³) ^{3/}	40,0	19,0	37,0
P (mg dm ⁻³) ^{3/}	2,2	0,9	1,3
P-remanescente (mg L ⁻¹) ^{4/}	17,0	16,6	22,6
MO (dag kg ⁻¹) ^{5/}	5,50	3,84	3,84
SB (cmol _c dm ⁻³)	0,67	0,10	1,05
t (cmol _c dm ⁻³)	1,49	0,77	1,48
T (cmol _c dm ⁻³)	11,17	8,70	7,85
m (%)	55,0	87,0	29,1
V (%)	6,0	1,1	13,4
Areia grossa (%)	22	22	35
Areia fina (%)	11	12	11
Silte (%)	5	7	7
Argila (%)	62	59	47
Classe textural	Muito Argilosa	Argilosa	Argilo-Arenosa

^{1/} Extrator KCl 1 mol L⁻¹ (Vettori, 1969). ^{2/} Extrator acetato de cálcio 0,5 mol L⁻¹, pH 7,0 (Vettori, 1969). ^{3/} Extrator Mehlich-1 (Defelipo & Ribeiro, 1997). ^{4/} Concentração de P na solução de equilíbrio, após agitar por 1h o solo com CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹, contendo 60 mg L⁻¹ de P em relação solo:solução de 1:10 (Alvarez et al., 2000). ^{5/} Método Walkey & Black (Jackson, 1958).

para cada classe de diâmetro e de solo não-rizosférico em cada uma das três posições topográficas, constituindo um total de 36 amostras compostas, 12 por parcela. As amostras foram imediatamente transportadas para o laboratório para realização das análises microbiológicas.

2.2. Potencial de solubilização de diferentes fontes inorgânicas de fósforo em solo sob mata de eucalipto

O potencial de solubilização de formas inorgânicas de fósforo foi determinado de acordo com a metodologia estabelecida por Debnath et al. (1994), incubando-se 1 g de solo úmido em 15 mL de meio NBRIP líquido (Nautiyal, 1999), com adição de diferentes fontes insolúveis de fósforo ($\text{Ca}_5\text{P}_3\text{HO}_{13}$, AlPO_4 , FePO_4), em quantidade equivalente a 15 mg de P, em tubos de ensaio a 28°C por 15 dias, com três repetições. Um tratamento controle, sem a adição de fósforo, foi também incluído. Ao final do experimento, o pH do sobrenadante foi medido e a estimativa do fósforo solúvel foi feita pelo método colorimétrico descrito por John (1970).

O experimento constituiu-se de fatorial 3 x 4, referente a três posições topográficas e a quatro fontes de fósforo, com parcelas subdivididas correspondentes aos quatro solos de procedência distinta (solo rizosférico de árvores das três classes de DAP e solo não-rizosférico), sendo montado com três repetições. No laboratório, o experimento foi conduzido em triplicata.

2.3. Potencial de solubilização de diferentes fosfatos naturais em solo sob mata de eucalipto

O potencial de solubilização de fosfatos naturais foi determinado de acordo com a metodologia estabelecida por Debnath et al. (1994), incubando-se 1 g de solo úmido de cada amostra em 15 mL de meio NBRIP líquido (Nautiyal, 1999), com adição de fosfatos naturais de baixa reatividade (fosfato de Catalão, 36% de P_2O_5 ; fosfato de Araxá, 24% de P_2O_5), em quantidade equivalente a 15 mg de P, em tubos de ensaio a 28°C por 15 dias, com três repetições. Um tratamento controle, sem adição de fósforo, foi também incluído. Ao final do experimento, o pH do sobrenadante foi medido e a estimativa do fósforo solúvel foi feita pelo método colorimétrico descrito por John (1970).

O experimento constituiu-se de fatorial 3 x 3, referente a três posições topográficas e a três fontes de fósforo, com parcelas subdivididas correspondentes aos quatro solos de procedência distinta (solo rizosférico das três classes de diâmetro de árvores e solo não rizosférico), sendo montado com três repetições. O experimento foi conduzido em laboratório em triplicata.

2.4. Atividade de fosfomonoesterases ácida e alcalina em solo de área plantada com eucalipto

A atividade das fosfatases ácida e alcalina foi avaliada conforme a metodologia descrita por Tabatabai (1994), que envolve a determinação colorimétrica do p-nitrofenol liberado quando amostras de solo são incubadas com solução tamponada de p-nitrofenil fosfato e tolueno.

O experimento foi montado com parcelas subdivididas, onde as três posições topográficas corresponderam às parcelas e os quatro solos de procedência distinta (solo rizosférico das três classes de diâmetro de árvores e solo não-rizosférico), as sub-parcelas, sendo montado com três repetições. No laboratório, o experimento foi conduzido em triplicata.

2.5. Análises estatísticas

Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Foram analisadas, também, as correlações simples de Pearson entre fósforo solubilizado e o pH a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Potencial de solubilização de diferentes fontes inorgânicas de fósforo em solo sob mata de eucalipto

O potencial de solubilização de fontes inorgânicas de fósforo da microbiota total apresentou diferenças quanto às fontes de fósforo utilizadas, quanto à topografia e a classe de diâmetro das árvores (Tabelas 2 e 3). O maior potencial de solubilização observado foi o do solo rizosférico de árvores de diâmetro médio da baixada (7949,71 µg de P), seguido do solo não-rizosférico (7491,81 µg de P) e do solo rizosférico de árvores de diâmetro médio do topo (6306,33 µg de P), todos na presença de fosfato de cálcio. O potencial de solubilização de fosfato da microbiota de solo sob plantio de eucalipto foi superior ao observado por Das et al. (1998), que analisou o efeito de inseticidas na solubilização de fosfato pela microbiota de solo agrícola. Os

Tabela 2. Potencial de solubilização de fosfato de cálcio, ferro e alumínio, em µg de P, em solos sob plantio do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* com 2,5 anos de idade, plantado em três posições topográficas distintas (Topo, Encosta, Baixada) e dividido em diferentes classes de diâmetro^{3/}, na região de Viçosa - MG.

Fosfato	Topo			
	Superior	Médio	Inferior	Não-rizosférico
Ca₅P₃HO₁₃	3273,68 Ac ^{1/}	6306,33 Aab	5908,54 Ab	7491,81 Aa
FePO₄	78,06 Ba	67,03 Ba	65,46 Ba	36,31 Ba
AlPO₄	301,92 Ba	267,36 Ba	487,12 Ba	326,73 Ba
Controle^{2/}	15,38 Ba	14,05 Ba	13,16 Ba	17,59 Ba
	Encosta			
	Superior	Médio	Inferior	Não-rizosférico
Ca₅P₃HO₁₃	1410,06 Aa	851,15 Aa	791,26 Aa	408,01 Aa
FePO₄	33,22 Aa	28,03 Aa	20,44 Aa	17,65 Aa
AlPO₄	794,69 Aa	260,22 Aa	402,15 Aa	578,21 Aa
Controle	11,54 Aa	9,30 Aa	12,44 Aa	13,34 Aa
	Baixada			
	Superior	Médio	Inferior	Não-rizosférico
Ca₅P₃HO₁₃	6176,87 Ab	7949,71 Aa	5942,29 Ab	5742,31 Ab
FePO₄	23,54 Ba	20,07 Ba	15,84 Ba	17,38 Ba
AlPO₄	621,87 Ba	477,37 Ba	229,04 Ba	120,01 Ba
Controle	14,15 Ba	14,58 Ba	13,72 Ba	14,58 Ba

1/ Na coluna, em cada posição topográfica, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Na linha, médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

2/ Controle sem adição de fosfato.

3/ Na posição Topo, classe Inferior DAP < 7,3 cm, classe Média DAP entre 9 e 10 cm, e classe Superior DAP > 12,2 cm. Na posição Encosta, classe Inferior DAP < 5,3 cm, classe Média DAP entre 7,6 e 8,6 cm, e classe Superior DAP > 10,5 cm. Na posição Baixada, classe Inferior DAP < 8,7 cm, classe Média DAP entre 11,7 e 12,5 cm, e Superior DAP > 14,7 cm.

Tabela 3. Potencial de solubilização de fosfato de cálcio, ferro e alumínio, em μg de P, em solos sob plantio do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* com 2,5 anos de idade, plantado em três posições topográficas distintas (Topo, Encosta, Baixada) e dividido em diferentes classes de diâmetro^{3/}, na região de Viçosa - MG.

Ca₅P₃HO₁₃				
	Superior	Médio	Inferior	Não-rizosférico
Topo	3273,68 Ac ^{1/}	6306,33 ABab	5908,54 Ab	7491,81 Aa
Encosta	1410,06 Aa	851,15 Ba	791,26 Aa	408,01 Ba
Baixada	6176,87 Ab	7947,91 Aa	5942,29 Ab	5742,31 ABb
FePO₄				
	Superior	Médio	Inferior	Não-rizosférico
Topo	78,06 Aa	67,03 Aa	65,46 Aa	36,31 Aa
Encosta	33,22 Aa	28,03 Aa	20,44 Aa	17,65 Aa
Baixada	23,54 Aa	20,07 Aa	15,84 Aa	17,38 Aa
AlPO₄				
	Superior	Médio	Inferior	Não-rizosférico
Topo	301,92 Aa	267,36 Aa	487,12 Aa	326,73 Aa
Encosta	794,69 Aa	260,22 Aa	402,15 Aa	578,21 Aa
Baixada	621,87 Aa	477,37 Aa	229,04 Aa	120,01 Aa
Controle^{2/}				
	Superior	Médio	Inferior	Não-rizosférico
Topo	15,38 Aa	14,05 Aa	13,16 Aa	17,59 Aa
Encosta	11,54 Aa	9,30 Aa	12,44 Aa	13,34 Aa
Baixada	14,15 Aa	14,58 Aa	13,72 Aa	14,58 Aa

1/ Na coluna, em cada posição topográfica, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Na linha, médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

2/ Controle sem adição de fosfato.

3/ Na posição Topo, classe Inferior DAP < 7,3 cm, classe Média DAP entre 9 e 10 cm, e classe Superior DAP > 12,2 cm. Na posição Encosta, classe Inferior DAP < 5,3 cm, classe Média DAP entre 7,6 e 8,6 cm, e classe Superior DAP > 10,5 cm. Na posição Baixada, classe Inferior DAP < 8,7 cm, classe Média DAP entre 11,7 e 12,5 cm, e Superior DAP > 14,7 cm.

autores observaram aumento da capacidade de solubilização de fosfato na presença de inseticidas, sendo o maior valor (399 μg de P) obtido para o solo tratado com BHC. O potencial de solubilização de fosfato da microbiota de solo sob plantio de eucalipto foi maior também que o observado para solo rizosférico de arroz tratado com herbicidas (Debnath et al., 2002).

No topo e na baixada, a fonte inorgânica de fósforo mais solubilizada foi o fosfato de cálcio (Tabela 2). Não foram observadas diferenças entre os tratamentos na encosta. Estudos prévios demonstram que a contagem de microrganismos do solo correlaciona-se positivamente com o teor de matéria orgânica (Nahas et al., 1994 a). No topo, o maior teor de matéria orgânica (Tabela 1), aliado à maior quantidade de serapilheira, pode suportar uma comunidade maior de microrganismos. O solo da baixada, apesar de possuir teor de matéria orgânica semelhante ao solo da encosta (Tabela 1), possui maior conteúdo de serapilheira. Assim, o conteúdo de matéria orgânica do topo e da baixada pode favorecer o desenvolvimento de maiores comunidades microbianas, em relação à encosta, o que sugere que há também maior número de microrganismos solubilizadores de fosfato.

O potencial de solubilização variou com as classes de diâmetro das árvores quando o fosfato de cálcio foi testado (Tabela 3). No entanto, essas diferenças observadas no potencial de solubilização entre as classes de diâmetro das árvores não são suficientes para explicar o desenvolvimento diferencial das plantas, uma vez que os maiores potenciais não se correlacionaram com as árvores de maior diâmetro. A topografia influenciou o potencial de solubilização apenas no solo rizosférico de árvores de diâmetro médio e no solo não-rizosférico na presença de fosfato de cálcio (Tabela 3).

Tabela 4. pH final do meio de cultura após 15 dias de incubação a 30 °C de solo sob plantio do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* com 2,5 anos de idade, plantado em três posições topográficas distintas (Topo, Encosta, Baixada) e dividido em diferentes classes de diâmetro^{3/}, na região de Viçosa - MG, na presença de diferentes fontes de fósforo.

