

Universidade Federal de São João Del-Rei
Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia

FERNANDA DE CÁSSIA BATISTA

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO DE FERRO PARA
INCREMENTAR O USO DE FÓSFORO EM MILHO**

SÃO JOÃO DEL REI
MINAS GERAIS – BRASIL
JUNHO DE 2022

FERNANDA DE CÁSSIA BATISTA

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO DE FERRO PARA
INCREMENTAR O USO DE FÓSFORO EM MILHO**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade Federal de São João del Rei como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de “Magister Scientiae” (MS).

SÃO JOÃO DEL REI
MINAS GERAIS – BRASIL
JUNHO DE 2022

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B333s Batista, Fernanda de Cássia .
 Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato de
 ferro para incrementar o uso de fósforo em milho /
 Fernanda de Cássia Batista ; orientador Ivanildo
 Evódio Marriel; coorientadora Christiane Abreu de
 Oliveira Paiva. -- São João del-Rei, 2022.
 54 p.

 Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
 Bioengenharia) -- Universidade Federal de São João
 del-Rei, 2022.

 1. A relevância do milho . 2. Adubação fosfatada em
 solos tropicais. 3. Microrganismos solubilizadores
 de fosfato - MSF. 4. Produção de ácidos orgânicos. 5.
 Produção de sideróforos. I. Marriel, Ivanildo Evódio ,
 orient. II. Paiva, Christiane Abreu de Oliveira , co
 orient. III. Título.

FERNANDA DE CÁSSIA BATISTA

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO DE FERRO PARA
INCREMENTAR O USO DE FÓSFORO EM MILHO**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade Federal de São João del Rei como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de “Magister Scientiae” (MS).

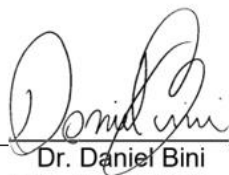
Aprovada em: 10 de Junho de 2022



Dra. Christiane Abreu de Oliveira Paiva
Coorientadora - Embrapa



Profa. Dra. Swiany Silveira Lima
UEMG



Dr. Daniel Bini
Pós-Doutorando



Profa. Dra. Márcia Regina da Costa
UFVJM



Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel
Orientador – Embrapa/UFSJ

Dedico este trabalho aos meus pais, José e Aparecida, por serem meu exemplo de vida e amor incondicional. As minhas irmãs e irmão por sempre me inspirarem para realizar meus sonhos. Ao meu esposo Rodinei pela amizade, parceria e apoio em todas as horas. Sem a ajuda e torcida de vocês, nada seria possível. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus pai, ao filho Jesus Cristo e ao Espírito Santo por terem proporcionado e me amparado em todos os momentos de minha vida, pela sabedoria para superar os obstáculos e amadurecimento nesses últimos anos, para aceitar os fatos que não podemos mudar.

À Embrapa Milho e Sorgo pela disponibilidade de recursos e colaboração para realização deste trabalho.

À Universidade Federal de São João del-Rei e ao Programa de Pós-graduação em Bioengenharia pela oportunidade para a realização deste mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À minha família, principalmente aos meus pais, José e Aparecida, por todo amor e apoio nas minhas escolhas, aos meus irmãos Wadisson, Adriana, Natalia, Tatiane e sobrinha Nicy pelo amor, incentivo, orações e carinho comigo, por entenderem as minhas dificuldades.

Ao meu marido Rodinei, pela paciência, carinho, amizade, parceria, amor, auxílio, durante todo esse caminho e por sempre ouvir minhas dificuldades e não me deixar desistir e acreditar que eu sou capaz.

À minha coorientadora Dra. Christiane Abreu de Oliveira Paiva, por acreditar no meu potencial, pelo incentivo, ensinamentos, pela paciência, dedicação, profissionalismo e pelo amor incondicional ao compartilhar seus conhecimentos e sabedoria em sempre compreender as minhas dificuldades.

Ao meu orientador Dr. Ivanildo Evódio Marriel, pelo apoio e oportunidade nesses anos ao compartilhar seu conhecimento e questionamentos feitos durante o desenvolvimento do projeto e estímulo para perseguir os objetivos deste trabalho.

À amiga Fabiane e ao amigo Maycon, que foram sem dúvidas as peças chaves para que eu não perdesse o foco em meio as dificuldades, devido ao isolamento da pandemia COVID-19. Pela disponibilidade em ajudar a esclarecer as dúvidas e fazer questionamentos para que eu não desviasse do meu objetivo. Pelas palavras de ânimo e incentivo e por lembrar que podemos ser melhores a cada dia.

À amiga Denise e ao amigo Daniel, por todo auxílio, paciência e incentivo para continuar a desenvolver esse trabalho.

Às amigas e amigos do laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo, por todo auxílio na realização dos experimentos e nas análises realizadas.

Ao pesquisador José Edson por compartilhar nessa reta final todo seu conhecimento, sabedoria e paciência para estruturar esse trabalho.

Aos professores do mestrado pelos ensinamentos.

Aos pesquisadores e os assistentes da Embrapa Milho e Sorgo, que de forma direta e indiretamente, apoiaram e contribuíram no desenvolvimento deste trabalho.

À banca examinadora pela participação, disponibilidade e contribuição.

Muito Obrigada!

“Não tema, porque eu sou contigo; não te assombres, pois eu sou teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a destra da minha justiça.”

(Isaías 41:10)

BATISTA, Fernanda de Cássia (MS). Universidade Federal de São João del Rei, Junho de 2022. **Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato de ferro para incrementar o uso de fósforo em milho.** Orientador: Ivanildo Evódio Marriel. Coorientadora: Christiane Abreu de Oliveira Paiva.

RESUMO

O fósforo é um macronutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Contudo, a capacidade das plantas em adquirir fosfato da rizosfera é crítica nos solos ácidos do Cerrado com altos níveis de fósforo (P) fixado em argila e minerais. As formas inorgânicas de fósforo no solo tropical consistem principalmente em complexos de fosfatos de ferro. Nessas condições, a disponibilidade de fósforo para as plantas é reduzida a níveis críticos. Portanto, a indisponibilidade de P e a baixa fertilidade em solos tropicais constituem as principais preocupações para o crescimento e aumento da produtividade das culturas de altos rendimentos, como o milho. Por outro lado, o uso de grande quantidade de adubos fosfatados e a carência desse recurso no Brasil torna o agronegócio brasileiro altamente dependente do mercado externo e menos competitivo devido aos elevados custos da aquisição desse insumo. Além disso, aproximadamente 80% do P inorgânico aplicado nos solos torna-se imóvel devido à adsorção, precipitação ou conversão em formas orgânicas. O emprego de microrganismos solubilizadores de fosfato (MSP) representa uma alternativa sustentável para incrementar a disponibilidade e absorção de fósforo para as plantas. O presente estudo objetivou selecionar e caracterizar bactérias endofíticas do milho, com potencial para biossolubilização de fosfato de ferro. Foram avaliados a liberação de P inorgânico *in vitro*, os mecanismos de solubilização, como a produção de sideróforos, de ácidos orgânicos e o crescimento e acúmulo de fósforo em milho inoculado com bactérias e adubado com fosfato de ferro. Observou efeitos positivos nos ensaios de solubilização de P em meio líquido apresentando influência significativa para maioria das estirpes testadas B1931 e B1934 de *Pantoea ananatis* e B2096 de *Pseudomonas* sp. Os ácidos orgânicos foram mensurados por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), destacando as estirpes B1924 *Klebsiella* sp. na produção do ácido acético e B1923 de *Bacillus pumilus* na produção de 2-cetoglucônico. Para o crescimento agrônômico, os parâmetros avaliados não

apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) para a maioria dos tratamentos analisados. A quantidade de P disponível no solo, mostrou diferença significativa quando adicionado fonte de fosfato de ferro combinadas com as estirpes de *Pantoea ananatis* B1931, *Pseudomonas* sp. B2096 e *Bacillus subtilis* B1935. As bactérias estudadas apresentaram grande potencial de solubilização de fosfato de ferro, através da redução do pH do meio e produção de ácidos orgânicos. Assim, a associação planta-MSP representa uma classe de tecnologia emergente viável para melhorar a aquisição de fósforo pelas culturas em solos ácidos.

Palavras-chave: Solubilização de Fosfato, Sideróforos, Ácidos Orgânicos, Promoção de Crescimento.

BATISTA, Fernanda de Cássia (MS). Universidade Federal de São João del Rei, Junho de 2022. **Selection of iron phosphate solubilizing bacteria to increase phosphorus use in maize.** Orientador: Ivanildo Evódio Marriel. Coorientadora: Christiane Abreu de Oliveira Paiva.

ABSTRACT

Phosphorus is an essential macronutrient for plant growth and development. However, the ability of plants to acquire phosphate from the rhizosphere is critical in acidic Cerrado soils with high levels of phosphorus (P) fixed in clay and minerals. The inorganic forms of phosphorus in tropical soil consist mainly of iron phosphate complexes. Under these conditions, phosphorus availability to plants is reduced to critical levels. Therefore, the P unavailability and low fertility in tropical soils are significant concerns for the growth and productivity of high-yielding crops such as maize. Contrary, the use of large amounts of phosphate fertilizers and the lack of this resource in Brazil make Brazilian agribusiness highly dependent on the foreign market and less competitive due to the high costs of acquiring this input. In addition, approximately 80% of inorganic P applied to soils becomes immobile due to adsorption, precipitation, or conversion to organic forms. Using phosphate solubilizing microorganisms (MSP) represents a sustainable alternative to increase plants' availability and absorption of phosphorus. The present study aimed to select and characterize endophytic bacteria of maize, with the potential for iron phosphate biosolubilization. We evaluated the release of inorganic P in vitro, the solubilization mechanisms such as siderophores and organic acids production, and the growth and phosphorus accumulation in maize inoculated with bacteria or fertilized with iron phosphate. Positive effects were observed in the P solubilization assays in the liquid medium, showing significant influence for most tested strains: B1931 and B1934 of *Pantoea ananatis* and B2096 of *Pseudomonas* sp. Organic acids were measured by HPLC (High-Performance Liquid Chromatography), highlighting the strains B1924 *Klebsiella* sp. in the production of acetic acid and B1923 *Bacillus pumilus* in the production of 2-ketogluconic. For agronomic growth, the parameters evaluated showed no significant difference ($p < 0.05$) for most of the treatments analyzed. The amount of P available in the soil showed a significant difference when iron phosphate sources

were added combined with the strains of *Pantoea ananatis* B1931, *Pseudomonas* sp. B2096 and *Bacillus subtilis* B1935. The bacteria studied showed great potential for iron phosphate solubilization by reducing the medium's pH and producing organic acids. Thus, the plant-MSP association represents a viable emerging technology to improve phosphorus acquisition by crops in acidic soils.

Keywords: Phosphate Solubilization, Siderophores, Organic Acids, Growth Promotion.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	A RELEVÂNCIA DO MILHO NO AGRONEGÓCIO BRASILEIRO.....	3
2.2	ADUBAÇÃO FOSFATADA EM SOLOS TROPICAIS.....	4
2.3	MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO – MSF.....	6
2.4	MECANISMOS DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO	7
2.5	PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS.....	8
2.6	PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS.....	9
3	OBJETIVOS.....	11
3.1	OBJETIVO GERAL.....	11
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
4	METODOLOGIA	12
4.1	SELEÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO	12
4.2	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE E EFICIÊNCIA DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE FERRO EM MEIO LÍQUIDO	12
4.3	QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS	13
4.4	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE E EFICIÊNCIA DAS BACTÉRIAS NA PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS.....	14
4.5	EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DOS MICROORGANISMOS INOCULADOS SOBRE O CRESCIMENTO DE PLANTAS DE MILHO	15
4.6	ANÁLISE QUÍMICA DE ELEMENTOS MAIORES POR FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X	19
4.7	ANÁLISE DO TECIDO VEGETAL DAS PLANTAS DE MILHO	19
4.8	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA E ALCALINA.....	20
4.9	DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO DISPONÍVEL OLSEN	20
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
5	RESULTADOS.....	22

5.1	MECANISMOS DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE FERRO EM MEIO LÍQUIDO.....	22
5.2	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE E EFICIÊNCIA DE BACTÉRIAS NA PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS.....	24
5.3	PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS PELOS MSF.....	24
5.4	EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DOS MICRORGANISMOS PARA O CRESCIMENTO DE PLANTAS DE MILHO	26
5.5	ANÁLISE QUÍMICA DOS ÓXIDOS MAIORES.....	31
5.6	CONTEÚDO DE P NOS TECIDO DAS PLANTAS DE MILHO INOCULADO COM AS ESTIRPES SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO	33
5.7	EFEITOS DAS ESTIRPES DE BACTÉRIAS NA DISPONIBILIDADE DE P NO SOLO	33
5.8	FOSFATASE	34
6	DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÕES	41
	REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

Os solos brasileiros são, geralmente, altamente intemperizados, ácidos, com baixa fertilidade natural e predomínio de fósforo complexado com óxidos de ferro (Embrapa 2006). A formação de complexos de fosfato de ferro (P-Fe) resulta em baixa disponibilidade de fósforo (P), conseqüentemente gerando deficiência para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Abreu 2014; Marschner *et al.* 2011). Este é um dos fatores que mais comprometem o crescimento dos vegetais, em especial o milho e a soja que, em razão disso, consomem grande quantidade de fertilizantes (Santos *et al.* 2021; GlobalFert 2021). A necessária aplicação de fertilizantes fosfatados tem como objetivo aumentar a quantidade de nutrientes do solo, mas em contrapartida, eleva os custos de produção, comprometendo a sustentabilidade e competitividade do agronegócio brasileiro (Rodrigues *et al.* 2015; CONAB 2021). Além disso, a extração dos fertilizantes fosfatados, como os superfosfatos ou fosfatos de amônio é feita quimicamente a partir de rocha de fosfato extraídas em minas e o seu processamento, transporte e distribuição, envolve gastos significativos de energia provenientes de fontes não renováveis (Bargaz *et al.* 2018; Brito *et al.* 2020; Sharma *et al.* 2013). Diante desse cenário, a adoção de estratégias alternativas para aumentar à disponibilidade de fósforo no solo de forma sustentável têm sido significativamente incrementados nos últimos anos (Khan *et al.* 2010).