Fosfato	Topo			
	Superior	Médio	Inferior	Não-rizosférico
Ca₅P₃HO₁₃	4,14 Aa ^{1/}	3,98 ABab	3,85 ABb	3,84 ABb
FePO₄	3,95 ABa	3,92 ABa	3,94 ABa	3,94 ABa
AIPO₄	3,83 Ba	3,78 Ba	3,72 Ba	3,71 Ba
Controle^{2/}	4,15 Aa	4,12 Aa	4,09 Aa	4,00 Aa
Encosta				
	Superior	Médio	Inferior	Não-rizosférico
Ca₅P₃HO₁₃	4,55 Aa	4,53 Aa	4,35 Ba	4,37 Aa
FePO₄	3,96 Bb	4,39 Aa	4,55 ABa	4,49 Aa
AIPO₄	3,53 Cb	3,92 Ba	3,67 Cab	3,72 Bab
Controle	4,43 Ab	4,45 Ab	4,78 Aa	4,55 Aab
Baixada				
	Superior	Médio	Inferior	Não-rizosférico
Ca₅P₃HO₁₃	3,98 Ba	4,14 Aa	4,05 Aa	4,07 Aa
FePO₄	4,24 Aa	4,04 Aa	4,26 Aa	4,18 Aa
AIPO₄	3,81 Bab	3,76 Bb	4,08 Aa	4,03 Aab
Controle	4,23 Aa	4,29 Aa	4,29 Aa	4,24 Aa

1/ Na coluna, em cada posição topográfica, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Na linha, médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

2/ Controle sem adição de fosfato.

3/ Na posição Topo, classe Inferior DAP < 7,3 cm, classe Média DAP entre 9 e 10 cm, e classe Superior DAP > 12,2 cm. Na posição Encosta, classe Inferior DAP < 5,3 cm, classe Média DAP entre 7,6 e 8,6 cm, e classe Superior DAP > 10,5 cm. Na posição Baixada, classe Inferior DAP < 8,7 cm, classe Média DAP entre 11,7 e 12,5 cm, e Superior DAP > 14,7 cm.

Pode-se observar que, mesmo não sendo detectada diferença estatística, o potencial de solubilização do fosfato de alumínio foi de 4 a 32 vezes maior que o potencial de solubilização do fosfato de ferro (Tabela 2). Isso pode ser atribuído ao elevado coeficiente de variação dos dados, que impossibilitou a detecção dessas diferenças. O mesmo ocorreu na avaliação do efeito da posição topográfica no potencial de solubilização de fosfato de cálcio (Tabela 3), onde os valores observados para o topo e a baixada foram substancialmente maiores que os da encosta.

O pH final do sobrenadante apresentou diferenças quanto à fonte de fósforo utilizada, quanto à classe de diâmetro das árvores e quanto à topografia, variando de 3,53 a 4,78 (Tabela 4). Os menores valores de pH foram observados na presença de fosfato de alumínio e os maiores valores foram observados quando nenhuma fonte de fósforo foi adicionada. No geral, o pH apresentou correlação negativa (-0,196) com a quantidade de fósforo solubilizado. No entanto, quando as correlações foram analisadas em cada fonte de fósforo, foram observados elevados coeficientes, principalmente na presença dos fosfatos de alumínio (-0,730) e cálcio (-0,680). Essas correlações estão de acordo com os resultados obtidos por Nahas et al. (1994 b), que ao avaliarem a solubilização de fosfato por isolados bacterianos e fúngicos, observaram correlação negativa e significativa entre o pH e o fósforo solubilizado.

3.2. Potencial de solubilização de diferentes fosfatos naturais em solo sob mata de eucalipto

O potencial de solubilização de fosfatos naturais apresentou diferenças quanto às fontes de fósforo utilizadas, quanto à topografia e a classe de diâmetro das árvores (Tabela 5). O maior potencial de solubilização foi observado em solo rizosférico de árvores de diâmetro médio do topo na presença do fosfato de Catalão (Tabela 5). Esta fonte foi a mais solubilizada em todas as topografias, geralmente apresentando valores entre 166,89 µg de P e 619,34 µg de P (Tabela 5). O potencial de solubilização de fosfato da microbiota de solo sob plantio de eucalipto foi superior ao observado por Das et al. (1998), que analisou o efeito de inseticidas na solubilização de fosfato pela microbiota de solo agrícola. Os autores observaram aumento da capacidade de solubilização de fosfato na presença de inseticidas, sendo o maior valor (399 µg de P) obtido para o solo tratado com BHC. O potencial de solubilização de fosfato da microbiota de solo sob plantio de eucalipto foi maior também que o observado para solo rizosférico de arroz tratado com herbicidas (Debnath et al., 2002).

Considerando-se os resultados obtidos, o fosfato de Catalão é mais eficientemente solubilizado pela microbiota do solo, quando comparado ao fosfato de Araxá, o que sugere sua utilização como fertilizante fosfatado na área estudada.

As classes de diâmetro das árvores apresentaram diferenças no potencial de solubilização de fosfato de Catalão (Tabela 5). O mesmo não foi observado para o fosfato de Araxá. A topografia influenciou a solubilização

Tabela 5. Potencial de solubilização, em μg de P, em solos sob plantio do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* com 2,5 anos de idade, plantado em três posições topográficas distintas (Topo, Encosta, Baixada) e dividido em diferentes classes de diâmetro^{3/}, na região de Viçosa - MG, na presença de diferentes fosfatos naturais.

Topo				
	Superior	Médio	Inferior	Não-rizosférico
Catalão	619,34 Ab ^{1/}	1209,71 Aa	336,98 Ac	504,56 Ab
Araxá	56,43 Ba	56,75 Ba	51,66 Ba	52,21 Ba
Controle^{2/}	26,44 Ba	17,24 Ba	17,53 Ba	17,34 Ba
Encosta				
	Superior	Médio	Inferior	Não-rizosférico
Catalão	222,64 Ab	523,71 Aa	166,89 Ab	230,08 Ab
Araxá	47,54 Ba	42,71 Ba	27,08 Ba	28,13 Ba
Controle	17,56 Ba	17,40 Ba	17,43 Ba	17,52 Ba
Baixada				
	Superior	Médio	Inferior	Não-rizosférico
Catalão	243,11 Ac	447,20 Ab	214,47 Ac	583,25 Aa
Araxá	52,37 Ba	94,59 Ba	28,83 Ba	57,56 Ba
Controle	16,82 Ba	29,28 Ba	16,82 Ba	38,97 Ba

1/ Na coluna, em cada posição topográfica, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Na linha, médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

2/ Controle sem adição de fosfato.

3/ Na posição Topo, classe Inferior DAP < 7,3 cm, classe Média DAP entre 9 e 10 cm, e classe Superior DAP > 12,2 cm. Na posição Encosta, classe Inferior DAP < 5,3 cm, classe Média DAP entre 7,6 e 8,6 cm, e classe Superior DAP > 10,5 cm. Na posição Baixada, classe Inferior DAP < 8,7 cm, classe Média DAP entre 11,7 e 12,5 cm, e Superior DAP > 14,7 cm.

Tabela 6. pH final do sobrenadante do experimento de potencial de solubilização em solos sob plantio do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* com 2,5 anos de idade, plantado em três posições topográficas distintas (Topo, Encosta, Baixada) e dividido em diferentes classes de diâmetro^{3/}, na região de Viçosa - MG, na presença de diferentes fosfatos naturais.

	Topo			
	Superior	Médio	Inferior	Não-rizosférico
Catalão	4,01 Ba ^{1/}	3,81 Bb	3,91 Cab	3,83 Bb
Araxá	4,08 ABa	3,98 Aa	4,05 Ba	3,98 Aa
Controle^{2/}	4,14 Aa	4,03 Ab	4,17 Aa	4,02 Ab
	Encosta			
	Superior	Médio	Inferior	Não-rizosférico
Catalão	4,27 Ba	4,21 Ca	4,26 Ba	4,23 Ba
Araxá	4,34 ABab	4,33 Bab	4,31 Bb	4,44 Aa
Controle	4,43 Ab	4,45 Ab	4,64 Aa	4,49 Ab
	Baixada			
	Superior	Médio	Inferior	Não-rizosférico
Catalão	4,23 ABab	4,06 Bc	4,28 Ba	4,13 Bbc
Araxá	4,19 Bab	4,11 Bb	4,26 Ba	4,16 Bab
Controle	4,32 Aa	4,35 Aa	4,40 Aa	4,32 Aa

1/ Na coluna, em cada posição topográfica, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Na linha, médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

2/ Controle sem adição de fosfato.

3/ Na posição Topo, classe Inferior DAP < 7,3 cm, classe Média DAP entre 9 e 10 cm, e classe Superior DAP > 12,2 cm. Na posição Encosta, classe Inferior DAP < 5,3 cm, classe Média DAP entre 7,6 e 8,6 cm, e classe Superior DAP > 10,5 cm. Na posição Baixada, classe Inferior DAP < 8,7 cm, classe Média DAP entre 11,7 e 12,5 cm, e Superior DAP > 14,7 cm.

apenas do solo rizosférico de árvores de diâmetro médio na presença de fosfato de Catalão, com maior solubilização no topo.

O pH final do sobrenadante dos tubos apresentou diferenças quanto à fonte de fósforo utilizada, quanto à classe de diâmetro das árvores e quanto à topografia, variando de 3,81 a 4,64 (Tabela 6). O pH final apresentou correlação negativa com o fósforo solubilizado (-0,427), corroborando com os resultados obtidos por Nahas et al. (1994 b).

3.3. Atividade de fosfomonoesterases ácida e alcalina em solo de área plantada com eucalipto

A atividade de fosfomonoesterases ácida e alcalina apresentou diferenças quanto à topografia e quanto à classe de diâmetro das árvores (Tabela 7). As fosfatases ácida e alcalina apresentaram maior atividade nos solos rizosféricos do topo, em relação às demais posições topográficas. Esses resultados foram atribuídos ao maior teor de matéria orgânica presente nesse solo (Tabela 1), bem como ao maior conteúdo de serapilheira nesta área, uma vez que estudos anteriores demonstram que a atividade de fosfatases correlaciona-se positivamente como o teor de matéria orgânica do solo (Venkatesan et al., 2006) e com a presença de serapilheira (Dornbush, 2007). A menor atividade de fosfatases no solo não-rizosférico, em relação ao solo rizosférico, se deve à baixa densidade de populações microbianas, bem como ao menor conteúdo de carbono, o que limita a atividade microbiana e a produção de tais enzimas (Chen, 2003).

A fosfatase alcalina apresentou menor atividade do que a fosfatase ácida. A atividade das fosfatases ácidas tende a predominar em solos com baixos valores de pH, possivelmente em função do controle da secreção destas enzimas pela concentração de H^+ no solo (Nahas et al., 1982).

A atividade da fosfatase ácida observada neste trabalho variou de 24,50 a 190,67 μg de *p*-nitrofenol g^{-1} de solo h^{-1} (Tabela 7). Esses valores inferiores àqueles obtidos por Elfstrand et al. (2007), que observaram atividade na faixa de 200,0 a 659,2 μg de *p*-nitrofenol g^{-1} de solo h^{-1} para solos sob diferentes formas de manejo. Da mesma forma, Venkatesan et al. (2006) observaram valores de 592,06 e 506,66 μg de *p*-nitrofenol g^{-1} de solo h^{-1} , para solo sob plantio de chá e solo sob vegetação florestal respectivamente, na Índia. Nahas et al. (1994 a) também observaram valores superiores de atividade da fosfatase ácida em diferentes solos da região de Jaboticabal, SP, com valores variando entre 260,70 e 764,34 μg de *p*-nitrofenol g^{-1} de solo h^{-1} , para um solo hidromórfico e um latossolo roxo, respectivamente.

A atividade da fosfatase alcalina observada neste trabalho variou de 0,70 a 20,55 μg de *p*-nitrofenol g^{-1} de solo h^{-1} (Tabela 7). Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Böhme et al. (2005), que encontraram valores de 1,8 a 28,3 μg de *p*-nitrofenol g^{-1} de solo h^{-1} , para solos agrícolas da Alemanha sob diferentes formas de manejo.

Tabela 7. Atividade de fosfatases ácida e alcalina, em μg de *p*-nitrofenol g^{-1} de solo h^{-1} , em solos sob plantio do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* com 2,5 anos de idade, plantado em três posições topográficas distintas (Topo, Encosta, Baixada) e dividido em diferentes classes de diâmetro^{2/}, na região de Viçosa - MG.

Fosfatase ácida				
	Superior	Médio	Inferior	Não-rizosférico
Topo	187,69 Aa ^{1/}	190,67 Aa	161,65 Ab	28,92 Ac
Encosta	40,88 Ba	35,81 Ba	28,61 Ba	24,50 Aa
Baixada	27,12 Ba	31,21 Ba	31,64 Ba	28,05 Aa
Fosfatase alcalina				
	Superior	Médio	Inferior	Não-rizosférico
Topo	20,44 Aa	20,55 Aa	16,80 Ab	1,31 Ac
Encosta	3,07 Ba	2,00 Ba	2,79 Ba	0,70 Aa
Baixada	2,72 Ba	3,38 Ba	3,02 Ba	2,58 Aa

1/ Na coluna, em cada posição topográfica, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Na linha, médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

2/ Na posição Topo, classe Inferior DAP < 7,3 cm, classe Média DAP entre 9 e 10 cm, e classe Superior DAP > 12,2 cm. Na posição Encosta, classe Inferior DAP < 5,3 cm, classe Média DAP entre 7,6 e 8,6 cm, e classe Superior DAP > 10,5 cm. Na posição Baixada, classe Inferior DAP < 8,7 cm, classe Média DAP entre 11,7 e 12,5 cm, e Superior DAP > 14,7 cm.

3.4. Conclusões

- As diferenças no potencial de solubilização das fontes de fosfato e na atividade das fosfatases não foram suficientes para explicar as variações no crescimento das plantas entre as topografias ou entre as classes de diâmetro das árvores.
- A fonte inorgânica e o fosfato natural mais solubilizados pela microbiota do solo foram o fosfato de cálcio e o fosfato de Catalão, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASEA P. E. A., KUCEY R. M. N., STEWART J. W. B. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. **Soil Biology and Biochemistry**, **20**: 459-464, 1988.
- AZCON R., BAREA J. M., HAYMAN D. S. Utilization of rock phosphate in alkaline soils by plants inoculated with mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, **8**: 135-138, 1976.
- BARROS N. F., BRAGA J. M., BRANDI R. M., DEFELIPO B. V. Produção de eucalipto em solos de cerrados em resposta à aplicação de NPK e de B e Zn. **Revista Árvore**, **5**: 90-103, 1981.
- BÖHME L., LANGER U., BÖHME F. Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field experiments. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, **109**: 141-152, 2005.
- CHEN H. Phosphatase activity and P fractions in soils of an 18-year-old Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) plantation. **Forest Ecology and Management**, **178**: 301-310, 2003.
- DAS A.C., MURKHERJEE D. Insecticidal effects on soil microorganisms and their biochemical processes related to soil fertility. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, **14**: 903-909, 1998.
- DEBNATH A., DAS A. C., MUKHERJEE D. Studies on the decomposition of non-conventional organic wastes in soil. **Microbiology Research**, **149**: 195-201, 1994.

- DEBNATH A., DAS A. C., MUKHERJEE D. Persistence and effect of Butachlor and Basalin on the activities of phosphate solubilizing microorganisms in wetland rice soil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, **68**: 766-770, 2002.
- DORNBUSH M.E. Grasses, litter, and their interaction affect microbial biomass and soil enzyme activity. **Soil Biology and Biochemistry**, **39**: 2241-2249, 2007.
- ELFSTRAND S., HEDLUND K., MÅRTENSSON A. Soil enzyme activities, microbial community composition and function after 47 years of continuous green manuring. **Applied Soil Ecology**, **35**: 610-621, 2007.
- FILHO G. N. S., NARLOCH C., SCHARF R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **37**: 847-854, 2002.
- FREITAS J. R. DE, BANERJEE M. R., GERMIDA J. J. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not uptake of canola (*Brassica napus* L.). **Biology and Fertility of Soils**, **24**: 358-364, 1997.
- GOLDSTEIN A. H., BRAVERMAN K., OSORIO N. Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limiting desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium. **FEMS Microbiology Ecology**, **30**: 295-300, 1999.
- GONÇALVES J. L. M., FIRME D. J., NOVAIS R. F., RIBEIRO A. C. Cinética de adsorção de fósforo em solos de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, **9**: 107-111, 1985.
- GYANESHWAR P., KUMAR G. N., PAREKH L. J., POOLE P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, **245**: 83-93, 2002.
- JOHN M. K. Colorimetric determination of phosphorus in soil and plant materials with ascorbic acid. **Soil Science**, **109**: 214-220, 1970.
- KIRK G. J. D., SANTOS E. E., FINDENEGG G. R. Phosphate solubilization by anion excretion from rice (*Oryza sativa* L.) growing in aerobic soil. **Plant and Soil**, **211**: 11-18, 1999.
- KPOMBLEKOU-A K., TABATABAI M.A. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. **Soil Science**, **158**: 442-453, 1994.
- KUCEY R. M. N. Phosphate solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. **Canadian Journal of Soil Science**, **63**: 671-678, 1983.
- NAHAS E., TRENZI H.F. & ROSSI A. Effect of carbon source and pH on the production and secretion of acid phosphatase (EC 3.1.3.2.) and alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1.) in *Neurospora crassa*. **Journal of Genetics and Microbiology**, **128**: 2017-2021, 1982.

- NAHAS E., CENTURION J.F., ASSIS L.C. Efeito das características químicas dos solos sobre os microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, **18**: 49-53, 1994 a.
- NAHAS E., CENTURION J. F. & ASSIS L. C. Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, **18**: 43-48, 1994 b.
- NAHAS E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, **12**: 567-572, 1996.
- NAUTIYAL C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiological Letters**, **170**: 265-270, 1999.
- NAUTIYAL C. S., BHADAURIA S., KUMAR P., LAL H., MONDAL R., VERMA D. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. **FEMS Microbiology Letters**, **182**: 291-296, 2000.
- SYLVESTER-BRADLEY R., ASAKAWA N., TORRACA S. LA, MAGALHÃES F. M. M., OLIVEIRA L. A. E PEREIRA R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazônica**, **12**: 15-22, 1982.
- TABATABAI M. A. Soil enzymes. In: WEAVER R. W., ANGLE J. S., BOTTOMLEY P. S., BEZDICEK D., SMITH S., TABATABAI A., WOLLUM A. (Eds.) **Methods of soil analysis**. Part 2. Microbiological and biochemical properties. Madison: Soil Science Society of America, 1994. v.5, p. 775-833.
- VENKATESAN S., SENTHURPANDIAN V.K. Comparison of enzyme activity with depth under tea plantations and forested sites in south India. **Geoderma**, 2006, doi: [10.1016/j.geoderma.2006.08.011](https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2006.08.011).

CAPÍTULO II

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO DA RIZOSFERA DE EUCALIPTO.

André Marcos Massenssini, Maurício Dutra Costa, Arnaldo Chaer Borges, Marcos Rogério Tótola, Antônio Alberto Silva

RESUMO – Objetivou-se neste trabalho avaliar a sensibilidade de bactérias solubilizadoras de fosfato a formulações comerciais de glyphosate. Dessa forma, procedeu-se o isolamento de bactérias da rizosfera do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophilla* e a sua caracterização quanto à capacidade de solubilização de fosfato de cálcio, por meio da determinação do índice de solubilização em meio sólido. Foi determinada a capacidade de solubilização dos fosfatos de cálcio, ferro e alumínio em meio líquido e o efeito de diferentes doses de formulações comerciais do herbicida glyphosate (Roundup Transorb®, Roundup NA®, Zapp QI® e Scout®) na capacidade de solubilização de alguns isolados. Os isolados obtidos apresentaram diferenças quanto ao índice de solubilização (IS) de fosfato de cálcio, apresentando valores entre zero, relativo aos isolados que perderam a capacidade de solubilização, e 4,07. Também foram observadas diferenças entre os isolados quanto à sua capacidade de solubilização de fosfato em meio líquido. A presença de herbicidas no meio de cultura reduziu o crescimento da maioria dos isolados. Os isolados To 66 e To 3 foram os mais sensíveis à presença do herbicida Roundup Transorb®. Para o isolado To 66, a adição ao meio de cultura de Roundup Transorb® e Zapp QI® reduziu significativamente o potencial de solubilização deste isolado, enquanto o herbicida Scout® teve efeito oposto. O potencial de solubilização do isolado To 11 não foi alterado na presença dos herbicidas. Os herbicidas testados afetam o crescimento e a

capacidade de solubilização de alguns isolados in vitro, sendo necessário investigar se esse efeito também ocorre no solo.

1. INTRODUÇÃO

A disponibilidade de fósforo no solo é um dos principais fatores limitantes do crescimento vegetal no Brasil (Filho et al., 2002). Mesmo no caso do eucalipto, que é capaz de tolerar solos de baixa fertilidade, a adubação fosfatada é necessária para obtenção de boa produtividade (Barros et al., 1981). No entanto, a utilização de formas solúveis para a adubação de eucalipto requer a aplicação de doses superiores às necessárias ao crescimento da planta, tendo em vista que cerca de 90% do fósforo aplicado é rapidamente adsorvido às partículas de argila (Gonçalves et al., 1985).

Alguns microrganismos do solo são capazes de promover a solubilização de fosfatos no solo. Esse grupo de microrganismos solubilizadores de fosfato há muito vem sendo estudado (Kucey, 1983; Illmer e Schinner, 1992; Rodríguez e Fraga, 1999) e a caracterização de sua capacidade de solubilização é fundamental na escolha de estirpes para o desenvolvimento de biofertilizantes (Iguai et al., 2001).

As bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium* e *Erwinia* possuem a capacidade de solubilizar fosfatos naturais (Rodríguez e Fraga, 1999). Alguns desses gêneros possuem espécies com capacidade de promover o crescimento vegetal, e são denominadas PGPR (*plant growth promoting bacteria*). O gênero *Burkholderia* contém 29 espécies, sendo que várias delas são capazes de fixar N₂ atmosférico (Kennedy et al, 2004). Alguns gêneros da família Enterobacteriaceae, entre os quais *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*, possuem espécies fixadoras de N₂ atmosférico, além de exibirem a capacidade de promoção do crescimento vegetal (Kennedy et al, 2004).

Os microrganismos secretam ácidos orgânicos que promovem a solubilização de fosfatos insolúveis, como o fosfato de cálcio, o fosfato de ferro e o fosfato de alumínio, por meio da acidificação do ambiente (Nautiyal et al., 2000). No entanto, Kpombrekou-A e Tabatabai (1994) demonstraram que a habilidade dos ácidos orgânicos em solubilizar fosfatos não é dependente apenas do pH, mas também de características estruturais desses ácidos, que estão envolvidas na quelação de cátions. De modo geral, ácidos orgânicos alifáticos com maior número de grupos carboxil, com grupos β-hidroxil e com grupos carboxil próximos são mais efetivos na quelação de cátions polivalentes como Ca²⁺, Mg²⁺, Fe³⁺ e Al³⁺, presentes na estrutura de fosfatos de rocha. Os autores demonstraram também que, em baixas concentrações (1mmol L⁻¹), os ácidos orgânicos são mais efetivos na solubilização de fosfatos de rocha menos reativos, provavelmente em razão da menor quantidade de carbonatos livres presentes nessas rochas. Esses carbonatos consomem a acidez, com formação de dióxido de carbono, diminuindo a reação do ácido com o fosfato.

Alguns organismos podem solubilizar fosfatos naturais pela extrusão de prótons acompanhada da assimilação de NH_4^+ (Asea et al., 1988). Entretanto, a correlação entre diminuição do pH e solubilização de fosfato não é muito clara (Filho et al., 2002). Geralmente, bactérias gram-negativas são eficientes em solubilizar fosfato como resultado da oxidação extracelular de glicose a ácido glucônico pela quinoproteína glicose desidrogenase (Goldstein et al., 1999).

A utilização de bactérias do gênero *Thiobacillus* para solubilização de fosfato natural pode ser uma alternativa viável, já que essas bactérias são capazes de produzir H_2SO_4 a partir da oxidação de enxofre elementar (S^0) adicionado ao fosfato de rocha (Ghani et al., 1994). O aumento obtido na quantidade de fosfato solúvel deve-se, principalmente, à acidificação do meio, que leva à dissociação de íons fosfato.

Muitos estudos têm demonstrado que a utilização de microrganismos solubilizadores de fosfato como biofertilizantes é um campo promissor, tendo em vista que a inoculação de plantas com esses microrganismos promove frequentemente maior desenvolvimento vegetal (Rahman e Parsons, 1997; Singh e Kapoor, 1999; Freitas et al., 1997).

Vários fatores influenciam a capacidade de solubilização desses microrganismos, como a fonte de carbono e nitrogênio disponíveis (Nautiyal et al., 2000; Asea et al., 1988), o tipo de planta cultivada (Grayston et al., 1996), o tipo de fosfato a ser solubilizado (Nahas, 1996; Barroso e Nahas, 2005), entre outros, como a presença de herbicidas ou inseticidas. Das e Murkherjee (1998) observaram aumento da capacidade de solubilização de fosfato da microbiota de um solo agrícola na presença de inseticidas. Resultados semelhantes foram obtidos por Debnath et al. (2002), analisando o efeito de herbicidas na

atividade de microrganismos solubilizadores de fosfato de cálcio no solo rizosférico de arroz. Os autores reportaram aumento na densidade populacional e na atividade desse grupo de microrganismos em razão da aplicação dos herbicidas butachlor e basalín. Dessa forma, a heterogeneidade encontrada no solo limita a reprodutibilidade de resultados obtidos *in vitro* em situações de campo.