No solo, o fósforo pode ser encontrado na forma orgânica, variando entre 3 a 90% do P total no solo e na forma inorgânica, entre 20 a 25% do P total ligado a óxidos (Souza *et al.* 2004). O P é um elemento essencial para vida de todos os seres vivos e participa de inúmeros processos biogeoquímicos que alteram sua disponibilidade no ambiente. Dentre esses processos destaca-se a solubilização biológica de fosfatos, que é fundamental para tornar o P disponível para as plantas em solos intemperizados (Whitelaw 1999; Goldstein *et al.* 2003; Oliveira *et al.* 2009).

Na rizosfera e nos tecidos internos das plantas existem microrganismos que promovem o crescimento de plantas (MPCP), favorecendo a produção vegetal por meio da transformação do P por processos de oxidação e redução (Behera *et al.* 2014; Hameeda *et al.*, 2008). A liberação de P solúvel ocorre através de dois mecanismos principais que são, pela mineralização do fósforo orgânico e pelas reações de solubilização do fósforo inorgânico (Gomes *et al.* 2016; Oliveira-Paiva *et al.* 2021).

Contudo, outros processos também podem estar envolvidos, como a atuação dos sideróforos.

No ciclo biogeoquímico do fósforo, as bactérias solubilizadoras de fosfato auxiliam ativamente no aumento da biodisponibilidade deste elemento para absorção pelas plantas (Mardad *et al.* 2013). Esse processo acontece pela quelação, acidificação, reações de troca, produção de ácidos orgânicos e produção de enzimas fosfatases (Hameeda *et al.* 2008; Mendes *et al.* 2021 Richardson & Simpson 2011; Vassilev *et al.* 2014; Young *et al.* 2013).

Os ácidos orgânicos secretados por bactérias atuam dissociando os metais dos fosfatos, tais como, fosfato de ferro, fosfato de alumínio e fosfato de cálcio presente nos solos tropicais. Essas atividades bacterianas, além de liberar o fosfato solúvel (Whitelaw 1999; De Abreu *et al.* 2017), proporcionam a redução do pH do meio (Yanya *et al.* 2021). Outro mecanismo de solubilização de P ligado ao ferro está relacionado com os sideróforos (Viana *et al.* 2013), que são compostos produzidos por algumas espécies de microrganismos. Esses compostos orgânicos gerados pelo metabolismo secundário, tem como principal função a de complexar metais, em especial ferro em estado insolúvel (Benite *et al.* 2002). No entanto, pouco se conhece sobre a participação efetiva destas substâncias como mecanismos de solubilização dos fosfatos de ferro. Além da captação de P complexado ao Fe no solo, os sideróforos também podem atuar no biocontrole de patógenos (Viana *et al.* 2013).

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a capacidade e a eficiência bacteriana na solubilização de fosfato de ferro, por meio da investigação dos mecanismos de solubilização de fosfato, avaliação da produção de ácidos orgânicos e sideróforos, visando selecionar microrganismos com potencial para serem utilizados como inoculantes na agricultura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A RELEVÂNCIA DO MILHO NO AGRONEGÓCIO BRASILEIRO

Atualmente o milho é a segunda maior cultura no Brasil, sendo superado apenas pela soja (GlobalFert 2021; De Souza *et al.* 2018). O milho vem ganhando cada vez mais espaço na produção agrícola nacional e possui grande destaque no cenário mundial em decorrência do amplo consumo e versatilidade na indústria de alimentos (Velloso 2019; Santos *et al.* 2021). Essa cultura é caracterizada por ser altamente energética devido às grandes quantidades de carboidratos, ácidos graxos e fibras, além de vitaminas E, B3, ácido fólico, potássio e fósforo. Nos países em desenvolvimento, o milho se destaca como principal insumo para a alimentação humana e na composição de ração animal (aves, bovinos e suínos), além de ser matéria prima para vários outros produtos industriais (Pereira *et al.* 2019).

No processamento dos grãos de milho, são separadas em frações amido, óleo, fibras, glúten e gérmen. Em diferentes etapas do processamento, essas frações passam por modificações físicas, químicas e bioquímicas que conferem variadas aplicabilidades em diferentes segmentos industriais como o setor químico, farmacêutico, cervejeira, mineração, produção de fertilizantes, indústria de celulose (Paes 2006).

No ranking Mundial, o Brasil se destaca como o 3º produtor e o 2º exportador de grãos, com produção total de milho na safra 2020/2021 de aproximadamente 102 milhões de toneladas, ficando atrás dos Estados Unidos e da China (CONAB 2021). A produção de milho no Brasil se divide em três safras, sendo produzidos 22,4% na 1ª safra, 75,9% na 2ª e 1,7% na 3ª safra.

O agronegócio é importante na balança comercial brasileira movimentando a economia e gerando emprego e renda. Comparando a elevação do preço da saca de 60 quilos de grãos, a soja atingiu 52,1% e o milho aumentou 70,7% ao longo do ano de 2020, em relação ao ano de 2019 (CONAB 2021). O Brasil tem aproveitado o crescente aumento da demanda mundial pelo milho e investido em tecnologias, uma vez que todos os envolvidos, desde o produtor rural até o consumidor final estão receptivos às evoluções biotecnológicas, tais como os novos defensivos, fertilizantes, máquinas, técnicas de plantio, colheita e irrigação (CONAB 2021). Isso favorece as

instituições de pesquisa, que buscam melhorar o desempenho da cultura, principalmente com relação aos aspectos relacionados com a suscetibilidade e resistência às doenças e o melhoramento da nutrição vegetal visando, atender a demanda mundial. (GlobalFert 2021; De Souza *et al.* 2018).

2.2 ADUBAÇÃO FOSFATADA EM SOLOS TROPICAIS

O solo é um sistema de vital importância para todos os seres vivos e essencial para manter o equilíbrio ecológico (Wadt 2003; Bini & Lopez 2016). Os elementos presentes nos solos são classificados como macronutrientes ou elementos principais como cálcio (Ca), enxofre (S), fósforo (P), potássio (K), magnésio (Mg) e nitrogênio (N), e micronutrientes como boro (B), cobre (Cu), ferro (Fe), cloro (Cl), molibdênio (Mo), manganês (Mn) e zinco (Zn), chamados de elementos-traço.

Tanto os macros e os micronutrientes são essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas e se encontram no solo nas formas de matéria orgânica e dos minerais. Outros elementos benéficos como sódio (Na), silício (Si), níquel (Ni) e cobalto (Co) são importantes para seu crescimento das plantas, mas sua falta não é um fator limitante (De Abreu *et al.* 2017; Ronquim 2020).

Na solução do solo, onde os nutrientes deveriam estar disponíveis para absorção pelos vegetais, alguns elementos macro e micronutrientes apresentam formas indisponíveis o que ocasiona déficit nutricional. Portanto, compreender a necessidade de realizar o manejo adequado do solo, através de investigações sobre a quantidade de cada nutriente, contribui para estabelecer a quantidade necessária para equilibrar cada nutriente de acordo com as necessidades das culturas, gerando resultados mais positivos de produção (Gomes *et al.* 2014).

A reposição de nutrientes nos solos ácidos e com baixa fertilidade do cerrado brasileiro é feita com a aplicação de elevadas quantidades de fertilizantes fosfatados, principalmente do tipo NPK (Batista *et al.* 2018), que reconhecidamente eleva a produtividade das culturas. Segundo o boletim GlobalFert, no ano de 2020, o Brasil consumiu aproximadamente 61% dos fertilizantes nas culturas de milho e soja (De Souza *et al.* 2018). Outro agravante que preocupa os agricultores e a sociedade em geral, são as aplicações de P, visto que as reservas deste elemento no mundo

mostram uma possível escassez nos próximos 100 anos (Vegro 2018; Gilbert 2009; Santos *et al.* 2021).

O fósforo é o segundo elemento mineral crítico, para alcançar boa produtividade vegetal, tem grande abundância na natureza, entretanto é considerado um elemento quase imóvel no solo por ser muito reativo aos metais, portanto com baixa disponibilidade aos vegetais. Em relação aos outros nutrientes, essa situação se agrava principalmente devido a fixação ou adsorção de P nos solos com alto grau de intemperismo e com elevados teores de óxidos de ferro (Fe_2O_3) e alumínio (Al_2O_3) (Barroso & Nahas 2008; Hameeda *et al.* 2008; Vieira 2021; Yahya *et al.* 2021). Essas são características da maioria dos solos brasileiros, sendo que maioria das formas de P no solo se encontram indisponível para as plantas (Abreu 2014; Oliveira *et al.* 2009).

De maneira geral, existem duas formas de P no solo, a forma orgânica, como ácidos nucleicos, fosfato inositol (fitato) e fosfolipídios, e a forma inorgânica, como minerais primários, (H_3PO_4 , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}). Do total de P presente nos solos brasileiros, uma pequena fração está presente na solução do solo, sendo denominada P disponível para as plantas (Vance *et al.* 2003). Outras frações compõem o solo, sendo P-lábil e P- não lábil. O P-lábil consiste em uma fração de P que não estão prontamente disponíveis para absorção das plantas, embora mantenha uma relação de equilíbrio com a solução do solo, disponibilizando P à medida em que ele é absorvido. Já o P-não lábil é a fração de P que está irreversivelmente fixada às partículas do solo (Vance *et al.* 2003).

Nesse cenário a fertilidade dos solos de clima tropical é considerada baixa, e isso é normal devido aos teores reduzidos de fósforo. Portanto, a adubação mineral fosfatada permite explorar melhor o potencial produtivo da planta de milho, aumentando a produtividade, uma vez que o P está envolvido em processos essenciais como na fotossíntese, respiração, armazenamento e transferência de energia, além de contribuir na qualidade do grão de milho. Porém, existem problemas no uso dos fertilizantes, tanto em questão de eficiência quanto em questões ambientais. Santos *et al.* (2021) relataram que 70% das aplicações de adubação fosfatada são perdidas pela fixação de P, e conseqüentemente, se tornam indisponíveis aos vegetais (Ribeiro 2018; Gomes *et al.* 2011), o que pode encarecer a produção, pois mais P deve ser aplicado. Além disso, o fósforo e o nitrogênio têm gerado grande preocupação por parte dos ambientalistas, devido as perdas por escoamento superficial, que contamina os leitos aquíferos, podendo ocasionar o crescimento excessivo das algas planctônicas, gerando o fenômeno conhecido como

eutrofização (Wiegand *et al.* 2016). Por isso, vários estudos visam o desenvolvimento de alternativas complementares ou novas tecnologias de fertilização para que a agricultura continue crescendo e produzindo com qualidade (Dos Santos & Varavalho 2011; GlobalFert 2021).

Uma das alternativas bastante estudada consiste no uso de microrganismos capazes de incrementar a disponibilidade e absorção de P para as plantas, a partir de fosfatos em formas insolúveis no solo (Velloso 2019; Oliveira *et al.* 2009; Vieira Velloso *et al.* 2020). Neste caso, vários grupos de microrganismos estão sendo isolados e avaliados quanto ao seu potencial para aproveitamento de fontes de baixa solubilidade de P e sua disponibilização para as plantas (Batista *et al.* 2018; Garcia-Lopez *et al.* 2016) visando minimizar o uso de fertilizantes fosfatados, os custos de produção e os impactos ambientais (Batista *et al.* 2018; Garcia-Lopez *et al.* 2016; Santos *et al.* 2021).

2.3 MICRORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO – MSF

Os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) desempenham um papel importante nas principais etapas do ciclo do P no solo, como a dissolução-precipitação, mineralização-imobilização e sorção-dessorção que promove o crescimento das plantas. De modo geral, os mecanismos utilizados pelos microrganismos transformam fósforo inorgânico (P_i) e fósforo orgânico (P_o)-insolúveis em formas de P solúvel e regulam a ciclagem biogeoquímica do P em agroecossistemas (Penn & Camberato 2019).

No solo vive um grande número de microrganismos incluindo bactérias solubilizadoras de fosfato (BSF), fungos solubilizadores de fosfato (FSF), actinomicetos e cianobactérias. Vários fungos micorrizicos arbusculares (FMA) como *Rhizoplagus irregularis* e *Glomus mosseae* podem solubilizar P_i diretamente através da exsudação de ácidos orgânicos (Etesami & Jeong 2021).