O herbicida glyphosate é rotineiramente utilizado em plantios de eucalipto para controle de plantas daninhas. Este herbicida inibe a enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (EPSP), envolvida na síntese de aminoácidos aromáticos, que está presente não só em plantas superiores, como também em fungos e bactérias (Fischer et al., 1986). Dessa forma, a aplicação de glyphosate pode interferir em processos mediados por microrganismos do solo, podendo afetar indiretamente a produtividade da cultura. Estudos anteriores demonstraram que a presença de glyphosate reduz o crescimento *in vitro* de microrganismos do solo (Quinn et al., 1988).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi isolar e caracterizar microrganismos solubilizadores de fosfato presentes na rizosfera do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* quanto à sua capacidade de solubilizar os fosfatos de cálcio, ferro e alumínio *in vitro*, e a influência do herbicida glyphosate em diferentes formulações comerciais (Roundup Transorb[®], Zapp QI[®], Roundup NA[®] e Scout[®]) no crescimento e na capacidade de solubilização de fosfato dos isolados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Caracterização da área

Os isolados bacterianos foram obtidos de solo sob plantio clonal do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophilla* com 2,5 anos de idade e espaçamento 3 x 3 m, localizado no município de Viçosa, MG. A área apresenta topografia típica em meia-laranja de vertente côncavo-convexa, resultando em três posições topográficas distintas: Topo (S, 20° 48' 10,0" e O, 42° 54' 08,4"), Encosta (S, 20° 48' 07,0" e O, 42° 54' 0,57") e Baixada (S, 20° 48' 03,2" e O, 42° 54' 05,7"). A área do Topo é caracterizada por conter árvores de diâmetro médio de 9,7 cm e 2.460 kg ha⁻¹ de serapilheira.

Amostras compostas do solo do Topo foram coletadas na camada de 0-20 cm para a caracterização física e química (Tabela 1). Para o isolamento de bactérias solubilizadoras de fosfato foram coletadas aleatoriamente, na camada de 0-20 cm, amostras simples de solo rizosférico de cinco árvores para

a confecção de uma amostra composta. As amostras foram imediatamente transportadas para o laboratório para o isolamento das bactérias.

2.2. Isolamento de bactérias solubilizadoras de fosfato de solo sob mata de eucalipto

O isolamento de bactérias solubilizadoras de fosfato foi realizada a partir da suspensão de 10 gramas de solo de uma amostra composta em 90 mL de solução salina (NaCl 0,85%) para formar a diluição 10^{-1} . Para as demais diluições, foi transferido 1 mL da diluição anterior para tubos contendo 9 mL de solução salina até a diluição de 10^{-6} . Alíquotas de 0,1 mL das diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} foram inoculadas na superfície do meio NBRIP sólido (Nautiyal, 1999), suplementado com fosfato de cálcio, e espalhadas com o auxílio de alça de Drigalsky. De cada uma das diluições, foram retiradas três alíquotas para o plaqueamento. As placas inoculadas foram incubadas a 30°C até o aparecimento das colônias, e as bactérias solubilizadoras de fosfato foram selecionadas pela presença de halos de solubilização em torno da colônia. As colônias que produziram o halo de solubilização em meio NBRIP foram repicadas para novas placas para isolamento de culturas puras e confirmação da capacidade de solubilização de fosfato. Cada isolado obtido foi inoculado em Caldo Nutriente (1000 mL de água destilada, 2 g de Na_2HPO_4 , 3 g de NaCl, 3 g de extrato de carne e 5 g de peptona; pH 6,8) por 12 h a 28°C . Uma alíquota de 1 mL do caldo nutriente foi misturada a 1 mL de glicerol a 80%, congelada em nitrogênio líquido e mantida em ultrafreezer a -86°C .

Tabela 1. Características químicas e físicas do solo de área plantada com o híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* com 2,5 anos de idade, na região de Viçosa - MG.

Característica	Valores
pH-H ₂ O (1:2,5)	4,86
Al ³⁺ (cmol _c dm ⁻³) ^{1/}	0,82
Ca ²⁺ (cmol _c dm ⁻³) ^{1/}	0,17
Mg ²⁺ (cmol _c dm ⁻³) ^{1/}	0,40
H+Al (cmol _c dm ⁻³) ^{2/}	10,5
K (mg dm ⁻³) ^{3/}	40,0
P (mg dm ⁻³) ^{3/}	2,2
P-remanescente (mg L ⁻¹) ^{4/}	17,0
MO (dag kg ⁻¹) ^{5/}	5,50
SB (cmol _c dm ⁻³)	0,67
t (cmol _c dm ⁻³)	1,49
T (cmol _c dm ⁻³)	11,17
m (%)	55,0
V (%)	6,0
Areia grossa (%)	22
Areia fina (%)	11
Silte (%)	5
Argila (%)	62
Classe textural	Muito Argilosa

^{1/} Extrator KCl 1 mol L⁻¹ (Vettori, 1969). ^{2/} Extrator acetato de cálcio 0,5 mol L⁻¹, pH 7,0 (Vettori, 1969). ^{3/} Extrator Mehlich-1 (Defelipo & Ribeiro, 1997). ^{4/} Concentração de P na solução de equilíbrio, após agitar por 1h o solo com CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹, contendo 60 mg L⁻¹ de P em relação solo:solução de 1:10 (Alvarez et al., 2000). ^{5/} Método Walkey & Black (Jackson, 1958).

2.3. Determinação do índice de solubilização (IS) de fosfato de cálcio

Duas placas de Petri contendo 25 mL de meio Glicose-Extrato de Levedura, suplementado com fosfato de cálcio, foram inoculadas com cada isolado bacteriano obtido, por meio da realização de três picadas eqüidistantes na superfície do meio. As placas inoculadas foram incubadas a 28°C e avaliadas diariamente em relação ao aparecimento de halo de solubilização de fosfato de cálcio ($\text{Ca}_5\text{P}_3\text{HO}_{13}$). O índice de solubilização (IS) foi calculado aos 7 dias de incubação, dividindo-se o diâmetro do halo pelo diâmetro da colônia, conforme descrito por Kumar e Narula (1999). Os isolados foram classificados de acordo com o seu índice de solubilização em: baixa solubilização ($\text{IS} < 2$), média solubilização ($2 < \text{IS} < 3$) e alta solubilização ($\text{IS} > 3$) (Silva Filho e Vidor, 2000).

2.4. Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio, ferro e alumínio em ágar Glicose - Extrato de Levedura

Três placa de Petri contendo 25 mL de meio Glicose-Extrato de Levedura, com adição de diferentes fontes inorgânicas de fósforo ($\text{Ca}_5\text{P}_3\text{HO}_{13}$, FePO_4 ou AlPO_4), em quantidade equivalente a 5 g de P L⁻¹, foram inoculadas com cada isolado bacteriano, por meio da realização de três picadas eqüidistantes na superfície do meio. As placas inoculadas foram incubadas a 28°C e avaliadas diariamente em relação ao aparecimento de halo de solubilização de fosfato. Após 7 dias de incubação, foi determinada a capacidade dos isolados de solubilizar cada uma das fontes de fósforo

testadas, observando-se a presença ou ausência de halos de solubilização em torno das colônias.

2.5. Solubilização de fosfato de cálcio, ferro e alumínio em meio NBRIP

A solubilização de fontes inorgânicas de fosfato foi determinada por meio da incubação de 50 mL de meio NBRIP Líquido (Nautiyal, 1999), com adição de diferentes fontes inorgânicas de fósforo ($\text{Ca}_5\text{P}_3\text{HO}_{13}$, FePO_4 ou AlPO_4), em quantidade equivalente a 5 g de P L^{-1} , inoculado com 6 isolados bacterianos, 2 de alta solubilização ($\text{IS} > 3$), To 7 e To 47; 2 de média solubilização ($2 < \text{IS} < 3$), To 66 e To 3; 2 de baixa solubilização ($\text{IS} < 2$), To 11 e To 32; e controle sem inoculação, em erlenmeyers de 125 mL a 30°C por 3 dias, com três repetições. Um tratamento controle, sem adição de fosfato, foi também incluído. A inoculação foi realizada por meio de uma alçada, transferindo-se células previamente cultivadas por 12 h a 30°C em tubos de Ágar Nutriente inclinado. Ao final do experimento, foram determinados o fósforo solúvel pelo método colorimétrico descrito por John (1970), o pH final e a acidez titulável (Nahas, 1996).

2.6. Crescimento de isolados solubilizadores de fosfato na presença de herbicidas

O crescimento dos isolados To 3, To 7, To 11, To 32, To 47 e To 66 foi avaliado na presença dos herbicidas Roundup Transorb[®], Zapp QI[®], Roundup NA[®] e Scout[®]. Foram testadas as doses de 0, 30, 60 e 120 mg L^{-1} do princípio

ativo, correspondente a 0, ½, 1 e 2x a dose comercial recomendada. Todos esses produtos contêm glyphosate como princípio ativo de sua formulação. O experimento foi conduzido em placas de Elisa contendo 150 µL de meio Caldo Nutriente, suplementado com as devidas doses dos herbicidas, e inoculadas com células previamente cultivadas por 12 h a 30 °C em Caldo Nutriente. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 h e o crescimento dos isolados foi avaliado em intervalos de 1 hora por meio da densidade óptica a 560 nm. Os dados de absorvância foram ajustados de acordo com o modelo logístico (Draper, 1981) e os coeficientes das regressões foram comparados utilizando o teste F a 5% de probabilidade.

2.7. Solubilização de fosfato de cálcio, ferro e alumínio na presença de herbicidas

A solubilização de fontes inorgânicas de fosfato foi determinada por meio da incubação de 50 mL de meio NBRIP Líquido (Nautiyal, 1999), com adição de diferentes fontes inorgânicas de fósforo ($\text{Ca}_5\text{P}_3\text{HO}_{13}$, FePO_4 ou AlPO_4), em quantidade equivalente a 5 g de P L⁻¹, suplementado com 60 mg L⁻¹ de glyphosate, correspondente à dose comercial dos herbicidas Roundup Transorb[®], Zapp QI[®], Roundup NA[®] e Scout[®], inoculado com os isolados To 11 e To 66, escolhidos de acordo com sua resistência aos herbicidas, e controle sem inoculação, em erlenmeyers de 125 mL a 30°C e 200rpm por 3 dias, com três repetições. Um tratamento controle sem adição de fosfato foi também incluído. A inoculação foi realizada por meio de uma alçada, transferindo-se células previamente cultivadas por 12 h a 30 °C em tubos de Ágar Nutriente inclinado. Ao final do experimento, foram determinados o fósforo solúvel pelo

método colorimétrico descrito por John (1970), o pH final e a acidez titulável (Nahas, 1996).

2.8. Análises estatísticas

Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foram analisadas, também, as correlações simples de Pearson entre fósforo solubilizado e as variáveis pH e acidez titulável, a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Índice de solubilização (IS) de fosfato de cálcio

Os isolados bacterianos diferiram quanto à capacidade de solubilizar fosfato de cálcio *in vitro* (Tabela 2, Figura 1), apresentando índices de solubilização (IS) entre zero, relativo aos microrganismos que perderam a capacidade de solubilização, e 4,07. A maioria dos isolados apresentaram IS variando de zero a 2,17, com exceção dos isolados To 7, To 1 e To 47, que apresentaram índices superiores a 3,15.

Variações no potencial de solubilização de fosfato por microrganismos têm sido observadas por vários autores, sendo utilizada como uma das principais características no processo de seleção (Illmer & Schinner, 1992; Silva Filho & Vidor, 2000). Dessa forma, os isolados solubilizadores de fosfato foram classificados quanto ao seu índice de solubilização, de acordo com Silva

Tabela 2. Diâmetro do halo, diâmetro da colônia e índices de solubilização de fosfato de cálcio de bactérias isoladas da rizosfera do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, cultivados em meio Glicose-Extrato de Levedura a 28°C, após 7 dias de crescimento.