BSF do solo são cruciais para o crescimento vegetal (García-López *et al.* 2016). Dentre as principais espécies de bactérias solubilizadoras de fosfatos (BSF), destacam-se *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, *Burkholderia gladioli*, *Pantoea ananatis*, *Pseudomonas* sp, *Serratia marcescens*, todos esses grupos apresentam grande

capacidade de solubilizar fosfato e disponibilizar P para as plantas (Abreu 2014; Rodríguez & Fraga 1999; Varma *et al.* 2017; Bodhankar *et al.* 2017).

O uso combinado de fosfatos de rocha e MSFs tem sido considerada uma estratégia sustentável em termos econômicos e ambientais (Richardson 2001; Gomes *et al.* 2014; Rodríguez González *et al.* 2020), proporcionando ganhos de produtividade, economia de investimentos e incremento da renda dos agricultores. Os microrganismos solubilizadores de fosfatos são capazes de disponibilizar o P complexado a Ca, Fe e Al no solo (Richardson & Simpsons 2011; Vassilev *et al.* 2014).

Além disso, MSF auxiliam indiretamente na indução de resistência sistêmica em plantas à patógenos e diretamente, produzindo compostos que inibem o crescimento de fungos e bactérias fitopatogênicas (Rodríguez *et al.* 2020). Esse conjunto de atividades demonstram o potencial desses microrganismos como alternativas eficazes para uma agricultura sustentável, ecologicamente correta e lucrativa (Rodríguez *et al.* 2020; Rizvi, A. *et al.* 2017).

2.4 MECANISMOS DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO

No solo a proporção maior de P está fixada em formas que a planta não consegue absorver diretamente. Para tanto, é importante entender que as formas disponíveis e assimiláveis às plantas são íons ortofosfatos (H_2PO_4^- ou HPO_4^{2-}), presentes na solução do solo que corresponde a 0,01% do P total (Mitter *et al.* 2021; Penn & Camberato 2019).

De fato, os microrganismos solubilizadores de fosfato realizam função significativa no solo, promovendo e transformando as formas complexadas de P solúvel para as plantas, envolvendo processo de solubilização, de quelação, de mineralização e imobilização do P que direta ou indiretamente contribui no desenvolvimento das plantas (Yahya *et al.* 2021).

A relação dos microrganismos com o solo da rizosfera envolve a ocorrência de processos metabólicos importantes, tais como liberação de ácidos orgânicos, produção de sideróforos, secreção de íons H^+ , produção de enzimas fosfatases, fixação de nitrogênio e produção de fitormônios (Mendes *et al.* 2021; Souto 2020). Um dos principais mecanismos desses processos biológicos consiste na liberação de ácidos orgânicos que podem ser diferentes dependendo das condições do meio,

condições nutricionais, fisiológicas e o crescimento da cultura (Barroso 2006). Além disso, outro mecanismo importante para a dissolução do fosfato ligado ao ferro é a produção de sideróforos pelos microrganismos rizosféricos (Sharma *et al.* 2013; Batista *et al.* 2018).

2.5 PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS

Os ácidos orgânicos (AO) são substâncias com organização estrutural geral R-COOH, podendo ser provenientes de ácidos carboxílicos, como aminoácidos, ácidos graxos, coenzimas e metabólitos intermediários (Tian *et al.* 2021). Existe uma diversidade de ácidos que podem ser sintetizadas através do metabolismo de bactérias e fungos (Alori *et al.* 2017), que promovem a acidificação da célula microbiana e o ambiente a sua volta (Fabiańska *et al.* 2019). Por meio da liberação de AO como cítrico, glucônico, oxálico, glutâmico, láctico, fumárico, tartárico e succínico, estes agem como doadores de prótons e agentes quelantes de íons, ocorre a solubilização de P no solo (Oliveira, 2016).

A produção de ácidos orgânicos pode variar em quantidade e tipos (Yahya *et al.* 2021). Alguns gêneros bacterianos, como *Bacillus*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* dentre outros, são capazes de liberar ácido láctico, acético, cítrico, oxálico, málico, fumárico, succínico e glucônico (Shivastava *et al.* 2018), por combinação de fonte de cálcio, e ácidos cítrico e oxálico por combinação de fonte de ferro (Tian *et al.* 2021; Kaur & Reddy 2014; Liang *et al.* 2020; Rodríguez & Fraga 1999).

Esses ácidos atuam dissolvendo diretamente o material fosfatado ou quelando os cátions (Ca, Mg, Fe, Al, Mn e Zn) que acompanham o ânion fosfato, liberando o P no solo (Richardson *et al.* 2001; Cerecetto *et al.* 2021). Além disso, alguns microrganismos podem liberar outros ácidos inorgânicos que auxiliam no processo de solubilização de fosfato. Através do metabolismo microbiano pode ocorrer a produção de ácido nítrico, sulfúrico e carbônico com capacidade de dissolver o íon fosfato preso em rochas fosfáticas e minerais de argila (Bini & Lopez 2016). Considerando a diversidade química dos AO e seu importante papel na solubilização de P, é de grande importância a investigação dos ácidos gerados pelas bactérias solubilizadoras de P e seu uso como potenciais tecnologias agrícolas.

2.6 PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS

O ferro (Fe) é um nutriente imóvel no solo, mas essencial para todos os organismos vivos. Dentre as propriedades químicas do Fe, destaca-se a sua capacidade de receber e doar elétrons, interconvertendo-se entre a forma férrica (Fe^{3+}) e ferrosa (Fe^{2+}) (Santos 2012; Benite *et al.* 2002). Embora o Fe seja abundante na crosta terrestre, na forma Fe^{3+} este elemento apresenta baixa solubilidade e, portanto, não é prontamente disponível e assimilável pelos organismos vivos (Viana *et al.* 2013). Essa propriedade do Fe é vital para a função dos citocromos, em moléculas que ligam e transportam o oxigênio e várias enzimas que executam o processo redox, transportando elétrons (Fedrizzi 2006; Benite *et al.* 2002).

Dessa maneira, para minimizar a baixa solubilidade do ferro, microrganismos e plantas desenvolveram mecanismos para assimilação de ferro do solo. Sideróforos são peptídeos de baixa massa molecular, substâncias quelantes de íons naturais, produzidos por microrganismos em ausência de ferro e beneficia as plantas, devido a sua grande afinidade por íons Fe^{3+} , sendo responsáveis pela solubilização e transporte deste elemento até as células dos microrganismos que os produzem (Santos *et al.* 2014; Simionato *et al.* 2010; Hamdali *et al.* 2008; Gomes *et al.* 2016; Benite *et al.* 2012). Além disso, os sideróforos também podem gerar complexos estáveis com Al(III), Cu(II), Ca(II), Zn(II) e outros íons metálicos existentes no meio ambiente (Arora & Verma 2017).

As plantas absorvem pelas raízes o Fe na solução do solo mais rapidamente como íons Fe^{2+} , mas em algumas situações, como íons Fe^{3+} . Santos *et al.* (2014) relatou que *Bacillus megaterium* tem a capacidade de produzir sideróforos sob condições de baixos níveis de Fe no solo. Essa bactéria produz e secreta os sideróforos que se ligam com ferro férrico e o transportam para dentro de sua célula. Além disso, microrganismos do solo podem solubilizar formas não disponíveis de P, fixado em moléculas de ferro, por meio da utilização de sideróforos (Sharma *et al.* 2013; Santos *et al.* 2014). Em estudos de Batista *et al.* (2018), conduzidos na Embrapa Milho e Sorgo, a produção de sideróforos pelos isolados bacterianos solubilizadores de fosfato variou significativamente e foi correlacionada com a capacidade de solubilização de P-Fe.

A atividade inibitória dos sideróforos sobre patógenos deve-se à concentração e afinidade dos microrganismos produtores dos íons de Fe, além do pH, pois a disponibilidade de Fe aumenta conforme o pH do solo reduz. A capacidade de produzir sideróforos confere vantagens competitivas sobre outras espécies de bactérias endofíticas para a colonização de tecidos vegetais e a exclusão de outros microrganismos do mesmo nicho ecológico (Souza *et al.* 2015). Segundo Gomes (2016), a produção de sideróforos por *Pseudomonas* foi capaz de inibir o desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* em solo deficiente de ferro.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de espécies de bactérias endofíticas quanto à solubilização de fosfatos ligado a ferro e investigar os mecanismos envolvidos neste processo *in vitro* e *in vivo*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a capacidade e eficiência de solubilização do fosfato de ferro pelas bactérias endofíticas *in vitro*;
- Investigar mecanismos de solubilização de fosfato de ferro, por meio de avaliação da produção de sideróforos e produção de ácidos orgânicos *in vitro*;
- Avaliar, em condições controladas, o crescimento e acúmulo de nutrientes de milho inoculado com microrganismos solubilizadores de fosfato selecionados e adubado com fosfato de ferro, *in vivo*.

4 METODOLOGIA

4.1 SELEÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO

Nesse estudo foram utilizadas 15 bactérias endofíticas pertencentes à Coleção de Microrganismo Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo, previamente caracterizados como eficientes na solubilização de fosfato de cálcio (Oliveira *et al.* 2009; De Abreu *et al.* 2017; Ribeiro *et al.* 2015). As estirpes foram: (B1912, B2093, B2109), *Pantoea* sp. (B1917); *Bacillus subtilis* (B1935, B2099, B2111); *Bacillus pumilus* (B1923); *Klebsiella* sp. (B1924); *Burkholderia gladioli* (B1928); *Pantoea ananatis* (B1934, B1931); *Enterobacter* sp. (B2010); *Pseudomonas* sp. (B2096); *Serratia* sp. (B2100).

Os microrganismos foram reativados em meio BDA (Batata 200 g.L⁻¹; Dextrose, 20 g.L⁻¹ e Agar, 15 g.L⁻¹) empregando o método de estrias para obtenção de colônia pura e em seguida, foram incubadas a 25 – 28 °C durante 5 dias com três repetições.

4.2 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE E EFICIÊNCIA DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE FERRO EM MEIO LÍQUIDO

As culturas bacterianas foram crescidas em caldo nutriente durante três dias, a 28 °C ± 2 e sob agitação constante de 150 rpm. Após esse período, a turbidez de cada cultura foi ajustada para uma unidade 1,0 de densidade óptica a 540 nm, correspondendo a 10⁸ células.mL⁻¹.

Para avaliação da eficiência de solubilização de fosfato de ferro, foi utilizado o meio líquido MS para solubilização descrito por Nahas *et al.* 1994 (Barroso & Nahas 2005). Esse meio consiste de NaCl 0,1 g.L⁻¹; NH₄Cl 1,0 g.L⁻¹; KCl 0,2 g.L⁻¹; CaCl₂.2H₂O 0,1 g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 1,2 g.L⁻¹; glucose 10,0 g.L⁻¹; extrato de levedura 0,5 g.L⁻¹. Foram utilizados 40 mL de meio de cultivo distribuídos em Erlenmeyer de 125 mL contendo 2,0 g.L⁻¹ de fosfato de ferro – Fe (PO₄)⁻ como única fonte de P. Posteriormente, o meio foi autoclavado por 15 minutos a 121 °C, o pH foi ajustado

para 7,5 com 110 μL hidróxido de sódio (NaOH) 1 M estéril. Em seguida, alíquotas de 200 μL de cada suspensão de células foram inoculadas em triplicata nesse meio de cultura e incubadas durante 10 dias, sob agitação constante de 130 rpm, à temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$. Em seguida, as culturas foram transferidas para tubos falcon, e centrifugadas por 10 minutos 8.000 rpm e o sobrenadante filtrado em um papel de filtro Whatman nº42.

Para a determinação do fósforo solubilizado foi aplicado o método colorimétrico de Murphy & Riley (1962) em espectrofotômetro com o comprimento de onda de 880 nm, subtraindo-se o P solúvel contido nas amostras que foram incubadas pelo valor de P contido na amostra controle (meio de cultura com P-Fe sem inoculação) e uma curva padrão de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) para quantificação do P em mg.L^{-1} . O pH foi determinado no restante do filtrado de todas as amostras, incluindo os controles. Todos os materiais utilizados nas medições foram previamente lavados com ácido clorídrico (10 % v/v), para remover qualquer resíduo de fósforo potencial na vidraria.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS

Para determinação da concentração dos ácidos orgânicos, o sobrenadante da análise de solubilização de fosfato de ferro foi filtrado em membrana PES de 0,22 μm e quantificados por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), modelo Alliance 2695 marca Waters (equipado com detector de Conjunto de Fotodiodo (PAD)) operando no comprimento de onda de 210 nm e com a temperatura da célula do detector a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. A coluna utilizada foi AMINEX – HPX 87H – BioRad eluída com uma fase móvel de H_2SO_4 com 5 mMol.L^{-1} em fluxo de 0,6 mL.min^{-1} . Os picos correspondentes a cada ácido foram identificados pelo tempo de retenção, utilizando-se como comparação os tempos de retenção dos padrões e também de acordo com o espectro de cada padrão no detector de arranjo de diodos (DAD). Os ácidos orgânicos analisados foram: acético, 2-cetoglucônico, fórmico, glucônico, cítrico, láctico, oxálico, propiônico e succínico. A concentração obtida foi expressa em mmol.L^{-1} de ácido.

4.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE E EFICIÊNCIA DAS BACTÉRIAS NA PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS

As estirpes bacterianas foram pré-cultivadas em meio caldo nutriente e crescidos por três dias a 28 °C. Posteriormente foram preparadas suspensões bacterianas com uma densidade ótica igual a 0,5 (DO = 0,5 a 540 nm) em solução salina [0,85% (m/v) NaCl]. Alíquota de 60 µL de cada suspensão bacteriana foi inoculada com três repetições em 3 mL de meio de cultura caldo nutriente diluído seis vezes e incubadas por 72 h a 28 °C± 2, sob agitação de 150 rpm.

Após esse intervalo, as culturas foram transferidas para tubos tipo Eppendorf de 1,50 mL e centrifugadas durante 10 minutos a 12000 rpm. Cem microlitros do sobrenadante de cada cultura foi coletado e transferido para uma microplaca de 96 poços, onde foram acrescentados 100 µL do reagente CAS (*Chrome Azurol S*) (Schwyn & Neilands 1987). A solução CAS foi preparada a fresco adicionando cuidadosamente nessa ordem, 50 mL de ácido succínico 118,06 g.L⁻¹ com pH-5,6; 25 mL de brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) 1,82 g.L⁻¹; 1,5 mL de cloreto de ferro III (FeCl₃.6H₂O) 0,27 g.L⁻¹ (diluído em 0,84 mL.L⁻¹ de HCl), e 7,5 mL de cromo azurol 1,21 g.L⁻¹, completando com água Milli-Q para um volume final de 100 mL de solução CAS. Após 20 minutos, as microplacas foram analisadas em espectrofotômetro (630 nm).

A quantidade de sideróforos produzido por cada cultura foi estimada por meio da utilização de uma curva padrão exponencial, contendo 0 a 90 µM de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Como controle negativo, foram utilizados meios de culturas não inoculados. Os ensaios foram plotados considerando a descoloração (d) da solução CAS (%) em função da concentração de sideróforos (1). Presumindo uma associação de equilíbrio de dissociação, os dados foram ajustados usando (2) com $y_{max}=100$ (Mehnert *et al.* 2017). Todas as vidrarias utilizadas nas análises de produção de sideróforos foram tratadas com ácido clorídrico (HCl) 6 M para a remoção de resíduo de ferro.

$$(1) \quad d = \frac{A_{ref} - A_{sob}}{A_{ref}} \frac{A_0}{A_0} \qquad (2) \quad y = y_{max}(1 - e^{-kx})$$

Zero absorbância (A0) = 75 mM EDTA

Absorbância Referência (Aref) = meio de cultura sem inoculação e solução CAS

Absorbância da Amostra (Asob) = sobrenadante de amostra e solução CAS.

4.5 EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DOS MICRORGANISMOS INOCULADOS SOBRE O CRESCIMENTO DE PLANTAS DE MILHO

Nos experimentos em casa de vegetação, foram selecionadas cinco estirpes B1931 de *Pantoea ananatis*, B2096 de *Pseudomonas* sp., B2010 de *Enterobacter* sp., B1935 de *Bacillus* sp. e B1923 de *Bacillus subtilis*, com base na eficiência de produção de sideróforos e solubilização de fosfato de ferro.

Foram conduzidos dois experimentos em casa de vegetação da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG. No primeiro experimento foi utilizado um solo de mata natural da região de Cambuquira- MG, com as seguintes características físico-químicas: pH H₂O: 6,3; pH CaCl₂: 5,7; P meh.: 34,6 mg.dm⁻³; K⁺: 0,30 cmolc.dm⁻³; Al³⁺: 0,0 cmolc.dm⁻³; Ca²⁺: 3,74 cmolc.dm⁻³; Mg²⁺: 0,81 cmolc.dm⁻³; H+Al = 1,80 cmolc.dm⁻³; SB (soma de bases) =4,85 cmolc.dm⁻³; V (saturação de bases) = 73 %; M.O. (matéria orgânica): 2,8 dag.Kg⁻¹; B: 0,33 mg.dm⁻³; Cu: 5,9 mg.dm⁻³; Fe: 55 mg.dm⁻³; Mn: 18,3 mg.dm⁻³; Zn: 4,1 mg.dm⁻³ e teor de argila = 445 g.kg⁻¹; silte: 50 g.kg⁻¹ e areia total: 505 g.kg⁻¹ com 5,64% de óxidos Fe, 11,26% de Al₂O₃ e 72,50% de SiO₂.

No segundo experimento foi utilizado outro solo denominado como artificial, conforme descrito a seguir. Este solo artificial, foi composto por dois tipos de areia de aquário (fina e grossa) e mistura a caulinita (argila) de composição Al₄(Si₄O₁₀).(OH)₈. A proporção usada foi de 56% da areia branca grossa para 24% da areia fina e 20% de caulinita, sendo que essa mistura foi realizada dez dias antes da montagem do experimento. Foram misturados os três compostos e adicionando água aos poucos até formar uma massa, que foi deixada para secar por 24 horas e em seguida, umedecida novamente para que a caulinita formasse agregados. Esse processo foi realizado por três vezes e posteriormente a mistura foi autoclavada por 30 minutos a 121°C e secada em estufa a 65°C.

Foram utilizados tubetes de 300 g de capacidade nos quais foram usados barbantes para auxiliar na irrigação e adicionados seixos de pequenas espessuras para cobrir o fundo dos tubetes e não permitir a saída dos solos. Para o preparo do

inoculante, os microrganismos foram crescidos em meio de cultura Caldo Nutriente (*Nutrient Broth*) por três dias a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, sob agitação constante de 130 rpm. Posteriormente as culturas foram centrifugadas por 10 minutos, a 8000 rpm e preparadas suspensões bacterianas com solução salina [0,85% (m/v) NaCl].

As suspensões bacterianas foram ajustadas à absorbância igual a 1,0 em comprimento de onda de 540 nm para padronização final do inoculante na concentração de 10^8 células.mL⁻¹. Em seguida, para cada 2 mL de suspensão bacteriana foram adicionados 0,20 g de biomafix (Bioma), para melhorar a aderência das culturas nas sementes. A mistura inoculante mais semente foi homogeneizada e deixada em repouso até o momento do plantio.

No primeiro experimento, foi utilizado o solo de mata de origem vulcânica, que não recebeu nenhum tratamento químico e por nunca ter sido cultivado, não houve a necessidade de fazer calagem, porque esse solo possui alta fertilidade natural. Houve aplicação de 0,74 g.L⁻¹ de ácido bórico (H₃BO₄) usando apenas 1 mL.L⁻¹ de solução nutritiva, 84 g.L⁻¹ de nitrato de amônio (NH₄NO₃- 60 ppm) e apenas 2 mL para cada 1 litro de solução nutritiva. Essa solução nutritiva de boro e nitrogênio foi aplicada no dia do plantio.

Os tratamentos constituíram de um delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições e 12 tratamentos, totalizando 6 tratamentos relativos ao tipo de inoculação (sem bactéria e os cinco estirpes bacterianas) e dois tipos de adubação, sem fósforo e com fosfato de ferro (FePO₄) na dose de 150 kg.ha⁻¹ de P₂O₅, (Tabela 1). Em cada tubete, foram semeadas cinco sementes de milho AG 7098PRO2 deixando-se três plantas por tubete após o desbaste, efetuado no 8º dia após o plantio. Posteriormente ao 9º dia, foi realizada a reinoculação das bactérias com 1 mL de solução bacteriana por planta. O experimento foi coletado após 28 dias de crescimento.

No segundo experimento, os tratamentos constituíram de um delineamento inteiramente casualizado sendo oito tratamentos no total, com seis tratamentos diferentes ao tipo de inoculação (sem bactéria e cinco com bactérias) com fosfato de ferro (FePO₄) a 150 kg.ha⁻¹ de P₂O₅ de fonte de P e dois tipos de controle (ausência de fósforo e com fósforo na solução nutritiva) em blocos com cinco repetições (Tabela 2). No dia do plantio e a cada cinco dias, as plantas foram irrigadas com solução nutritiva (*Hoagland*), (Velloso 2019) com modificações, preparadas individualmente todas as soluções estoque de macronutrientes em frasco ambar, e no dia da aplicação realizada a mistura, composta por 2 mL de sulfato de potássio (K₂SO₄) 44,5 g.L⁻¹; 1

mL de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) $136,0 \text{ g.L}^{-1}$; 2 mL de cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) $221,0 \text{ g.L}^{-1}$; 2 mL de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) $215,0 \text{ g.L}^{-1}$; 2 mL de nitrato de amônio (NH_4NO_3) – 60 ppm $84,0 \text{ g.L}^{-1}$ e 1 mL de Fe EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_8\text{FeNa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) $32,4 \text{ g.L}^{-1}$ e 1 mL de solução estoque de micronutrientes contendo $0,74 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido bórico (H_3BO_3); $0,37 \text{ g.L}^{-1}$ de molibdato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$); $0,22 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de zinco; $1,52 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato manganoso ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e $0,07 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de cobre (CuSO_4), para obter um volume final de 1 litro. Foram semeadas cinco sementes de milho AG 7098PRO2 deixando-se três plantas por tubete após o desbaste, efetuado oito dias após o plantio. Após nove dias, foram feitas reinoculação com 1 mL de solução bacteriana por planta. O experimento foi coletado aos 43 dias de crescimento.

Tabela 1- Eficiência agrônômica da inoculação simples com as bactérias endofíticas, com solo de mata natural, de origem vulcânica da região de Cambuquira-MG e sobre o crescimento de plantas de milho em casa de vegetação.

Tratamentos	Inoculante	Identificação	Fonte
1	B0	Controle	
2	B1931	<i>Pantoea ananatis</i>	
3	B2096	<i>Pseudomonas</i> sp.	Sem FePO_4
4	B2010	<i>Enterobacter</i> sp.	
5	B1923	<i>Bacillus pumilus</i>	
6	B1935	<i>Bacillus subtilis</i>	
7	B0	Controle	
8	B1931	<i>Pantoea ananatis</i>	
9	B2096	<i>Pseudomonas</i> sp.	Com FePO_4
10	B2010	<i>Enterobacter</i> sp.	
11	B1923	<i>Bacillus pumilus</i>	
12	B1935	<i>Bacillus subtilis</i>	

Tabela 2- Eficiência agronômica da inoculação simples com as bactérias endofíticas, com solo artificial e sobre o crescimento de plantas de milho em casa de vegetação.

Tratamentos	Inoculante	Identificação	Fonte
1	B0	Sem adubação P	Sem FePO ₄
2	B0	Com adubação P	
3	B0	Sem P	Com FePO ₄
4	B1931	<i>Pantoea ananatis</i>	
5	B2096	<i>Pseudomonas</i> sp.	
6	B2010	<i>Enterobacter</i> sp.	
7	B1923	<i>Bacillus pumilus</i>	
8	B1935	<i>Bacillus subtilis</i>	

Na coleta dos experimentos, foram medidas as alturas das plantas (cm) (AP), altura da folha bandeira (cm) (AFB) e área foliar (cm²) (AF). Foram separados o sistema radicular da parte aérea, sendo o sistema radicular fotografado com uma câmera digital (Nikon D300S SLR). As imagens obtidas foram analisadas com o auxílio dos softwares RootReader2D e WinRhizo v. 4.0 (Regent Systems, Quebec, Canadá), sendo quantificadas as características relacionadas a morfologia radicular: comprimento radicular total (cm) (CRT), comprimento radicular com diâmetro entre 0 e 1,0 mm, 1,0 e 2,0 mm e maiores que 2,0 mm, (CR1, CR2 e CR3) respectivamente, área superfície total (cm²) (AST), área de superfície de raízes com diâmetro entre 0 e 1,0 mm, 1,0 e 2,0 mm e maiores que 2,0 mm, (AS1, AS2 E AS3) respectivamente, volume radicular (cm³) (VR), diâmetro médio da raiz (mm) (D) (De Sousa *et al.* 2012).

As raízes e as partes aéreas das plantas de milho foram colocadas separadamente em sacos de papel e secos em estufa com circulação forçada a 65 °C e pesados em balança de precisão após a obtenção do peso constante. A massa seca total (PST) foi calculada somando-se a massa seca da parte aérea (PSPA) e a massa seca da raiz (PSR). Além disso, o peso seco dentro de cada repetição foi dividido pelo número de plantas dentro da repetição, obtendo-se o peso médio por planta. Em seguida, as amostras foram encaminhadas para análise do teor de nutrientes. O solo foi armazenado para análise do teor de P (Olsen) e análise química de elementos maiores de minerais por Fluorescência de Raios-X (Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES).

4.6 ANÁLISE QUÍMICA DE ELEMENTOS MAIORES POR FLUORESCÊNCIA DE RAIO X

As amostras de solo foram enviadas para o Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnologia e Inovação CRTI na Universidade Federal de Goiás - UFG – GO. Aproximadamente 5,0 gramas de solo de cada amostra foi separada por quarteamento manual e pulverizada em moinho planetário de bolas (ágata) por 40 minutos, posteriormente as amostras foram secas em estufa a 105 °C por 12 horas e destinadas à determinação da perda na ignição (LOI) ou ganho na ignição (GOI). Para determinação do LOI ou GOI, as amostras foram calcinadas a 1000 °C por 5 horas. Uma alíquota de 1,0 grama de cada amostra, previamente calcinada, foi fundida com 9,0 gramas de tetraborato de lítio.