Isolado	Diâmetro do halo (mm)	Diâmetro da colônia (mm)	IS ^{1/}
To 1	12,00 d ^{2/}	3,83 f	3,15 b
To 2	0,00 g	8,00 d	0,00 f
To 3	15,17 c	7,50 d	2,05 c
To 4	13,67 c	8,33 d	1,65 c
To 5	15,83 b	13,33 b	1,19 d
To 6	8,83 d	8,83 d	1,00 d
To 7	14,00 c	3,50 f	4,07 a
To 8	12,83 c	8,17 d	1,58 c
To 9	16,00 b	13,17 b	1,22 d
To 10	9,33 d	9,00 d	1,04 d
To 11	4,00 f	15,33 a	0,38 e
To 12	14,50 c	11,83 c	1,23 d
To 13	16,17 b	8,50 d	1,93 c
To 14	14,67 c	8,17 d	1,81 c
To 15	16,33 b	8,83 d	1,85 c
To 16	8,83 d	8,83 d	1,00 d
To 19	14,17 c	8,17 d	1,78 c
To 20	5,33 f	3,00 f	1,78 c
To 21	0,00 g	8,50 d	0,00 f
To 23	14,00 c	8,00 d	1,84 c
To 24	14,67 c	7,83 d	1,96 c
To 25	13,67 c	8,00 d	1,75 c
To 26	0,00 g	9,33 d	0,00 f
To 28	15,17 c	8,83 d	1,72 c
To 29	16,17 b	8,33 d	2,06 c
To 31	0,00 g	4,67 e	0,00 f
To 32	19,17 a	13,00 b	1,49 c
To 34	9,83 d	8,50 d	1,11 d
To 35	0,00 g	7,00 d	0,00 f
To 36	12,83 c	8,33 d	1,55 c
To 37	14,00 c	8,67 d	1,63 b
To 38	0,00 g	3,50 f	0,00 f
To 39	7,83 e	4,67 e	1,68 c
To 40	6,50 e	4,17 e	1,58 c
To 41	19,17 a	14,17 a	1,36 d
To 42	10,17 d	8,17 d	1,31 d
To 47	14,83 c	4,67 e	3,26 b
To 49	4,33 f	8,67 d	0,54 e
To 55	2,00 g	9,00 d	0,20 f
To 57	8,67 d	6,83 d	1,27 d
To 60	13,00 c	8,17 d	1,59 c
To 65	15,67 b	8,83 d	1,79 c
To 66	16,83 b	7,83 d	2,17 c

^{1/}Índice de solubilização = diâmetro do halo/diâmetro da colônia.

^{2/}Na coluna, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Filho & Vidor (2000). Assim, os isolados To 1, To 7 e To 47 são considerados muito solubilizadores, com potencial entre de 3,15 a 4,07; os isolados To 3, To 29 e To 66 são considerados de potencial médio, com potencial entre 2,05 e 2,17 e os demais isolados são considerados como pouco solubilizadores, com potencial variando entre zero a 1,96.

Os índices de solubilização observados neste trabalho são semelhantes aos obtidos por Kumar et al. (1999), com valores situados entre 1,3 e 2,3 para linhagens de *Azotobacter chroococcum*. São semelhantes também aos obtidos por Silva Filho & Vidor (2000), que observaram índices variando entre zero e 5,07 para isolados bacterianos e fúngicos cultivados na presença de diversas fontes de carbono.

3.2. Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio, ferro e alumínio em ágar Glicose - Extrato de Levedura

Dentre os isolados obtidos, nenhum foi capaz de solubilizar fosfato de ferro ou alumínio ao ponto de se tornar visível o halo de solubilização. Dessa forma, esses isolados foram considerados incapazes de solubilizar essas fontes de fósforo. Este resultado pode refletir a metodologia de isolamento utilizada, baseada na solubilização de fosfato de cálcio. Muitos microrganismos capazes de solubilizar esta fonte de fosfato não são capazes de solubilizar os fosfatos de ferro e alumínio (Gyaneshwar et al., 1999). Todos os isolados foram capazes de crescer na presença de fosfato de ferro ou alumínio (Figura 2). Isso pode ser explicado em parte pela solubilidade desses fosfatos, e também pela presença de extrato de levedura no meio de cultura, o que possibilitou o crescimento bacteriano.

Outra possibilidade é a “solubilização passiva” por parte dos isolados, que ao absorverem o fósforo em solução e, ou íons Fe^{3+} e Al^{3+} , deslocam o equilíbrio da reação no sentido dos produtos de solubilização (Bolan et al., 1997). Essa hipótese é reforçada pelas alterações morfológicas observadas nas colônias de alguns isolados, como a alteração na coloração e rugosidade, na presença dos fosfatos de ferro e alumínio. As colônias cultivadas na presença de fosfato de ferro geralmente apresentaram coloração avermelhada, provavelmente por causa da absorção do íon Fe^{3+} .

3.3. Solubilização de fosfato de cálcio, ferro e alumínio em meio NBRIP

Os isolados diferiram quanto à sua capacidade de solubilizar os fosfatos de cálcio, ferro e alumínio em meio NBRIP, apresentando valores médios de fósforo solúvel entre 2503,91 e 7928,90 μg de P (Tabela 3). O pH final do meio de cultura variou de 3,66 a 3,89 entre os isolados, que reduziram significativamente o pH em relação ao controle. A acidez titulável produzida pelos isolados também apresentou diferenças significativas, variando, em média, de 0,274 a 0,998 mg de NaOH mL^{-1} .

A solubilização de fósforo pelos isolados apresentou diferenças significativas quanto à fonte inorgânica de fosfato adicionada ao meio (Tabela 3). O fosfato de cálcio foi o mais solubilizado, apresentando valor médio de 15990,77 μg de P para os isolados, seguido do fosfato de alumínio, com valor médio de 989,05 μg de P (Tabela 3). O fosfato de ferro foi o menos solubilizado, com valor médio de 141,22 μg de P. O pH final médio do meio de cultura apresentou diferenças para cada fonte de fósforo, sendo o maior valor

Tabela 3. Acidez titulável, pH final e fósforo solubilizado por bactérias isoladas a partir de solo rizosférico do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, e cultivadas em meio NBRIP líquido por 3 dias a 30 °C. na presença dos fosfatos de cálcio, ferro e alumínio.

mg NaOH mL ⁻¹				
	Ca ₅ P ₃ HO ₁₃	FePO ₄	AlPO ₄	Média
To 7	2,816 Aa ^{1/}	0,064 Ab	0,113 ABb	0,998 A
To 47	1,975 Ba	0,056 Ab	0,105 ABb	0,712 BC
To 66	2,047 Ba	0,132 Ab	0,207 ABb	0,795 B
To 3	1,768 Ca	0,097 Ab	0,184 ABb	0,683 C
To 11	0,473 Ea	0,097 Ac	0,252 Ab	0,274 E
To 32	1,417 Da	0,073 Ab	0,128 ABb	0,540 D
Controle ^{2/}	0,031 Fa	0,027 Aa	0,027 Ba	0,028 F
Média	1,504 a	0,078 c	0,145 b	0,576
pH				
	Ca ₅ P ₃ HO ₁₃	FePO ₄	AlPO ₄	Média
To 7	4,33 Ca	3,41 BCc	3,72 Bb	3,82 B
To 47	4,18 Ca	3,52 Bc	3,71 BCb	3,80 B
To 66	4,18 Ca	3,38 BCb	3,43 Eb	3,67 C
To 3	4,18 Ca	3,30 Cc	3,50 CDEb	3,66 C
To 11	4,74 Ba	3,38 BCc	3,46 DEb	3,86 B
To 32	4,60 Ba	3,41 BCc	3,65 BCDb	3,89 B
Controle	6,46 Aa	4,38 Ac	5,46 Ab	5,43 A
Média	4,67 a	3,54 c	3,85 b	4,02
µg de P				
	Ca ₅ P ₃ HO ₁₃	FePO ₄	AlPO ₄	Média
To 7	18181,69 Ba	80,17 Ab	795,51 Ab	6352,46 B
To 47	21711,94 Aa	137,02 Ab	924,52 Ab	7591,16 A
To 66	21784,96 Aa	165,91 Ac	1357,51 Ab	7769,46 A
To 3	22259,33 Aa	201,91 Ac	1325,46 Ab	7928,90 A
To 11	6060,08 Ca	196,75 Ac	1254,91 Ab	2503,91 C
To 32	21555,29 Aa	92,67 Ab	865,44 Ab	7504,47 A
Controle	382,09 Da	114,14 Aa	400,02 Aa	298,75 D
Média	15990,77 a	141,22 c	989,05 b	5707,01

1/ Na coluna, médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Na linha, médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2/ Controle sem inoculação.

observado para o fosfato de cálcio e o menor para o fosfato de ferro (Tabela 3). A acidez titulável também apresentou variações entre as fontes de fósforo, com valores médios entre 1,504 mg de NaOH mL⁻¹ na presença de fosfato de cálcio e 0,078 mg de NaOH mL⁻¹ na presença de fosfato de ferro (Tabela 3).

Os isolados diferiram quanto à solubilização de fosfato de cálcio. No entanto, nenhum isolado solubilizou significativamente os fosfatos de ferro ou alumínio (Tabela 3). A quantidade de fósforo solubilizado pelos isolados variou de 6060,08 a 22259,33 µg de P (Tabela 3), referente aos isolados To 11 e To 3 respectivamente, na presença de fosfato de cálcio. Os valores de fósforo solubilizado pelos isolados nos tratamentos suplementados com fosfato de alumínio, que foram muito maiores que os observados no controle, não apresentaram diferença significativa em decorrência do grande coeficiente de variação dos dados.

Quando se subtraem dos dados de solubilização os valores obtidos nos controles e se expressam os valores de solubilização em termos de concentração, os padrões gerais são mantidos; no entanto, observam-se alguns valores negativos de solubilização (Tabela 4), indicando que houve maior consumo de fósforo solúvel pelos isolados do que solubilização dos fosfatos, o que é possível tendo em vista a baixa solubilidade desses fosfatos. Resultados semelhantes foram obtidos por Nahas (1996) ao analisar a capacidade de solubilização de diferentes tipos de fosfato por isolados bacterianos.

Os valores de solubilização de fosfato de cálcio observados neste trabalho foram semelhantes aos observados por Chen et al. (2006), que avaliaram vários isolados bacterianos quanto à sua capacidade de solubilizar

Tabela 4. Acidez titulável, pH final e solubilização líquida de fósforo por bactérias isoladas a partir de solo rizosférico do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, e cultivadas em meio NBRIP líquido, na presença dos fosfatos de cálcio, ferro e alumínio, por 3 dias a 30 °C.

	pH		
	Ca ₅ P ₃ HO ₁₃	FePO ₄	AlPO ₄
To 7	4,33 Ba ^{1/}	3,41 ABc	3,72 Ab
To 47	4,18 Ba	3,52 Ac	3,71 Ab
To 66	4,18 Ba	3,38 ABb	3,43 Cb
To 3	4,18 Ba	3,30 Bc	3,50 BCb
To 11	4,74 Aa	3,38 ABb	3,46 Cb
To 32	4,60 Aa	3,41 ABc	3,65 ABb
	mg NaOH mL ⁻¹		
	Ca ₅ P ₃ HO ₁₃	FePO ₄	AlPO ₄
To 7	2,816 Aa	0,064 Ab	0,113 Ab
To 47	1,975 Ba	0,056 Ab	0,105 Ab
To 66	2,047 Ba	0,132 Ab	0,207 Ab
To 3	1,768 Ca	0,097 Ab	0,184 Ab
To 11	0,473 Ea	0,097 Ab	0,252 Ab
To 32	1,417 Da	0,073 Ab	0,128 Ab
	µg de P mL ⁻¹		
	Ca ₅ P ₃ HO ₁₃	FePO ₄	AlPO ₄
To 7	356,24 Ba	-0,44 Ab	8,15 Ab
To 47	426,17 Aa	-1,76 Ab	10,07 Ab
To 66	427,85 Aa	0,83 Ab	18,95 Ab
To 3	437,30 Aa	1,51 Ab	18,26 Ab
To 11	113,34 Ca	1,44 Ab	16,88 Ab
To 32	423,11 Aa	-0,79 Ab	8,95 Ab

1/ Na coluna, médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Na linha, médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

fosfato de cálcio. No entanto, foram inferiores aos obtidos por Barroso et al. (2005), que avaliaram isolados fúngicos quanto à sua capacidade de solubilização de diferentes fontes inorgânicas de fosfato.

A solubilização das fontes inorgânicas de fosfato apresentou correlação geral positiva e significativa com a acidez titulável (0,553, $p < 0,05$). O pH também se correlacionou positivamente com a solubilização; no entanto, essa correlação não foi significativa. Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos por Barroso et al. (2005) e Nahas (1996), que observaram correlação positiva e significativa entre acidez titulável e fósforo solubilizado, não sendo observada correlação significativa entre o pH final e a solubilização de fosfato.

A correlação entre fósforo solubilizado e acidez titulável é maior quando analisada para cada fonte inorgânica de fosfato, sendo que os fosfatos de cálcio (0,830, $p < 0,05$) e alumínio (0,879, $p < 0,05$) apresentaram os maiores valores. A correlação entre pH final e fósforo solubilizado torna-se negativa quando analisada para cada fonte inorgânica de fosfato; no entanto, essa correlação é significativa, apenas, para os fosfatos de cálcio (-0,866, $p < 0,05$) e alumínio (-0,803, $p < 0,05$). Fato semelhante foi relatado por Nahas (1996), que observou correlações significativas entre pH e fósforo solubilizado apenas na presença de alguns fosfatos.

3.4. Crescimento de isolados solubilizadores de fosfato na presença de herbicidas

Os herbicidas afetaram negativamente o crescimento dos isolados bacterianos testados (Figuras 3, 4, 5 e 6). Na presença dos herbicidas, houve

geralmente redução da taxa de crescimento, expressa como diminuição na inclinação das curvas durante a fase log. Esta, por sua vez, teve a sua duração reduzida na presença dos herbicidas (Figuras 3, 4, 5 e 6). Nos tratamentos com a dose zero, a fase estacionária foi atingida em valores de absorvância superiores aos observados para os tratamentos com adição de qualquer dose dos herbicidas (Figuras 3, 4, 5 e 6). Em alguns casos, não foi observada uma fase estacionária típica em decorrência do intervalo de tempo amostrado, que não foi suficiente para detectar a interrupção do crescimento dos isolados.