As medidas de fluorescência de raios X (FRX) foram realizadas em um espectrômetro ZSX Rigaku modelo Pirmus IV, equipado com tubo de Rh. Para análise dos óxidos maiores, a calibração foi realizada com uma curva composta por padrões de rochas e minerais naturais certificadas. Os valores obtidos para os óxidos maiores estão representados em porcentagem (%) de massa, em base úmida.

4.7 ANÁLISE DO TECIDO VEGETAL DAS PLANTAS DE MILHO

As amostras de tecidos da parte aérea e raiz das plantas de milho foram enviadas para o laboratório de análise de solo, tecido vegetal e fertilizante na Universidade Federal de Viçosa UFV – MG. As amostras foram novamente secas em estufa de circulação forçada durante 72 horas por 68 a 72 °C. Em seguida, as amostras foram moídas em moinhos de facas de aço inox, posteriormente homogeneizadas por agitação, acondicionadas em frascos de vidro. Todos os recipientes utilizados nas análises estavam livres de contaminação. O procedimento de descontaminação da vidraria foi feito com escova e sapólio, mergulhando-se, em seguida, os recipientes em uma bandeja com solução de ácido clorídrico (HCl) a 2 % por um período de cinco minutos e enxaguando-os em água deionizada. Após a drenagem do excesso de água, os recipientes foram colocados em estufa para secagem. O método para determinação dos teores de P foi realizado por digestão

nítricoperclórica, onde pesou 0,5 g do material moído, despejando-os em tubos de digestão, e posteriormente adicionado 10 mL da mistura de ácido nítrico + ácido perclórico na proporção 4:1 dentro de capela de exaustão. O material foi levado em chapa quente pré-aquecida a 80 °C e aumentar a temperatura gradativamente até atingir 200 °C. Assim que o extrato ficou cristalino, foi retirado da chapa para resfriamento. Em cada amostra o volume foi completado para 25 mL com água deionizada. A determinação do P, foram quantificados utilizando espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado- (ICP- OES; Perkin Elmer Modelo Optima 8300 DV). O equipamento foi calibrado com solução multielementar na mesma matriz das amostras em diferentes intervalos de concentrações conforme descrito a seguir: K: 3 a 300 mg.L⁻¹; Ca: 2,4 a 240 mg.L⁻¹; Mg: 2,0 a 200 mg.L⁻¹; S e P: 0,8 a 80 mg.L⁻¹; Fe: 0,4 a 40 mg.L⁻¹; Mn: 0,2 a 20 mg.L⁻¹; Cu, Zn e B: 0,02 a 2 mg.L⁻¹.

4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ÁCIDA E ALCALINA

Para determinação da atividade da fosfatase foi empregado o método preconizado por Tabatabai *et al.* (1994). Amostras de 0,150 g de solo foram tratadas com 0,48 mL de solução contendo TRIS e os ácidos málico, cítrico e bórico, cujo pH foi ajustado de acordo com a fosfatase a ser analisada; pH 6,5 para ácida e 11,0 para alcalina. Em seguida, adicionou-se 0,12 mL de solução *p*-nitrofenil fosfato de sódio 0,05M e elas foram incubadas por uma hora a 37°C.

Após a incubação, adicionou-se 0,12 mL de solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) 0,5M e 0,48 mL da solução NaOH 1M, seguindo-se homogeneização em Vórtex e posterior centrifugação a 8.000 rpm por cinco minutos. A leitura do sobrenadante foi realizada no espectrofotômetro a 400 nm. Foi usado uma curva padrão com *p*-nitrofenil fosfato de sódio 0,05 M.

4.9 DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO DISPONÍVEL OLSEN

Extração de fósforo foi feita utilizando 2 g de amostra de solo em Erlenmeyer de 125 mL com adição de 20 mL solução de bicarbonato de sódio 0,5 N; a pH 8,5.

Agitado por 30 minutos com órbita de 200 rpm. O método original é de OLSEN (Van Raij *et al.* 1978; Olsen 1953). Posteriormente, as amostras foram filtradas em papel de filtro quantitativo Whatman nº42 em copos descartáveis de 50 mL.

Posteriormente 2 mL do extrato da amostra foi transferida para outro copo e adicionado 4 mL de solução de molibdato de amônio diluído, deixando agir por uma hora para desenvolver a cor. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com densidade ótica de 660 nm.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados dos experimentos de laboratório foram submetidos a análise de variância ($p < 0,05$) utilizando o programa Sisvar (Ferreira 2011) e, quando ocorreu diferença significativa entre as médias, procedeu-se de comparações entre elas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As análises de correlação de Pearson foram realizadas utilizando o programa EXCEL a 5% de probabilidade. Os experimentos de casa de vegetação, foram submetidos a análise de variância e teste de Tukey ($p < 0,05$). O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC), usando fatorial duplo apenas para o solo da região de Cambuquira (fertilização e inoculação com bactérias) através do programa estatístico Sisvar (Ferreira 2011).

5 RESULTADOS

5.1 MECANISMOS DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE FERRO EM MEIO LÍQUIDO.

Houve diferença significativa para as estirpes testadas quanto a liberação do fósforo, pH e produção de sideróforos (Tabela 3). Dentre as avaliadas a B2093 e B1931 *Pantoea ananatis* apresentaram menor liberação de P (8,09 mg.L⁻¹) e maior liberação de P (49,02 mg.L⁻¹) respectivamente, em relação ao controle não inoculado.

As estirpes B1931 de *Pantoea ananatis* e B2096 de *Pseudomonas* sp. foram as mais eficientes na solubilização de P com valores de 11,49 % e 11,04 % em relação ao fósforo total aplicado no meio de cultura, respectivamente, seguidas por B1934 de *Pantoea ananatis* e B1923 de *Bacillus* sp. com 9,71 % e 5,67 %, respectivamente, apresentando diferença significativa em relação ao controle não inoculado (Tabela 3).

Houve diferenças significativas nos valores de pH com o uso de diferentes estirpes (Tabela 3). De modo geral, todas apresentaram redução do pH no meio de cultura, com algumas estirpes apresentando valores de pH próximos a 2,84 para estirpe B1923 *Bacillus pumilus* e 2,90 para estirpes B1931 *P. ananatis* e B1912, diferindo das demais. Os dados revelaram uma correlação significativamente moderada e negativa ($r = -0,57$) entre a solubilização de P e os valores de pH no meio de cultura para os microrganismos testados.

Tabela 3- Valores médios de fósforo liberado em meio de cultura contendo o fosfato de ferro (mg. L^{-1} e %) no 10º dia, pH final do meio de cultura e a quantificação da produção de sideróforos (μM) em 72 horas por bactérias endofíticas.

Estirpes	Identificação	P-Fe		pH	Sideróforos
		(mg. L^{-1})	%		(μM) 72H
-	Controle	0,002 ± 0,09 f	0,04	5,71 ± 0,02 l	0,05 ± 0,04 f
B1931	<i>Pantoea ananatis</i>	49,02 ± 1,83 a	11,49	2,90 ± 0,01 b	11,56 ± 0,19 e
B2096	<i>Pseudomonas</i> sp.	53,13 ± 6,48 a	11,04	3,23 ± 0,02 f	19,44 ± 0,60 c
B1934	<i>Pantoea ananatis</i>	39,87 ± 2,21 b	9,71	2,97 ± 0,01 c	24,48 ± 1,19 b
B1917	<i>Pantoea</i> sp.	18,38 ± 1,47 c	4,91	3,19 ± 0,00 f	ns
B1923	<i>Bacillus pumilus</i>	23,25 ± 1,08 c	5,67	2,84 ± 0,01 a	ns
B1924	<i>Klebsiella</i> sp.	20,25 ± 0,36 c	4,94	3,52 ± 0,01 i	ns
B1928	<i>Burkholderia gladioli</i>	18,98 ± 1,93 c	5,21	3,14 ± 0,01 e	ns
B1935	<i>Bacillus subtilis</i>	24,38 ± 0,15 c	5,34	3,03 ± 0,02 d	12,18 ± 0,66 e
B2010	<i>Enterobacter</i> sp.	21,98 ± 0,59 c	5,36	3,38 ± 0,00 g	15,70 ± 0,45 d
B2099	<i>Bacillus subtilis</i>	15,27 ± 0,53 d	3,73	3,45 ± 0,01 h	ns
B2100	<i>Serratia</i> sp.	14,45 ± 0,26 d	3,53	3,50 ± 0,02 i	18,32 ± 0,31 c
B2111	<i>Bacillus subtilis</i>	15,94 ± 0,88 d	3,89	3,47 ± 0,03 i	ns
B1912	-	8,43 ± 0,93 e	2,04	2,90 ± 0,02 b	11,24 ± 0,44 e
B2093	-	8,09 ± 0,30 e	1,97	3,43 ± 0,01 h	9,08 ± 0,55 e
B2109	-	9,38 ± 0,61 e	2,29	3,98 ± 0,03 j	28,42 ± 1,40 a

Resultados expressos a partir da média de 3 triplicatas ± erro padrão das médias, resultados seguidos de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott 5%). A porcentagem (%) da solubilização do P-Fe, foi calculado em relação a quantidade de fósforo total aplicado no meio de cultura; ns-não significativo.

5.2 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE E EFICIÊNCIA DE BACTÉRIAS NA PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS

Com relação a produção de sideróforo, observou-se uma diferença significativa entre as estirpes (Tabela 3), sendo que, os maiores valores de produção foram de 28,42 para estirpe B2109, valores de 24,48 μM para B1934 de *Pantoea ananatis*, 19,43 μM para B2096 *Pseudomonas* sp. e 15,70 μM para B2010 de *Enterobacter* sp.. A estirpe B2093 produziu menor quantidade de sideróforos (9,08 μM). Verificou-se uma correlação não significativa, e positiva de baixa magnitude ($r=0,37$) entre os resultados da solubilização de fosfato de ferro e a produção de sideróforos para as estirpes testadas.

5.3 PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS PELOS MSF

A análise cromatográfica para determinação de ácidos orgânicos produzidos por microrganismos endofíticos solubilizadores de fósforo foi realizada com o sobrenadante da solubilização de fosfato de ferro no tempo de incubação de 10 dias. Todas as estirpes produziram ácidos orgânicos (Tabela 4). Foi observada a produção de quatro ácidos orgânicos identificados por HPLC, como acético, 2-cetoglucônico, glucônico, fórmico. Quatro compostos não foram detectados nas amostras analisadas: ácidos cítrico, láctico, oxálico e succínico.

A quantidade de ácidos orgânicos variou, apresentando mínimos e máximos de 0,49 a 18,74 mmol.L^{-1} para acético, 1,52 a 9,69 mmol.L^{-1} para ácido 2-cetogluconico, 0,76 a 1,06 mmol.L^{-1} para ácido glucônico e 0,31 a 1,92 mmol.L^{-1} para ácido fórmico.

A estirpe B1924 de *Klebsiella* sp. produziu maior teor de ácido acético 18,74 mmol.L^{-1} e a estirpe B1912 produziu os maiores teores de ácidos 2-cetoglucônico 9,69 mmol.L^{-1} e glucônico 1,06 mmol.L^{-1} . O maior teor de ácido fórmico foi produzido pelas estirpes *P. ananatis* (B1934) e *B. subtilis* (B1935). A estirpe B2096 (*Pseudomonas* sp.) e B1934 (*P. ananatis*) produziram ácidos orgânicos em três picos não identificados conforme a tabela 4.

Tabela 4- Ácidos orgânicos produzidos pelas estirpes bacterianas durante a solubilização de fosfato de ferro, determinado por cromatografia líquida de alta performance.

Identificação	Produção de Ácidos Orgânicos 35° C (mmol.L ⁻¹)									
	Acético	2-Cetoglucônico	Glucônico	Fórmico	Cítrico	Lático	Oxálico	Succínico	Desconhecido ²	Total
(B1912)	nd	9,69 ± 0,48 b	1,06 ± 0,18 a	0,41 ± 0,06 c	nd	nd	nd	nd	nd	11,16 c
<i>Pantoea</i> sp.(B1917)	5,63 ± 0,05 b	nd	nd	0,95 ± 0,07 b	nd	nd	nd	nd	BC	6,58 d
<i>Bacillus pumilus</i> .(B1923)	3,15 ± 0,47 d	13,73 ± 0,70 a	0,76 ± 0,18 b	0,31 ± 0,05 c	nd	nd	nd	nd	nd	17,95 b
<i>Klebsiella</i> sp.(B1924)	18,74 ± 0,52 a	nd	nd	1,06 ± 0,09 b	nd	nd	nd	nd	BC	19,8 a
<i>Burkholderia gladioli</i> .(B1928)	4,87 ± 0,04 c	nd	nd	0,86 ± 0,04 b	nd	nd	nd	nd	B	5,73 d
<i>Pantoea ananatis</i> .(B1931)	0,49 ± 0,02 f	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	BC	0,49 e
<i>Pantoea</i> sp. (B1934)	0,61 ± 0,04 f	1,52 ± 0,31 e	nd	1,84 ± 0,13 a	nd	nd	nd	nd	ABC	3,97 d
<i>Bacillus subtilis</i> .(B1935)	0,26 ± 0,01 f	3,13 ± 0,23 d	nd	1,92 ± 0,21 a	nd	nd	nd	nd	AC	5,31 d
<i>Enterobacter</i> sp.(B2010)	5,01 ± 0,07 c	nd	nd	0,72 ± 0,13 b	nd	nd	nd	nd	BC	5,73 d
B2093	5,82 ± 0,13 b	nd	nd	0,56 ± 0,06 c	nd	nd	nd	nd	BC	6,38 d
<i>Pseudomonas</i> sp.(B2096)	1,17 ± 0,88 e	4,3 ± 0,70 c	nd	1,12 ± 0,26 b	nd	nd	nd	nd	ABD	6,59 d
<i>Bacillus subtilis</i> .(B2099)	4,89 ± 0,09 c	nd	nd	0,43 ± 0,01 c	nd	nd	nd	nd	BC	5,32 d
<i>Serratia</i> sp.(B2100)	4,78 ± 0,27 c	nd	nd	0,43 ± 0,03 c	nd	nd	nd	nd	BC	5,21 d
(B2109)	1,37 ± 0,10 e	nd	nd	0,36 ± 0,02c	nd	nd	nd	nd	CD	1,73 e
<i>Bacillus subtilis</i> .(B2111)	4,74 ± 0,20 c	nd	nd	0,42 ± 0,01 c	nd	nd	nd	nd	B	5,16 d

Resultados expressos a partir da média de 3 triplicatas ± erro padrão da média, ²compostos orgânicos desconhecidos eluídos nos seguintes tempos de retenção (min): A: 11,30, B: 17,29, C: 20,05 e D: 26,45. nd: não detectado. Resultados com a mesma letra na coluna não apresentam diferença significativa pelo teste Scott Knott ao nível de 5%.

5.4 EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DOS MICRORGANISMOS PARA O CRESCIMENTO DE PLANTAS DE MILHO

Para os parâmetros agronômicos avaliados em casa de vegetação: altura de planta (AP), altura da folha bandeira (AFB), área foliar (AF), massa seca da parte aérea (PSPA), massa seca da raiz (PSR) e massa seca total (PST), os resultados não foram significativos para os dois tipos de solos avaliados (solo artificial e solo de mata natural, de origem vulcânica da região de Cambuquira-MG), conforme mostrado nas tabelas 5 e 6.

Nos experimentos de morfologia radicular com solo artificial, as análises dos parâmetros avaliados não mostraram diferença significativa pelo teste de Scott-Knott de média ($p < 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 5- Dados médios para o crescimento agronômico da planta de milho em casa de vegetação, cultivada em solo artificial, com fosfato de ferro.

Tratamentos	Fonte	AP(cm)	AFB (cm)	AF (cm ²)	PSPA (g)	PSR (g)	PST(g)
Sem adubação P (B0)	Sem FePO ₄	25,85 a	15,80 a	10,30 a	0,41 a	0,36 a	0,77 a
*Com adubação P (B0)		25,30 a	15,95 a	9,10 a	0,46 a	0,38 a	0,85 a
Sem P (B0)	Com FePO ₄	27,50 a	17,45 a	13,14 a	0,48 a	0,36 a	0,83 a
<i>Pantoea ananatis</i> (B1931)		25,10 a	16,10 a	10,89 a	0,48 a	0,39 a	0,87 a
<i>Pseudomonas sp.</i> (B2096)		24,05 a	15,65 a	7,91 a	0,43 a	0,36 a	0,78 a
<i>Enterobacter sp.</i> (B2010)		25,70 a	17,50 a	8,13 a	0,50 a	0,39 a	0,89 a
<i>Bacillus pumilus</i> (B1923)		24,00 a	14,75 a	10,22 a	0,47 a	0,40 a	0,87 a
<i>Bacillus subtilis</i> (B1935)		24,25 a	14,55 a	10,71 a	0,44 a	0,40 a	0,84 a

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott de média ($p < 0,05$). Altura de planta (AP), altura da folha bandeira (AFB), área foliar (AF), massa seca da parte aérea (PSPA), massa seca da raiz (PSR) e massa seca total (PST).

*Tratamento com irrigação de solução nutritiva contendo fósforo.

Tabela 6- Dados médios para o crescimento agronômico da planta de milho em solo de mata natural, de origem vulcânica da região de Cambuquira-MG.

Tratamentos	AP (cm)		AFB (cm)		AF (cm ²)		PSPA (g)		PSR (g)		PST (g)													
	SF	CF	SF	CF	SF	CF	SF	CF	SF	CF	SF	CF												
Controle (B0)	28,65	aA	31,80	aA	18,00	aA	20,60	aA	15,84	aA	28,41	aA	0,39	aA	0,47	bA	0,28	aA	0,33	aA	0,67	aA	0,80	aA
<i>P. ananatis</i> (B1931)	29,17	aA	34,81	aA	16,33	aB	20,81	aA	17,60	aB	37,21	aA	0,50	aA	0,61	aA	0,33	aA	0,38	aA	0,83	aA	1,00	aA
<i>Pseudomonas</i> sp. (B2096)	22,31	aB	31,75	aA	18,06	aA	19,15	aA	21,24	aA	34,37	aA	0,44	aA	0,49	bA	0,31	aA	0,37	aA	0,75	aA	0,86	aA
<i>Enterobacter</i> sp. (B2010)	27,60	aA	32,26	aA	18,50	aA	18,85	aA	18,29	aA	15,79	bA	0,43	aA	0,48	bA	0,28	aA	0,35	aA	0,68	aA	0,82	aA
<i>Bacillus pumilus</i> (B1923)	22,15	aB	31,35	aA	15,95	aA	19,15	aA	25,74	aA	31,52	aA	0,40	aA	0,49	bA	0,29	aA	0,34	aA	0,71	aA	0,82	aA
<i>Bacillus subtilis</i> (B1935)	25,65	aA	29,00	aA	17,35	aA	17,00	aA	13,43	aA	21,34	bA	0,35	aA	0,42	bA	0,23	aB	0,30	aA	0,58	aA	0,72	aA
Médias	27,2	B	31,83	A	17,37	B	19,29	A	18,68	B	28,02	A	0,41	B	0,49	A	0,28	B	0,34	A	0,69	B	0,83	A

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si dentro de cada fonte de P pelo teste Scott-Knott de média ($p < 0,05$). Parâmetros com médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha, não diferente entre si pelo teste de Scott-Knott de média ($p < 0,05$). SF: sem FePO₄; CF: com FePO₄. Altura de planta (AP), altura da folha bandeira (AFB), área foliar (AF), massa seca da parte aérea (PSPA), massa seca da raiz (PSR) e massa seca total (PST). SF: sem FePO₄; CF: com FePO₄.

Tabela 7- Parâmetros morfológicos da raiz de milho inoculado com estirpes de bactérias solubilizadoras de fosfato, cultivado em solo artificial, com fonte de fosfato de ferro.

Tratamentos	Fonte	D (mm)	VR (cm ³)	SA (cm ²)	SA1 (cm ²)	SA2 (cm ²)	SA3 (cm ²)	CRT (cm)	CR1 (cm)	CR2 (cm)	CR3 (cm)
Sem adubação P (B0)	Sem FePO ₄	0,24 a	2,77 a	257,39 a	186,31 a	38,44 a	6,23 a	1913,14 a	1808,22 a	96,84 a	7,62 a
Com adubação P (B0)		0,22 a	3,31 a	306,06 a	219,28 a	48,21 a	5,99 a	2260,13 a	2131,22 a	120,55 a	7,85 a
Sem P (B0)	Com FePO ₄	0,30 a	2,77 a	282,41 a	209,75 a	38,12 a	4,25 a	2313,20 a	2209,47 a	97,93 a	5,21 a
<i>P. ananatis</i> (B1931)		0,25 a	3,46 a	326,26 a	237,12 a	48,63 a	6,25 a	2459,66 a	2328,81 a	122,51 a	7,76 a
<i>Pseudomonas</i> (B2096)		0,22 a	3,11 a	283,18 a	201,21 a	42,91 a	8,46 a	2060,40 a	1943,25 a	106,59 a	10,14 a
<i>Enterobacter</i> sp. (B2010)		0,26 a	3,49 a	323,01 a	226,96 a	50,38 a	10,00 a	2385,50 a	2247,28 a	125,59 a	12,02 a
<i>Bacillus pumilus</i> (B1923)		0,21 a	3,19 a	302,34 a	220,82 a	41,98 a	7,14 a	2282,56 a	2168,57 a	104,71 a	8,78 a
<i>Bacillus subtilis</i> (B1935)		0,24 a	3,22 a	312,45 a	235,59 a	39,23 a	5,04 a	2433,42 a	2327,41 a	99,40 a	6,20 a

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si dentro de cada fonte de P pelo teste Scott-Knott de média ($p < 0,05$). Parâmetros com médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha, não diferente entre si pelo teste de Scott-Knott de média ($p < 0,05$). SF: sem FePO₄; CF: com FePO₄. Diâmetro (D), volume radicular (VR), área de superfície radicular total (AS), área de superfície de raízes com diâmetro entre 0 - 1,0 mm (AS1), área de superfície de raízes com diâmetro entre 1,0 - 2,0 mm (AS2), área de superfície de raízes com diâmetro maior que 2 mm (AS3), comprimento radicular total (CRT), comprimento radicular com diâmetro entre 0 - 1,0 (CR1), comprimento radicular com diâmetro entre 1 - 2,0 (CR2), comprimento radicular com diâmetro maior que 2,0 (CR3). *Tratamento com irrigação de solução nutritiva contendo fósforo.

Na morfologia radicular do experimento com solo de mata natural, de origem vulcânica da região de Cambuquira-MG, não houve diferença significativa para os testes de volume radicular (VR); área superficial entre 1-2 mm (SA2) e comprimento radicular entre 1-2 mm (CR2). Por outro lado, as diferenças foram significativamente com efeitos positivos para cada estirpe nos experimentos realizados com e sem Fe. A estirpe B1931 de *P. ananatis*, por exemplo, apresentou diferença significativa para CRT (3270,0 cm) com fonte de P, quando comparada com o tratamento sem fonte de P (2013,6 cm). As estirpes B1923, B2010 e B1931 foram significativamente melhores que as demais estirpes com adição de fosfato de ferro para CRT, AS e AS1.

A estirpe B1931 apresentou melhores resultados na AS, AS1 e VR demonstrando valores de 2,59 cm e 3,84 cm para VR com fonte e sem FePO₄, respectivamente. A estirpe B2096 de *Pseudomonas* apresentou valores de 0,42 mm e 0,41 mm para D, com e sem FePO₄, respectivamente e CR3 com valores 2,58 cm com FePO₄ e 2,16 cm sem FePO₄. O desempenho da estirpe B2010 *Enterobacter* apresentou, para CR3, valores de 3,53 cm com FePO₄ e 0,90 cm sem FePO₄ (Tabela 8).

Tabela 8- Parâmetros morfológicos da raiz da planta de milho, inoculadas com estirpes de bactérias solubilizadoras de fosfato, com e sem fonte de fosfato de ferro em solo de mata natural, de origem vulcânica da região de Cambuquira- MG.

Tratamentos	D (mm)		AS (cm ²)		AS1 (cm ²)		AS2 (cm ²)		AS3 (cm ²)	
	SF	CF	SF	CF	SF	CF	SF	CF	SF	CF
Controle (B0)	0,39 aA	0,39 aA	424,61 aA	392,37 aA	344,03 aA	305,19 aA	40,22 aA	46,40 aA	1,14 aA	2,93 aA
<i>Pantoea ananatis</i> (B1931)	0,40 aA	0,39 aA	256,02 bB	397,22 aA	204,36 bB	304,86 aA	27,71 aB	52,66 aA	2,09 aA	1,92 aA
<i>Pseudomonas sp.</i> (B2096)	0,42 aA	0,40 aA	377,65 aA	416,22 aA	300,46 aA	323,77 aA	40,99 aA	50,71 aA	3,33 aA	3,28 aA
<i>Enterobacter sp.</i> (B2010)	0,41 aA	0,40 aA	380,66 aB	484,54 aA	304,01 aB	376,18 aA	41,77 aB	55,51 aA	1,41 aB	5,65 aA
<i>Bacillus pumilus</i> (B1923)	0,42 aA	0,41 aA	339,73 aB	461,72 aA	261,76 bB	363,87 aA	46,04 aA	51,55 aA	2,23 aA	2,53 aA
<i>Bacillus subtilis</i> (B1935)	0,41 aA	0,41 aA	340,82 aA	403,69 aA	270,26 bA	309,92 aA	39,53 aA	50,98 aA	1,31 aA	3,90 aA
Médias	0,41 A	0,40 A	359,55 B	427,78 A	285,75 B	332,29 A	40,18 B	51,27 A	1,85 B	3,40A

Tratamentos	VR (cm ³)		CRT (cm)		CR1 (cm)		CR2 (cm)		CR3 (cm)	
	SF	CF	SF	CF	SF	CF	SF	CF	SF	CF
Controle (B0)	4,16 aA	3,81 aA	3452,75 aA	3220,80 aA	1673,61 aA	1844,80 aA	51,69 aA	68,34 bA	0,78 aA	2,21 aA
<i>Pantoea ananatis</i> (B1931)	2,59 bB	3,84 aA	2013,67 aB	3270,00 aA	1937,73 aA	2231,83 aA	73,15 aA	101,02 aA	2,61 aA	1,79 aA
<i>Pseudomonas sp.</i> (B2096)	3,97 aA	4,19 aA	2869,81 aA	3293,82 aA	1645,20 aA	2072,60 aA	63,56 aA	84,87 aA	2,16 aA	2,58 aA
<i>Enterobacter sp.</i> (B2010)	3,93 aA	4,78 aA	2934,96 aB	3906,97 aA	1411,70 aA	1878,70 aA	54,55 aA	70,76 bA	0,90 aB	3,53 aA
<i>Bacillus pumilus</i> (B1923)	3,55 aB	4,67 aA	2596,34 aB	3648,20 aA	1451,20 aA	1754,90 aA	69,25 aA	67,08 bA	1,73 aA	1,68 aA
<i>Bacillus subtilis</i> (B1935)	3,49 aA	4,09 aA	2657,39 aA	3181,12 aA	1277,20 aA	1521,90 aA	50,40 aA	65,97 bA	0,86 aA	2,38 aA
Médias	3,68 B	4,25 A	2804,7 B	3434,05 A	1535,68 B	1884,65 A	59,37 B	75,83 A	1,402 B	2,383 A

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). SF: sem FePO₄; CF: com FePO₄. Diâmetro (D), volume radicular (VR), área de superfície radicular total (AS), área de superfície de raízes com diâmetro entre 0 - 1,0 mm (AS1), área de superfície de raízes com diâmetro entre 1,0 - 2,0 mm (AS2), área de superfície de raízes com diâmetro maior que 2 mm (AS3), comprimento radicular total (CRT), comprimento radicular com diâmetro entre 0 - 1,0 (CR1), comprimento radicular com diâmetro entre 1 - 2,0 (CR2), comprimento radicular com diâmetro maior que 2,0 (CR3).