Os isolados mais afetados pela presença dos herbicidas foram o To 66 e o To 3, que tiveram seu crescimento drasticamente reduzido a cada aumento na dose dos herbicidas (Figuras 3, 4, 5 e 6). Por outro lado, os isolados To 32 e To 11 apresentaram pequenas reduções no crescimento com o aumento na dose. Já os isolados To 7 e To 47 tiveram o crescimento drasticamente reduzido na presença dos herbicidas, independentemente da dose fornecida (Figuras 3, 4, 5 e 6).

Entre os herbicidas testados, os que mais reduziram o crescimento dos isolados foram o Roundup Transorb[®] e o Roundup NA[®], enquanto os herbicidas Zapp QI[®] e Scout[®] promoveram reduções mais brandas no crescimento dos isolados (Figuras 3, 4, 5 e 6).

A partir das regressões feitas para os dados de crescimento dos isolados na presença dos herbicidas (Tabelas 5, 6, 7 e 8), observou-se que os coeficientes obtidos para cada dose diferem entre si em todos os casos observados. Dessa forma, a diferença na concentração do princípio ativo entre as doses foi suficiente para provocar o crescimento diferencial dos isolados, seja na taxa de crescimento ou no valor de absorvância observado na fase estacionária (Draper, 1981).

Tabela 5. Equações ajustadas para os dados de crescimento dos isolados bacterianos, na presença de diferentes doses do herbicida glyphosate na formulação comercial Roudup Transorb®.

To 7		
Dose (mg L⁻¹)	Equação ajustada	R²
0	$\hat{Y}=0,7074/(1+6,0277 \cdot e^{-0,2335X})$	0,99427
30	$\hat{Y}=0,5466/(1+2,4729 \cdot e^{-0,1148X})$	0,99387
60	$\hat{Y}=0,5029/(1+2,1146 \cdot e^{-0,1090X})$	0,98867
120	$\hat{Y}=0,5312/(1+1,5759 \cdot e^{-0,0754X})$	0,97583
To 47		
Dose (mg L⁻¹)	Equação ajustada	R²
0	$\hat{Y}=0,7056/(1+5,1498 \cdot e^{-0,2317X})$	0,98568
30	$\hat{Y}=0,4326/(1+0,6232 \cdot e^{-0,0771X})$	0,85765
60	$\hat{Y}=0,4342/(1+0,7591 \cdot e^{-0,0286X})$	0,91240
120	$\hat{Y}=95192,42/(1+301867,6 \cdot e^{-0,0082X})$	0,71949
To 32		
Dose (mg L⁻¹)	Equação ajustada	R²
0	$\hat{Y}=0,8658/(1+4,7832 \cdot e^{-0,1379X})$	0,99720
30	$\hat{Y}=0,7034/(1+1,9971 \cdot e^{-0,0951X})$	0,98241
60	$\hat{Y}=0,6595/(1+1,9924 \cdot e^{-0,0830X})$	0,97420
120	$\hat{Y}=0,9107/(1+2,6681 \cdot e^{-0,0367X})$	0,98688
To 66		
Dose (mg L⁻¹)	Equação ajustada	R²
0	$\hat{Y}=1,0771/(1+9,3186 \cdot e^{-0,1146X})$	0,99544
30	$\hat{Y}=0,8067/(1+3,8963 \cdot e^{-0,0674X})$	0,99392
60	$\hat{Y}=2764,61/(1+13380,44 \cdot e^{-0,0203X})$	0,97788
120	$\hat{Y}=140834,8/(1+675643,9 \cdot e^{-0,0156X})$	0,94002
To 11		
Dose (mg L⁻¹)	Equação ajustada	R²
0	$\hat{Y}=0,8023/(1+3,2295 \cdot e^{-0,1148X})$	0,99684
30	$\hat{Y}=0,7380/(1+2,0773 \cdot e^{-0,0647X})$	0,99424
60	$\hat{Y}=0,7545/(1+2,0123 \cdot e^{-0,0568X})$	0,99435
120	$\hat{Y}=1,4277/(1+3,7874 \cdot e^{-0,0226X})$	0,98395
To 3		
Dose (mg L⁻¹)	Equação ajustada	R²
0	$\hat{Y}=0,9999/(1+10,6806 \cdot e^{-0,1373X})$	0,99382
30	$\hat{Y}=0,7730/(1+4,4929 \cdot e^{-0,0829X})$	0,98534
60	$\hat{Y}=1,1027/(1+5,1319 \cdot e^{-0,0379X})$	0,98407
120	$\hat{Y}=0,6699/(1+2,5406 \cdot e^{-0,0404X})$	0,96723

Tabela 6. Equações ajustadas para os dados de crescimento dos isolados bacterianos, na presença de diferentes doses do herbicida glyphosate na formulação comercial Zapp QI[®].

To 7		
Dose (mg L ⁻¹)	Equação ajustada	R ²
0	$\hat{Y}=0,7016/(1+5,9974 \cdot e^{-0,2338X})$	0,99391
30	$\hat{Y}=0,5979/(1+5,4181 \cdot e^{-0,2366X})$	0,99486
60	$\hat{Y}=0,5624/(1+3,7552 \cdot e^{-0,1828X})$	0,99400
120	$\hat{Y}=0,5598/(1+3,6537 \cdot e^{-0,1653X})$	0,99536
To 47		
Dose (mg L ⁻¹)	Equação ajustada	R ²
0	$\hat{Y}=0,7000/(1+4,3525 \cdot e^{-0,2190X})$	0,97982
30	$\hat{Y}=0,5141/(1+4,1398 \cdot e^{-0,3249X})$	0,90022
60	$\hat{Y}=0,4899/(1+3,2429 \cdot e^{-0,3106X})$	0,88953
120	$\hat{Y}=0,4502/(1+1,9949 \cdot e^{-0,2430X})$	0,96122
To 32		
Dose (mg L ⁻¹)	Equação ajustada	R ²
0	$\hat{Y}=0,8593/(1+3,9137 \cdot e^{-0,1239X})$	0,99732
30	$\hat{Y}=0,8049/(1+2,8100 \cdot e^{-0,1148X})$	0,99167
60	$\hat{Y}=0,7757/(1+2,2908 \cdot e^{-0,1019X})$	0,98506
120	$\hat{Y}=0,7337/(1+2,3943 \cdot e^{-0,0971X})$	0,98673
To 66		
Dose (mg L ⁻¹)	Equação ajustada	R ²
0	$\hat{Y}=1,0820/(1+8,1973 \cdot e^{-0,1100X})$	0,99454
30	$\hat{Y}=1,0240/(1+5,5587 \cdot e^{-0,0814X})$	0,99273
60	$\hat{Y}=0,7993/(1+3,8291 \cdot e^{-0,0837X})$	0,99670
120	$\hat{Y}=0,6830/(1+3,2279 \cdot e^{-0,0829X})$	0,99108
To 11		
Dose (mg L ⁻¹)	Equação ajustada	R ²
0	$\hat{Y}=0,7935/(1+3,4319 \cdot e^{-0,1247X})$	0,99568
30	$\hat{Y}=0,7533/(1+2,3258 \cdot e^{-0,1025X})$	0,99395
60	$\hat{Y}=0,7227/(1+2,1776 \cdot e^{-0,0873X})$	0,99322
120	$\hat{Y}=0,6915/(1+1,9622 \cdot e^{-0,0766X})$	0,99166
To 3		
Dose (mg L ⁻¹)	Equação ajustada	R ²
0	$\hat{Y}=0,9891/(1+10,0875 \cdot e^{-0,1435X})$	0,99687
30	$\hat{Y}=0,9299/(1+7,4275 \cdot e^{-0,1342X})$	0,99505
60	$\hat{Y}=0,8143/(1+5,2909 \cdot e^{-0,1358X})$	0,99346
120	$\hat{Y}=0,7095/(1+5,0083 \cdot e^{-0,1379X})$	0,98369

Tabela 7. Equações ajustadas para os dados de crescimento dos isolados bacterianos, na presença de diferentes doses do herbicida glyphosate na formulação comercial Roudup NA[®].

To 7		
Dose (mg L⁻¹)	Equação ajustada	R²
0	$\hat{Y}=0,6997/(1+6,1745 \cdot e^{-0,2338X})$	0,99248
30	$\hat{Y}=0,5597/(1+3,5205 \cdot e^{-0,1854X})$	0,99085
60	$\hat{Y}=0,5516/(1+2,9647 \cdot e^{-0,1702X})$	0,98677
120	$\hat{Y}=0,5473/(1+2,5196 \cdot e^{-0,1368X})$	0,98550
To 47		
Dose (mg L⁻¹)	Equação ajustada	R²
0	$\hat{Y}=0,6971/(1+4,4200 \cdot e^{-0,2274X})$	0,97550
30	$\hat{Y}=0,4321/(1+4,6839 \cdot e^{-0,4470X})$	0,72701
60	$\hat{Y}=0,4310/(1+3,8053 \cdot e^{-0,4369X})$	0,74099
120	$\hat{Y}=0,4262/(1+1,3709 \cdot e^{-0,2099X})$	0,82108
To 32		
Dose (mg L⁻¹)	Equação ajustada	R²
0	$\hat{Y}=0,8600/(1+4,4019 \cdot e^{-0,1380X})$	0,99602
30	$\hat{Y}=0,7721/(1+2,4935 \cdot e^{-0,1061X})$	0,99051
60	$\hat{Y}=0,7362/(1+2,3186 \cdot e^{-0,1212X})$	0,99068
120	$\hat{Y}=0,6933/(1+2,1429 \cdot e^{-0,1072X})$	0,98960
To 66		
Dose (mg L⁻¹)	Equação ajustada	R²
0	$\hat{Y}=1,0652/(1+8,9681 \cdot e^{-0,1142X})$	0,99136
30	$\hat{Y}=0,9912/(1+4,5544 \cdot e^{-0,0596X})$	0,98962
60	$\hat{Y}=1,1742/(1+5,1751 \cdot e^{-0,0434X})$	0,97646
120	$\hat{Y}=2,6328/(1+13,1723 \cdot e^{-0,0306X})$	0,95586
To 11		
Dose (mg L⁻¹)	Equação ajustada	R²
0	$\hat{Y}=0,7978/(1+3,3233 \cdot e^{-0,1195X})$	0,99691
30	$\hat{Y}=0,7513/(1+2,2831 \cdot e^{-0,0847X})$	0,99226
60	$\hat{Y}=0,7531/(1+2,3022 \cdot e^{-0,0885X})$	0,99446
120	$\hat{Y}=0,7358/(1+2,2192 \cdot e^{-0,0889X})$	0,99393
To 3		
Dose (mg L⁻¹)	Equação ajustada	R²
0	$\hat{Y}=0,9887/(1+10,7141 \cdot e^{-0,1374X})$	0,99427
30	$\hat{Y}=0,8425/(1+5,3343 \cdot e^{-0,1004X})$	0,99808
60	$\hat{Y}=0,9581/(1+4,2532 \cdot e^{-0,0564X})$	0,99260
120	$\hat{Y}=0,9352/(1+4,2466 \cdot e^{-0,0482X})$	0,99303

Tabela 8. Equações ajustadas para os dados de crescimento dos isolados bacterianos, na presença de diferentes doses do herbicida glyphosate na formulação comercial Scout®.