5.5 ANÁLISE QUÍMICA DOS ÓXIDOS MAIORES

Os resultados obtidos por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado estão exibidos na tabela 9. Na ausência de fonte de fósforo (FePO_4), óxido P_2O_5 foi detectado apenas nas estirpes *B. pumilus* (B1923) e *B. subtilis* (B1935). Contudo, na presença de fonte de fósforo (FePO_4), o óxido P_2O_5 foi detectado em todas as estirpes estudadas.

Os valores de P_2O_5 produzidos por todas as estirpes bacterianas (0,1 e 0,11) foram aproximadamente 769 % superior ao limite mínimo detectável pelo equipamento (0,013) (Tabela 9). De modo geral, o uso das bactérias solubilizadoras não alterou a presença dos óxidos analisados.

Tabela 9- Análise química dos óxidos maiores por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.

Identificação	Fertilizante	SiO ₂	TiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	MnO	MgO	CaO	Na ₂ O	K ₂ O	P ₂ O ₅	SO ₃	LOI	Soma (%)
Limite de Quantificação (%)		0,055	0,002	0,128	0,081	0,001	0,006	0,135	0,004	0,012	0,013	0,11		
Controle	(B0)	75,98	0,67	11,40	4,41	< LQ	0,10	0,24	< LQ	0,27	< LQ	< LQ	7,73	100,80
<i>Pantoea ananatis</i>	(B1931)	75,41	0,66	11,37	4,37	< LQ	0,10	0,24	< LQ	0,27	< LQ	< LQ	7,77	100,19
<i>Pseudomonas sp.</i>	(B2096)	73,12	0,73	12,40	4,62	< LQ	0,11	0,26	< LQ	0,29	< LQ	< LQ	8,61	100,24
<i>Enterobacter sp.</i>	(B2010)	73,00	0,72	12,18	4,60	< LQ	0,10	0,26	< LQ	0,28	< LQ	< LQ	8,61	99,84
<i>Bacillus pumilus</i>	(B1923)	75,46	0,67	11,34	4,43	< LQ	0,10	0,23	< LQ	0,27	0,10	< LQ	7,73	100,34
<i>Bacillus subtilis</i>	(B1935)	73,56	0,70	12,32	4,54	< LQ	0,11	0,26	< LQ	0,28	0,10	< LQ	8,62	100,49
Controle	(B0)	74,93	0,67	11,40	4,41	< LQ	0,10	0,24	< LQ	0,27	0,10	< LQ	8,09	100,21
<i>Pantoea ananatis</i>	(B1931)	75,31	0,68	11,58	4,45	< LQ	0,11	0,24	< LQ	0,27	0,10	< LQ	8,04	100,78
<i>Pseudomonas sp.</i>	(B2096)	74,17	0,74	11,95	4,61	< LQ	0,10	0,25	< LQ	0,27	0,10	< LQ	8,45	100,65
<i>Enterobacter sp.</i>	(B2010)	73,95	0,68	11,78	4,50	< LQ	< LQ	0,24	< LQ	0,28	0,10	< LQ	8,28	99,80
<i>Bacillus pumilus</i>	(B1923)	73,58	0,74	12,24	4,83	< LQ	0,10	0,25	< LQ	0,28	0,11	< LQ	8,55	100,69
<i>Bacillus subtilis</i>	(B1935)	74,37	0,68	11,51	4,47	< LQ	0,10	0,24	< LQ	0,28	0,10	< LQ	8,19	99,94

Fe = FePO₄

Limite de quantificação (<LQ), determinação da perda na ignição (LOI).

5.6 CONTEÚDO DE P NOS TECIDO DAS PLANTAS DE MILHO INOCULADO COM AS ESTIRPES SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO

O teor de P no tecido foliar da planta inoculada com *Pseudomonas* sp. (B2096), *Bacillus pumilus* (B1923), *Bacillus Subtilis* (B1935), *Enterobacter* sp. (B2010) e *Pantoea ananatis* (B1931) não foram significativos em presença de FePO₄. Na ausência de fósforo, todas as estirpes apresentaram menor conteúdo de P em relação ao controle (diferenças significativas) (Tabela 10).

O teor de P no tecido radicular da planta para todas estirpes sem e com fonte de FePO₄ não apresentaram diferença significativa. Para tecidos foliares, a *Pseudomonas* sp. (B2096) apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) na presença e ausência de fonte de P.

5.7 EFEITOS DAS ESTIRPES DE BACTÉRIAS NA DISPONIBILIDADE DE P NO SOLO

Em relação aos controles, as bactérias não aumentaram o P disponível do solo na ausência de fosfato de ferro. Em contrapartida, notou-se que a aplicação de FePO₄ acarretou em maior disponibilização de P ao usar as bactérias *Pantoea ananatis* (B1931), *Pseudomonas* sp. (B2096), *Bacillus subtilis* (B1935), comparável ao controle com P.

Considerando todos os tratamentos, em geral, ficou evidenciado maiores teores de P liberado na presença de fosfato de ferro (Figura 1). A *Enterobacter* sp. B2010 e a *Bacillus pumilus* B1923, solubilizaram o P do fosfato de ferro, e o extrator mostrou o remanescente de fósforo. Possivelmente o P disponível foi menor, e que parte desse P foi solubilizado pelas plantas. É importante observar que, em todas as estirpes, sem adição de P, a liberação de P não foi significativa em relação aos controles. Sugere-se que em todos os tratamentos, as bactérias solubilizaram P contido no solo o que acarretou em diferença significativa em relação ao controle (Figura 1 e Tabela 10).

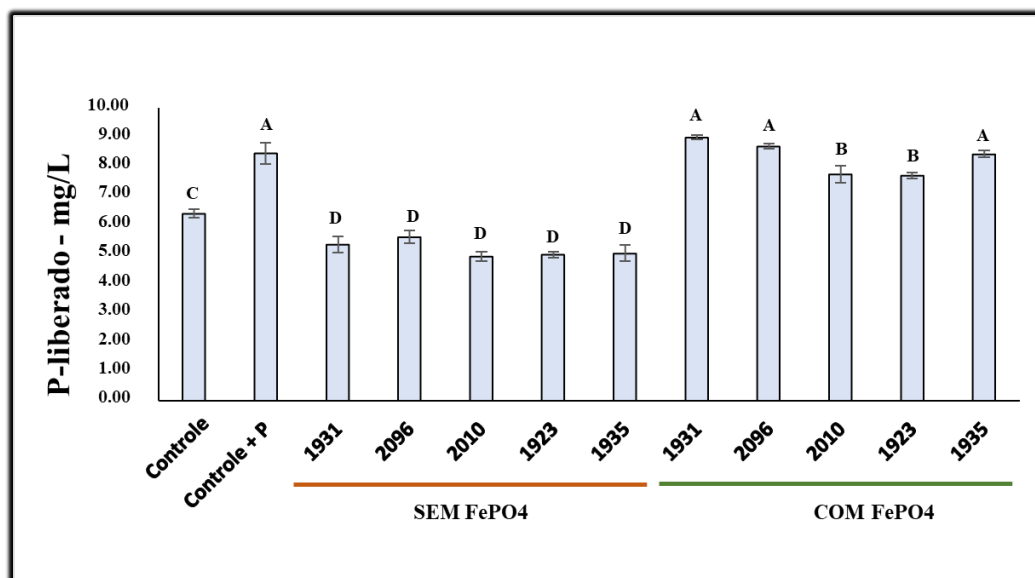


Figura 1- Estimativa da disponibilidade P, usando aplicação de bactérias solubilizadoras de fosfato e com aplicação de fonte de P na forma de fosfato de ferro.

5.8 FOSFATASE

Com a aplicação de fosfato de ferro, houve aumento na atividade da enzima fosfatase alcalina, sendo estatisticamente distintas dos controles com e sem P, para as estirpes de *Pseudomonas* sp. (B2096), *Enterobacter* (B2010), *B. pumilus* (B11923) e *B. subtilis* (B1935). A melhor atividade da fosfatase alcalina foi de 305,56 mg *p*-nitrofenol h⁻¹ kg⁻¹ para a estirpe B2010 de *Enterobacter*, com fonte de P e menor, com valor 174,05 mg *p*-nitrofenol h⁻¹ kg⁻¹ para a estirpe B1931 de *Pantoea ananatis* sem fonte de P (Tabela11).

A estirpe B2010 de *Enterobacter* apresentou diferença significativa na atividade fosfatase ácida e alcalina com valores de 496,90 e 305,56 mg *p*-nitrofenol h⁻¹ kg⁻¹ respectivamente, em presença de fosfato de ferro. Os resultados revelam uma correlação significativa, positiva e de alta magnitude ($r=0,77$) para ambas as enzimas fosfatases.

De modo similar, *Bacillus pumilus* (B1923) não apresentou diferença significativa para as fontes de fósforo, na qual a variação foi de 428,67 a 426,45 mg *p*-nitrofenol h⁻¹ kg⁻¹ respectivamente (Tabela 11). Os dados revelam uma correlação significativa, positiva e de alta magnitude ($r=0,66$ e $r=0,75$) para ambas as análises fosfatases em relação ao P liberado.

Tabela 10- Efeitos da inoculação de estirpes solubilizadoras de fosfato no teor de P nos tecidos vegetais de milho e o fósforo disponível no solo de mata natural, de origem vulcânica da região de Cambuquira- MG.

Tratamentos	Tecido Vegetal (mg/kg)						P - Liberado (mg/L)		
	Raiz			Folha			SF	CF	Média
	SF	CF	Média	SF	CF	Média			
Controle (B0)	606,67 ± 0,00 aA	626,67 ± 0,00 aA	616,67	110,67 ± 0,00 aA	92,67 ± 0,00 aB	101,67	6,39 ± 0,15 aB	8,44 ± 0,28 aA	7,42
<i>P. ananatis</i> (B1931)	573,33 ± 0,00 aA	493,33 ± 0,01 aA	533,33	81,00 ± 0,01 bA	91,33 ± 0,00 aA	86,17	5,33 ± 0,37 bB	8,99 ± 0,007 aA	7,16
<i>Pseudomonas sp.</i> (B2096)	506,67 ± 0,00 aA	500,00 ± 0,00 aA	503,34	86,33 ± 0,00 bB	105,67 ± 0,01 aA	96,00	5,59 ± 0,28 bB	8,68 ± 0,008 aA	7,14
<i>Enterobacter sp.</i> (B2010)	596,67 ± 0,00 aA	523,33 ± 0,00 aA	560,00	86,33 ± 0,00 bA	92,00 ± 0,01 aA	89,17	4,91 ± 0,21 bB	7,73 ± 0,28 bA	6,32
<i>B. pumilus</i> (B1923)	500,00 ± 0,00 aA	516,67 ± 0,00 aA	508,34	91,33 ± 0,00 bA	99,67 ± 0,01 aA	95,50	4,98 ± 0,15 bB	7,69 ± 0,11 bA	6,34
<i>B. subtilis</i> (B1935)	496,67 ± 0,00 aA	576,67 ± 0,00 aA	536,67	86,67 ± 0,00 bB	101,67 ± 0,00 aA	94,17	5,02 ± 0,09 bB	8,42 ± 0,11 aA	6,72
Médias	546,67 A	539,45 A		90,38 B	97,17 A		5,37 B	8,33 A	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott de média ($p < 0,05$). Médias seguidas da mesma letra, mesma letra maiúscula na linha não diferente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). SF: sem FePO₄; CF: com FePO₄. Resultados expressos a partir da média de 3 triplicatas ± erro padrão das médias.

Tabela 11- Efeitos da inoculação de estirpes solubilizadoras de fosfato na atividade enzimática da fosfatase.