To 7		
Dose (mg L ⁻¹)	Equação ajustada	R ²
0	$\hat{Y}=0,6800/(1+5,7743 \cdot e^{-0,2244X})$	0,99316
30	$\hat{Y}=0,5946/(1+4,1837 \cdot e^{-0,2030X})$	0,99155
60	$\hat{Y}=0,5913/(1+3,4657 \cdot e^{-0,1917X})$	0,98955
120	$\hat{Y}=0,6037/(1+3,2790 \cdot e^{-0,1719X})$	0,98873
To 47		
Dose (mg L ⁻¹)	Equação ajustada	R ²
0	$\hat{Y}=0,6969/(1+4,0012 \cdot e^{-0,2173X})$	0,98214
30	$\hat{Y}=0,5097/(1+3,9750 \cdot e^{-0,3491X})$	0,77470
60	$\hat{Y}=0,4837/(1+4,1207 \cdot e^{-0,4056X})$	0,73120
120	$\hat{Y}=0,5076/(1+3,5179 \cdot e^{-0,3173X})$	0,93458
To 32		
Dose (mg L ⁻¹)	Equação ajustada	R ²
0	$\hat{Y}=0,8825/(1+3,6735 \cdot e^{-0,1233X})$	0,99808
30	$\hat{Y}=0,7967/(1+2,4584 \cdot e^{-0,1088X})$	0,99231
60	$\hat{Y}=0,7382/(1+2,3839 \cdot e^{-0,1190X})$	0,98993
120	$\hat{Y}=0,7270/(1+2,1840 \cdot e^{-0,1213X})$	0,99116
To 66		
Dose (mg L ⁻¹)	Equação ajustada	R ²
0	$\hat{Y}=1,0569/(1+9,7646 \cdot e^{-0,1209X})$	0,99109
30	$\hat{Y}=0,9226/(1+5,4515 \cdot e^{-0,0880X})$	0,99299
60	$\hat{Y}=0,9862/(1+4,5728 \cdot e^{-0,0672X})$	0,99498
120	$\hat{Y}=1,0842/(1+4,3699 \cdot e^{-0,0476X})$	0,97952
To 11		
Dose (mg L ⁻¹)	Equação ajustada	R ²
0	$\hat{Y}=0,8002/(1+3,2690 \cdot e^{-0,1177X})$	0,99744
30	$\hat{Y}=0,8382/(1+2,5449 \cdot e^{-0,0719X})$	0,99476
60	$\hat{Y}=0,7798/(1+2,2370 \cdot e^{-0,0808X})$	0,99483
120	$\hat{Y}=0,7858/(1+2,4081 \cdot e^{-0,0854X})$	0,99447
To 3		
Dose (mg L ⁻¹)	Equação ajustada	R ²
0	$\hat{Y}=0,9962/(1+10,5432 \cdot e^{-0,1406X})$	0,99333
30	$\hat{Y}=0,8841/(1+7,3235 \cdot e^{-0,1199X})$	0,99573
60	$\hat{Y}=0,8553/(1+4,8570 \cdot e^{-0,0963X})$	0,99533
120	$\hat{Y}=0,7929/(1+4,2418 \cdot e^{-0,0826X})$	0,99259

A inibição do crescimento *in vitro* de microrganismos na presença de glyphosate já foi reportada anteriormente. Os autores observaram que a suplementação do meio de cultura com aminoácidos aromáticos reduzia o efeito nocivo do glyphosate. Por outro lado, Debnath et al. (2002) observaram aumento na densidade populacional e na atividade de microrganismos solubilizadores de fosfato em solo rizosférico de arroz tratado com os herbicidas oxadiazon e oxyfluorfen. Essa contradição entre os resultados apresentados acima pode ser explicada pela proteção que o solo oferece aos microrganismos em decorrência da adsorção dos herbicidas às partículas do solo (Quinn et al., 1988).

3.5. Solubilização de fosfato de cálcio, ferro e alumínio na presença de herbicidas

Os herbicidas testados induziram diferenças na capacidade de solubilização de fosfato dos isolados, que apresentaram valores médios entre 242,21 e 1779,42 μg de P (Tabela 9). Em média, os herbicidas Roundup NA[®] e Scout[®] não alteraram a capacidade de solubilização dos isolados, enquanto os herbicidas Roundup Transorb[®] e Zapp QI[®] diminuíram significativamente a capacidade de solubilização. Foram observadas diferenças significativas no pH final do meio em relação aos herbicidas testados, que apresentaram valores médios de pH superiores ao controle (Tabela 9). Foi observada também diminuição significativa na média de acidez titulável produzida pelos isolados na presença dos herbicidas (Tabela 9).

A capacidade de solubilização dos isolados diferiu significativamente entre as fontes inorgânicas de fosfato (Tabela 10). Os isolados apresentaram

elevada solubilização de fosfato de cálcio, com valor médio de 2661,09 μg de P, valor este significativamente maior do que o observado para os fosfatos de ferro e alumínio (Tabela 10). Houve diferenças no pH final médio em relação à fonte inorgânica de fosfato adicionada, com maior valor sendo observado na presença de fosfato de cálcio (Tabela 10). A produção média de acidez titulável também foi afetada pela fonte inorgânica de fosfato adicionada, sendo o maior valor observado na presença de fosfato de cálcio (Tabela 10).

Os herbicidas afetaram significativamente capacidade de solubilização do isolado To 66, que apresentou solubilização média de 2223,65 μg de P, enquanto o isolado To 11 não apresentou alterações significativas na presença dos diferentes herbicidas (Tabela 11). O pH final médio não diferiu entre os isolados, que, no entanto, reduziram significativamente o pH em relação ao controle. A acidez titulável produzida pelos isolados foi significativamente maior que o valor observado no controle, sendo que o isolado To 66 foi que apresentou maior produção, com 0,278 mg de NaOH mL^{-1} (Tabela 11).

Os isolados apresentaram comportamentos diferentes na presença de cada herbicida (Tabela 11). O isolado To 66 teve sua capacidade de solubilização significativamente aumentada na presença do herbicida Scout[®], no entanto não houve alteração na presença do herbicida Roundup NA[®]. Os herbicidas Roundup Transorb[®] e Zapp QI[®] provocaram redução significativa na capacidade de solubilização deste isolado. Por outro lado, o Isolado To 11 não apresentou diferenças na sua capacidade de solubilização na presença dos herbicidas testados.

O pH final do meio de cultura e a acidez titulável produzida por cada isolado apresentaram padrões diferentes em relação ao herbicida aplicado

Tabela 9. Médias gerais, por herbicida, de acidez titulável, pH final e fósforo solubilizado por bactérias isoladas a partir de solo rizosférico do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, e cultivadas em meio NBRIP, suplementado com diferentes herbicidas, por 3 dias a 30 °C, na presença de fosfato de cálcio ferro e alumínio.

Herbicida	mg NaOH mL⁻¹	pH	µg de P
Transorb	0,142 d ^{1/}	4,70 b	457,46 cd
ZappQI	0,127 d	4,81 a	242,21 d
NA	0,190 c	4,58 c	1022,92 bc
Scout	0,245 b	4,55 c	1779,42 a
Controle^{2/}	0,306 a	4,36 d	1342,98 ab

1/ Na coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2/ Controle sem adição de herbicida.

Tabela 10. Médias gerais, por fonte inorgânica de fosfato, de acidez titulável, pH final e fósforo solubilizado por bactérias isoladas a partir de solo rizosférico do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, e cultivadas em meio NBRIP, suplementado com diferentes herbicidas, por 3 dias a 30 °C, na presença de fosfato de cálcio ferro e alumínio.

Fonte	mg NaOH mL⁻¹	pH	µg de P
Ca₅P₃HO₁₃	0,447 a ^{1/}	5,31 a	2661,09 a
FePO₄	0,068 c	4,14 c	43,26 b
AlPO₄	0,092 b	4,35 b	202,65 b

1/ Na coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2/ Controle sem adição de fosfato.

Tabela 11. Fósforo solubilizado, em µg de P, por bactérias isoladas da rizosfera do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, e cultivadas em meio NBRIP, suplementado com diferentes herbicidas, por 3 dias a 30 °C, na presença de fosfato de cálcio ferro e alumínio.

To 66				
	Ca₅P₃HO₁₃	FePO₄	AlPO₄	Média
Roundup Transorb[®]	2363,54 Caα ^{1/}	32,57 Abα	128,00 Abα	841,37 Ca
Zapp QI[®]	178,51 Caα	28,07 Aαα	129,20 Aαα	111,93 Ca
Roundup NA[®]	7364,47 Baα	58,94 Abα	201,56 Abα	2541,66 Ba
Scout[®]	14063,78 Aαα	39,89 Abα	89,16 Abα	4730,94 Aa
Controle^{2/}	8011,92 Baα	43,46 Abα	621,72 Abα	2892,37 Ba
Média	6396,45 Aa	40,59 Ba	233,93 Ba	2223,65 A
To 11				
	Ca₅P₃HO₁₃	FePO₄	AlPO₄	Média
Roundup Transorb[®]	1078,80 Aαβ	26,70 Aαα	93,09 Aαα	399,53 Aa
Zapp QI[®]	1214,57 Aαα	30,93 Aαα	105,62 Aαα	450,37 Aa
Roundup NA[®]	1058,13 Aαβ	30,17 Aαα	130,78 Aαα	406,36 Ab
Scout[®]	1241,64 Aαβ	34,43 Aαα	169,79 Aαα	481,95 Ab
Controle	2633,99 Aαβ	106,18 Abα	348,29 Abα	1029,49 Ab
Média	1445,43 Ab	45,68 Ba	169,51 Ba	553,54 B
Controle^{3/}				
	Ca₅P₃HO₁₃	FePO₄	AlPO₄	Média
Roundup Transorb[®]	144,94 Aαβ	33,30 Aαα	216,18 Aαα	131,47 Aa
Zapp QI[®]	220,00 Aαα	55,68 Aαα	217,27 Aαα	164,32 Aa
Roundup NA[®]	143,03 Aαβ	40,40 Aαα	178,79 Aαα	120,74 Ab
Scout[®]	137,30 Aαβ	35,21 Aαα	206,63 Aαα	125,38 Ab
Controle	61,64 Aαγ	52,95 Aαα	206,63 Aαα	107,09 Ab
Média	141,39 Ac	43,51 Aa	204,50 Aa	129,80 B

1/ Na coluna, valores seguidos da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Na linha, valores seguidos da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Entre os isolados, valores do mesmo tratamento seguidos por letras gregas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para as médias, valores seguidos da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade para o mesmo isolados. Entre os isolados, valores seguidos da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2/ Controle sem adição de herbicida.

3/ Controle sem inoculação.

herbicidas e diminuição na produção de acidez titulável. O maior valor de pH observado para o isolado To 66 foi na presença do herbicida Zapp QI[®] seguido do valor observado na presença do herbicida Roundup Transorb[®] (Tabela 12). O pH final não apresentou diferença entre os herbicidas adicionados para o isolado To 11. O menor valor de acidez titulável observado para o isolado To 66 foi de 0,059 mg de NaOH mL⁻¹ na presença do herbicida Zapp QI[®], enquanto para o isolado To 11, o menor valor observado foi de 0,021 mg de NaOH mL⁻¹, quando nenhum herbicida foi adicionado (Tabela 13).

Esses resultados certa relação com os dados de crescimento na presença dos herbicidas. O isolado To 66, que apresentou alterações drásticas no crescimento, também teve sua capacidade de solubilização alterada na presença dos herbicidas. Por outro lado, o isolado To 11 não apresentou alterações drásticas no crescimento nem na sua capacidade de solubilização.

Estudos anteriores demonstraram que o glyphosate interfere na síntese de aminoácidos aromáticos, por meio da inibição da atividade da enzima 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintase (EPSP), que é encontrada em procariotos (Fischer et al., 1986). Dessa forma, o crescimento bacteriano é reduzido na presença de glyphosate; e a energia e a matéria orgânica destinada ao crescimento podem ser reorientadas no sentido da síntese de ácidos orgânicos. Estes, por sua vez, são excretados da célula, o que promove não só maior solubilização de fosfato, como também, maiores valores de acidez titulável. Ou seja, quanto mais sensível o isolado, menor é o crescimento e maior é a solubilização de fosfatos.

Os isolados apresentaram diferenças na capacidade de solubilização, pH final do meio e acidez titulável na presença das diferentes fontes

Tabela 12. pH final do meio NBRIP inoculado com bactérias isoladas da rizosfera do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, e cultivadas em meio NBRIP, suplementado com diferentes herbicidas, por 3 dias a 30 °C, na presença de fosfato de cálcio ferro e alumínio.

To 66				
	Ca₅P₃HO₁₃	FePO₄	AlPO₄	Média
Roundup Transorb[®]	4,54 Baβ ^{1/}	3,85 Acβ	4,24 Abβ	4,21 Bb
Zapp QI[®]	5,82 Aaβ	3,89 Acβ	4,23 Abβ	4,65 Ab
Roundup NA[®]	4,15 Caα	3,72 Abβ	4,23 Aaβ	4,03 BCb
Scout[®]	4,07 Caα	3,85 Aaβ	3,98 Aaβ	3,97 Cc
Controle^{2/}	4,04 Caα	2,98 Bbβ	3,17 Bbβ	3,40 Dc
Média	4,52 Ac	3,66 Cc	3,97 Bb	4,05 C
To 11				
	Ca₅P₃HO₁₃	FePO₄	AlPO₄	Média
Roundup Transorb[®]	4,71 Aaβ	4,01 Abβ	4,03 Abβ	4,25 Ab
Zapp QI[®]	4,78 Aaγ	4,07 Abβ	4,11 Abβ	4,32 Ac
Roundup NA[®]	4,73 Aaβ	3,91 Abβ	3,88 Abγ	4,17 Ab
Scout[®]	4,67 Aaβ	3,78 Abβ	4,00 Abβ	4,15 Ab
Controle	4,65 Aaβ	3,37 Bbβ	3,38 Bbβ	3,80 Bb
Média	4,71 Ab	3,83 Bb	3,88 Bb	4,14 B
Controle^{3/}				
	Ca₅P₃HO₁₃	FePO₄	AlPO₄	Média
Roundup Transorb[®]	6,79 Aaα	5,01 Abα	5,15 Bbα	5,65 Ba
Zapp QI[®]	6,27 Baα	4,93 Abα	5,15 Bbα	5,45 Ca
Roundup NA[®]	6,76 Aaα	4,85 Abα	5,02 Bbα	5,54 BCa
Scout[®]	6,69 Aaα	4,79 Aca	5,10 Bbα	5,53 BCa
Controle	6,99 Aaα	5,05 Aca	5,57 Abα	5,87 Aa
Média	6,70 Aa	4,93 Ca	5,20 Ba	5,61 A

1/ Na coluna, médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Na linha, médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Entre os isolados, valores do mesmo tratamento seguidos por letras gregas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para as médias, valores seguidos da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade para o mesmo isolados. Entre os isolados, valores seguidos da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2/ Controle sem adição de fosfato.

3/ Controle sem inoculação.

Tabela 13. Acidez titulável produzida por bactérias isoladas da rizosfera do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, e cultivadas em meio NBRIP, suplementado com diferentes herbicidas, por 3 dias a 30 °C, na presença de fosfato de cálcio ferro e alumínio.

To 66				
	Ca₅P₃HO₁₃	FePO₄	AlPO₄	Média
Roundup Transorb[®]	0,308 Caβ	0,049 Bbαβ	0,064 Bbβ	0,140 Db
Zapp QI[®]	0,040 Daβ	0,064 Baα	0,079 Baα	0,061 Eb
Roundup NA[®]	0,973 Baα	0,055 Bbα	0,079 Bbα	0,369 Ca
Scout[®]	1,424 Aαα	0,053 Bbα	0,072 Bbα	0,516 Ba
Controle^{2/}	1,508 Aαα	0,188 Abα	0,241 Abα	0,646 Aa
Média	0,851 Aa	0,082 Ba	0,107 Ba	0,347 A

To 11				
	Ca₅P₃HO₁₃	FePO₄	AlPO₄	Média
Roundup Transorb[®]	0,457 Caα	0,120 Abβ	0,173 Abα	0,250 Aa
Zapp QI[®]	0,620 Aαα	0,103 Abβ	0,097 ABbα	0,273 Aa
Roundup NA[®]	0,321 Daβ	0,053 Abβ	0,088 ABbα	0,154 Bb
Scout[®]	0,391 CDaβ	0,061 Abβ	0,063 Bbα	0,172 Bb
Controle	0,516 Baβ	0,096 Abβ	0,136 ABbβ	0,249 Ab
Média	0,461 Ab	0,087 Ba	0,112 Ba	0,220 B

Controle				
	Ca₅P₃HO₁₃	FePO₄	AlPO₄	Média
Roundup Transorb[®]	0,027 Aαγ	0,032 Aαβ	0,051 Aαβ	0,036 Ac
Zapp QI[®]	0,032 Aαβ	0,051 Aαα	0,061 Aαα	0,048 Ab
Roundup NA[®]	0,029 Aαγ	0,043 Aαα	0,072 Aαα	0,048 Ac
Scout[®]	0,037 Aαγ	0,043 Aαα	0,064 Aαα	0,048 Ac
Controle	0,021 Aαγ	0,016 Aαγ	0,032 Aαγ	0,023 Ac
Média	0,029 Ac	0,037 Ab	0,056 Ab	0,041 C

1/ Na coluna, médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Na linha, médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Entre os isolados, valores do mesmo tratamento seguidos por letras gregas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para as médias, valores seguidos da mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade para o mesmo isolados. Entre os isolados, valores seguidos da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2/ Controle sem adição de herbicida.

3/ Controle sem adição de fosfato.

inorgânicas de fosfato (Tabelas 11, 12 e 13). Nenhum dos isolados foi capaz de solubilizar os fosfatos de ferro e alumínio. Além disso, o isolado To 66 solubilizou significativamente mais fosfato de cálcio que o isolado To 11 (Tabela 11). Os valores de pH foram significativamente maiores na presença de fosfato de cálcio, no entanto os isolados reduziram o pH do meio na presença de todas as fontes inorgânicas de fosfato (Tabela 12). Os valores de acidez titulável também foram significativamente maiores na presença de fosfato de cálcio (Tabela 13).

Quando se subtraem dos dados de solubilização os valores obtidos nos controles e se expressam os valores de solubilização em termos de concentração, os padrões gerais são mantidos; no entanto, observa-se valores negativos de solubilização (Tabela 14), principalmente na presença dos fosfatos de ferro e alumínio, indicando que houve maior consumo de fósforo solúvel pelos isolados do que solubilização dos fosfatos. Isso é possível tendo em vista a baixa, mas existente, solubilidade desses fosfatos. Resultados semelhantes foram obtidos por Nahas (1996) ao analisar a capacidade de solubilização de isolados bacterianos.

O pH se correlacionou negativamente com a solubilização de fosfato, no entanto esta correlação não foi significativa. A acidez titulável se correlacionou positiva e significativamente com a solubilização de fosfato (0,883, $p < 0,05$). Quando analisada a correlação entre acidez titulável e solubilização de fosfato em cada herbicida, observa-se o maior valor quando nenhum herbicida é adicionado (0,986, $p < 0,05$), seguido dos tratamentos com adição do herbicida Scout[®] (0,949, $p < 0,05$). Na presença dos demais herbicidas essa correlação é menor, chegando a apresentar o valor de 0,723 ($p < 0,05$) na presença do herbicida Roundup Transorb[®].

Tabela 14. Solubilização líquida de fosfato de cálcio, ferro e alumínio por bactérias isoladas da rizosfera de *Eucalyptus* sp. e cultivadas em meio NBRIP, suplementado com diferentes herbicidas, por 3 dias a 30 °C.

	To 66		
	Ca₅P₃HO₁₃	FePO₄	AlPO₄
Roundup Transorb[®]	44,33 Ca ^{1/}	-0,06 Aa	-1,81 Aa
Zapp QI[®]	-3,10 Ca	-0,59 Aa	-1,79 Aa
Roundup NA[®]	144,29 Ba	0,23 Ab	0,32 Ab
Scout[®]	278,45 Aa	0,01 Ab	-2,37 Ab
Controle^{2/}	158,98 Ba	-0,21 Ab	8,28 Ab
	To 11		
	Ca₅P₃HO₁₃	FePO₄	AlPO₄
Roundup Transorb[®]	18,59 Aa	-3,01 Aa	-2,55 Aa
Zapp QI[®]	19,85 Aa	-0,53 Aa	-2,27 Aa
Roundup NA[®]	18,16 Aa	-0,35 Aa	-1,10 Aa
Scout[®]	22,01 Aa	-2,45 Aa	-0,75 Aa
Controle	51,38 Aa	0,10 Ab	2,77 Ab

1/ Na coluna, médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Na linha, médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2/ Controle sem adição de herbicida.

A correlação entre acidez titulável e solubilização de fosfato em cada fonte inorgânica de fosfato é significativa apenas para os fosfatos de cálcio (0,858, $p < 0,05$) e alumínio (0,464, $p < 0,05$). O pH correlacionou-se negativa e significativamente apenas com o fosfato de cálcio (-0,629, $p < 0,05$). Quando subtraímos dos dados de solubilização os valores obtidos nos controles e expressamos os valores de solubilização em termos de concentração, as correlações observadas entre a solubilização de fosfato e valores de acidez titulável e pH foram semelhantes àquelas obtidas anteriormente.

3.6. Conclusões

- Os isolados bacterianos obtidos a partir de solo rizosférico do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* apresentaram diferenças quanto à sua capacidade de solubilização de fosfato *in vitro*, constituindo material adequado à seleção de estirpes para experimentos de inoculação de plantas.
- O método de solubilização em placa, com obtenção do índice de solubilização, não deve ser utilizado como única ferramenta na determinação do potencial de solubilização dos isolados, uma vez que existem contradições entre o potencial de solubilização observado em meio sólido e o potencial em meio líquido.
- Os herbicidas testados alteraram de forma diferencial o crescimento e a capacidade de solubilização dos isolados bacterianos *in vitro*, sendo necessário investigar se estes resultados são reprodutíveis no solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASEA P. E. A., KUCEY R. M. N., STEWART J. W. B. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. **Soil Biology and Biochemistry**, **20**: 459-464, 1988.
- BARROS N. F., BRAGA J. M., BRANDI R. M., DEFELIPO B. V. Produção de eucalipto em solos de cerrados em resposta à aplicação de NPK e de B e Zn. **Revista Árvore**, **5**: 90-103, 1981.
- BARROSO C.B., NAHAS E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. **Applied Soil Ecology**, **29**: 73-83, 2005.
- 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**, **34**: 33-41, 2006.
- DAS A.C., MURKHERJEE D. Insecticidal effects on soil microorganisms and their biochemical processes related to soil fertility. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, **14**: 903-909, 1998.
- DEBNATH A., DAS A. C., MUKHERJEE D. Persistence and effect of Butachlor and Basalin on the activities of phosphate solubilizing microorganisms in wetland rice soil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, **68**: 766-770, 2002.
- DRAPER N.R. **Applied regression analysis**. 2nd edition. New York: J. Wiley, 1981. 709 p.

- FILHO G. N. S., NARLOCH C., SCHARF R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, **37**: 847-854, 2002.
- FISCHER R. S., BERRY A., GAINES C. G., JENSEN R. A. Comparative action of glyphosate as a trigger of energy drain in eubacteria. **Journal of Bacteriology**, **168**: 1147-1154, 1986.
- FREITAS J. R. DE, BANERJEE M. R., GERMIDA J. J. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not uptake of canola (*Brassica napus* L.). **Biology and Fertility of Soils**, **24**: 358-364, 1997.
- GHANI A., RAJAN S. S. S., LEE A. Enhancement of phosphate rock solubility through biological processes. **Soil Biology and Biochemistry**, **26**: 127-136, 1994.
- GOLDSTEIN A. H., BRAVERMAN K., OSORIO N. Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limiting desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium. **FEMS Microbiology Ecology**, **30**: 295-300, 1999.
- GONÇALVES J. L. M., FIRME D. J., NOVAIS R. F., RIBEIRO A. C. Cinética de adsorção de fósforo em solos de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, **9**: 107-111, 1985.
- GRAYSTON S. J., VAUGHAN D., JONES D. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. **Applied Soil Ecology**, **5**: 29-56, 1996.
- GYANESHWAR P., PAREKH L. J., ARCHANA G., POOLE P. S., COLLINS M. D., HUTSON R. A., KUMAR G. N. Involvement of a phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter asburiae*. **FEMS Microbiology Letters**, **171**: 223-229, 1999.
- GYANESHWAR P., KUMAR G. N., PAREKH L. J., POOLE P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, **245**: 83-93, 2002.
- IGUAL J. M., VALVERDE A., CERVANTES E., VELÁZQUEZ E. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. **Agronomie**, **21**: 561-568, 2001.
- ILLMER P., SCHINNER F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, **24**: 389-395, 1992.
- JOHN M. K. Colorimetric determination of phosphorus in soil and plant materials with ascorbic acid. **Soil Science**, **109**: 214-220, 1970.
- KENNEDY I.R., CHOUDHURY A.T.M.A., KECSKÉS M.L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant

- growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, **36**: 1229-1244, 2004.
- KPOMBLEKOU-A K., TABATABAI M.A. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. **Soil Science**, **158**: 442-453, 1994.
- KUCEY R. M. N. Phosphate solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. **Canadian Journal of Soil Science**, **63**: 671-678, 1983.
- KUMAR V., NARULA N. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. **Biology and Fertility of Soils**, **28**: 301-305, 1999.
- NAHAS E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, **12**: 567-572, 1996.
- NAUTIYAL C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiological Letters**, **170**: 265-270, 1999.
- NAUTIYAL C. S., BHADOURIA S., KUMAR P., LAL H., MONDAL R., VERMA D. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. **FEMS Microbiology Letters**, **182**: 291-296, 2000.
- QUINN J. P., PEDEN J. M. M., DICK R. E. Glyphosate tolerance and utilization by the microflora of soils treated with the herbicide. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **29**: 511-516, 1988.
- RAHMAN M. K., PARSONS J. W. Effects of inoculation with *Glomus mosseae*, *Azorhizobium caulinodans* and rock phosphate on the growth of and nitrogen and phosphorus accumulation in *Sesbania rostrata*. **Biology and Fertility of Soils**, **25**: 47-52, 1997.
- RODRÍGUEZ H., FRAGA R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, **17**: 319-339, 1999.
- SILVA FILHO G.N. E VIDOR C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, **24**: 311-319, 2000.
- SINGH S., KAPOOR K. K. Inoculation with phosphate solubilizing microorganisms and a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. **Biology and Fertility of Soils**, **28**: 139-144, 1999.
- WAKELIN S. A., WARREN R. A., HARVEY P. R., RYDER M. H. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. **Biology and Fertility of Soils**, **40**: 36-43, 2004.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)