Tratamentos	Fosfatase (mg <i>p</i> -nitrofenol h ⁻¹ kg ⁻¹ solo)					
	Ácida			Alcalina		
	SF	CF	Média	SF	CF	Média
Controle (B0)	430,24 ± 9,88 aA	446,16 ± 5,07 bA	438,20	184,38 ± 2,99 bB	225,96 ± 9,05 bA	205,17
<i>P. ananatis</i> (B1931)	359,59 ± 9,30 cB	453,62 ± 11,05 bA	406,61	174,05 ± 8,92 bB	226,95 ± 9,02 bA	200,50
<i>Pseudomonas sp.</i> (B2096)	391,36 ± 10,10 bB	481,48 ± 1,46 aA	436,42	179,40 ± 6,01 bB	266,26 ± 11,63 aA	222,83
<i>Enterobacter sp.</i> (B2010)	397,08 ± 2,64 bB	496,90 ± 2,53 aA	446,99	203,18 ± 3,51 bB	305,56 ± 11,27 aA	254,37
<i>B.pumilus</i> (B1923)	428,67 ± 4,46 aA	426,45 ± 8,06 bA	427,56	195,11 ± 8,31 bB	277,95 ± 2,46 aA	236,53
<i>B.subtilis</i> (B1935)	411,50 ± 3,41 aB	451,83 ± 2,61 bA	431,67	229,94 ± 3,15 aB	283,17 ± 9,75 aA	256,56
Média	403,07 B	459,40 A		194,34 B	264,30 A	

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott de média ($p < 0,05$). Médias seguidas da mesma letra, mesma letra maiúscula na linha não diferente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$). SF: sem FePO₄; CF: com FePO₄. Resultados expressos a partir da média de 3 triplicatas ± erro padrão das médias.

6 DISCUSSÃO

A busca por produtos biotecnológicos a base de microrganismos que possam aumentar o uso eficiente dos nutrientes, principalmente o fósforo, surge como alternativa para obtenção de uma agricultura moderna com sustentabilidade e segurança alimentar (Oliveira-Paiva *et al.* 2021). Na presente investigação, foi possível avaliar bactérias de diferentes gêneros, na promoção de crescimento de plantas de milho, quanto à solubilização de fosfato ligado a ferro e a investigação dos mecanismos pela produção de sideróforos e ácidos orgânicos, ponderando o acúmulo de fósforo nas plantas.

Segundo vários estudos relacionados à microbiologia dos solos, estimativas apontam que 50 % das bactérias tem o potencial em solubilizar o fosfato (Kafle *et al.* 2019; Sharma *et al.* 2013). Em nosso estudo, as estirpes de *Pantoea ananatis* e *Pseudomonas* sp., foram as mais eficientes para solubilização de fosfato e as três estirpes menos eficientes pertencem a gêneros não identificados.

Considerando-se que o fosfato de ferro é uma das formas de fosfato mais prevacente em solos tropicais e subtropicais, essas estirpes têm potencial para formulação de inoculantes visando melhorar a produtividade da cultura do milho. Contudo, vários estudos têm demonstrado que a disponibilidade de P no solo é feita principalmente por microrganismos que possuem alta afinidade por rochas fosfáticas na ordem Ca-P>Al-P>Fe-P. (Marra 2011; Ribeiro 2018, Chai *et al.* 2011; Barroso & Nahas 2008). Ou seja, o fosfato de ferro não é a fonte mais facilmente acessível pelos microrganismos. Isso deve ocorrer devido às formas distintas dos microrganismos atuarem nos fosfatos, e as fontes de FePO₄ são menos solubilizadoras que outras fontes. Segundo Marra (2011), duas cepas de leguminosas nodulante foram capazes de solubilizar o fosfato de ferro e o fosfato de cálcio. Neste caso, a capacidade das estirpes B1931, B1934 e B2096 em solubilizar P-Fe é bastante relevante, pois essas estirpes poderão ser exploradas futuramente para produção de inoculantes.

Xu *et al.* (2019) e Yahya *et al.* (2021) demonstraram que a espécie *P. ananatis* se destacou na solubilização do fosfato *in vitro*, usando meio NBRIP enriquecido com rocha fosfática. Neste trabalho, as estirpes *B. pumilus* e *B. subtilis*, embora com valores inferiores àqueles encontrados para *P. ananatis*, também se destacaram na liberação de P, o que corroboram com estudos de Ribeiro (2018) que encontraram maiores valores de solubilização de P para estirpes de *Bacillus* sp.

Examinando o ensaio quantitativo na solubilização de fosfato de ferro, na medida em que a cultura prosseguia, ocorreu concomitantemente a diminuição do pH inicial (de 7,5 até 2,84) e elevação dos valores de P liberado no meio de cultura (Tabela 3). Com relação à redução do pH do meio, ela ocorreu muito provavelmente porque as bactérias solubilizadoras de P, secretam, além de enzimas fosfatases, por exemplo, ácidos orgânicos que degradam fontes insolúveis de P (Chouyia *et al.* 2020; Penn & Camberato, 2019). Xu *et al.* (2019) observaram uma queda significativa no pH do meio com rocha fosfática após oito dias de inoculação. Em estudos de Sousa (2010) relatou que a acidificação através da secreção de ácidos orgânicos no meio constitui a etapa inicial do processo de solubilização dos fosfatos. Esse efeito do pH na liberação P fixado, pode ser explicado pelas variações químicas do pH do solo, como as trocas aniônicas, precipitações de fosfatos, trocas de ligantes para óxidos e hidróxidos e os mecanismos de solubilização do P no solo (Penn & Camberato, 2019).

Suleman *et al.* (2018) relatam que a produção de ácidos orgânicos pelos MSF está diretamente relacionada aos mecanismos de solubilização de fosfato inorgânico. Entre os ácidos orgânicos detectados nesse estudo por HPLC, encontram-se, o ácido acético, 2-cetoglucônico, glucônico e fórmico, destacando o potencial da estirpe B1924 de *Klebsiella* sp. na produção do ácido acético. Esses resultados corroboram com Yahya *et al.* 2021 que obtiveram resultados de ácido acético variando de (20 – 182 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em meio líquido NBRIP por 7 dias. Em trabalhos De Abreu *et al.* (2017) a produção de ácidos glucônico foi detectado em média 98,6% dos isolados avaliados, e 2,74% para ácido acético. Em nosso estudo, os valores encontrados foram bastante discrepantes (93,9% de ácido acético e 13,33% para ácido glucônico).

Com relação aos sideróforos, a sua produção em culturas líquidas por bactérias promotoras de crescimento de planta, constitui uma alternativa viável para controlar os parâmetros de fermentação que, por sua vez, influenciam a biossíntese desses compostos (De Jesus Santos *et al.* 2014). Entre as vantagens conferidas aos produtores de sideróforos estão as competências de liberar metais, em especial o Fe^{3+} , além de seu emprego como agentes de biocontrole de patógenos (Khatoon *et al.* 2020). Souza *et al.* (2015) relatam que os gêneros de bactérias *Burkholderia*, *Enterobacter Grimontella* apresentaram alta produção de sideróforos. Em nosso estudo, destacaram-se *Pantoea ananatis*, *Pseudomonas* sp. e *Enterobacter* sp. como eficientes na produção de sideróforos. Sinha & Parli (2020) observaram resultados positivos para produção de sideróforos em estirpes de *Enterobacter* em diferentes temperaturas. Microrganismos produtores de sideróforos apresentam vantagens

adaptativas a diferentes tipos de estresses bióticos e abióticos (Shameer & Prasad 2018).

Outras formas de P encontradas no solo também são fontes importantes desse nutriente e podem também ser disponibilizado para as plantas via atividade microbiana. Na maioria dos solos, a forma do fósforo orgânico predominante é o fitato (10-50% do P total) e mineralizadas por fitases (Souza 2015; Ribeiro 2018; Marra 2011). Neste estudo, as estirpes de *Enterobacter* (B2010) e de *Pseudomonas* (B2096), mostraram melhor atividade de fosfatase ácida em meios de cultivo com adição da fonte de P, enquanto que as estirpes B2010 de *Enterobacter* sp. e B2096 de *Pseudomonas* sp. B1935 de *Bacillus subtilis* e B1923 de *B. pumilus* foram melhores na atividade da fosfatase alcalina (Tian *et al.* 2021; Khatoun *et al.* 2020; Barroso & Nahas 2008).

A atividade enzimática da fosfatase ácida e alcalina estar envolvidas nas mudanças de ciclagem no solo, executando ações importantes na transformação e mineralização da matéria orgânica (Du *et al.* 2021; Janvier *et al.* 2007 e Gao *et al.* 2020). Foi encontrado neste estudo um coeficiente de correlação positiva entre a atividade da fosfatase ácida e alcalina $r=0,77$ e entre a fosfatase ácida e o teor de fósforo disponível no solo $r=0,75$ com magnitude forte e moderada, respectivamente. Lemanowicz *et al.* (2020) relatou correlação positiva de $r=0,49$ para atividade fosfatase alcalina e o teor de P disponível do solo, isso sugere que geralmente a atividade biológica do solo é influenciada pelo teor da matéria orgânica, isso aumenta a reserva de nutrientes no solo.

A quantificação de P disponível, mostrou diferença significativa quando a fonte de fosfato de ferro foi adicionada aos tratamentos com as estirpes B2010 de *Enterobacter* sp. e B1923 de *Bacillus pumilus*. No entanto, a adição de fosfato de ferro e maior disponibilidade de P na solução não representou maior conteúdo de P foliar e radicular.

Segundo Souza *et al.* (2020) em ambientes tropicais ainda existe falta de entendimento da morfologia radicular com os promotores de crescimento, porque os solos geralmente apresentam fatores que podem beneficiar ou impedir os microrganismos solubilizadores de fosfatos, interferindo na capacidade dos microrganismos em aumentar o crescimento das plantas (Etesami & Maheshwari-2018). Diante dessa confirmação é possível notar o comportamento das bactérias ao adicionar fosfato de ferro, pois no geral houve uma diferença significativa com a adição de P, quando comparamos os tratamentos sem fonte de P. Os valores encontrados

neste trabalho para AP, AFB, PSPA, AF, PSR em ambos os experimentos com inoculação não foram significativos quando comparados aos controles, o que sugere se tratar de uma fonte de baixa solubilidade da fonte de fosfato de ferro.

A estirpe B1935 promoveu o aumento da área de superfície radicular entre 0 e 1mm. Esse desenvolvimento de maior área, remete à eficiência das plantas em absorver nutrientes do solo (De Souza *et al.* 2021). No entanto, poucos parâmetros da morfologia radicular foram maximizados pela presença das estirpes estudadas. Sendo assim, há poucas evidências dos efeitos das bactérias no desenvolvimento das raízes, o que talvez reflita no melhor aproveitamento do uso do P disponível no solo. O desenvolvimento radicular é responsável pela melhoria da conexão entre as raízes das plantas com o solo e proporcionar maior eficiência na absorção de água e nutrientes. É possível que mesmo a solubilização e mineralização do P não foi suficiente para melhorar o status geral da planta de milho. Talvez, as propriedades de promoção de crescimento radicular sejam necessárias para melhor aproveitamento do P disponível no solo, unindo-se aos mecanismos de solubilização e sideróforos avaliados neste trabalho.

É interessante notar que o comportamento das estirpes onde não houve adição de P foi significativamente diferente em relação ao controle. Isso revela que na solução do solo, continham uma porcentagem de P disponível, na qual as estirpes tiveram acesso. Isso demonstra uma assimilação ou fixação desse P que estava disponível. Considerando a estirpe B1935 *Bacillus subtilis*, ao analisar sua eficiência agrônômica, os parâmetros CRT, AS, AS1 e AS3 afetaram positivamente o conteúdo de nutrientes da planta, em especial o P.

7 CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que as bactérias B1931 e B1934 *Pantoea ananatis* e B2096 *Pseudomonas* sp. foram eficientes nos testes de solubilização de fosfato ligado a ferro, realizados *in vitro*. As estirpes B2109, B1934 e B2096 foram mais eficientes na quantificação da produção de sideróforos. Na produção de ácidos orgânicos, todas as estirpes testadas produziram o ácido acético, com variação de menor e maior produção (0,26 e 18,74 mmol.L⁻¹) para estirpes B1935 de *Bacillus subtilis* e B1924 de *Klebsiella* sp. respectivamente. Contudo, estudos complementares tornam-se necessário para determinar com segurança, a capacidade dessas bactérias para a promoção de crescimento de plantas por atuarem sobre o P-Fe.

REFERÊNCIAS

- ABREU, C. S. (2014). Seleção e caracterização de bactérias endofíticas isoladas de plantas de milho com potencial para a biossolubilização de rochas fosfáticas. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias) – Universidade Federal de São João del-Rei, Sete Lagoas, MG. p.47.
- ALORI, E. T., GLICK, B. R., & BABALOLA, O. O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in microbiology*, 8, 971.
- ARORA, N. K., & VERMA, M. (2017). Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria. *3 Biotech*, 7(6), 1-9.
- BARGAZ, A., LYAMLOULI, K., CHTOUKI, M., ZEROUAL, Y., AND DHIBA, D. (2018). Soil microbial resources for improving fertilizers efficiency in an integrated plant nutrient management system. *Front. Microbiol.* 9:1606. doi: 10.3389/fmicb.2018.0160.
- BARROSO, C. B. (2006). Produção de pellets livres e imobilizados e mecanismo de solubilização de fosfatos inorgânicos por *Aspergillus niger*. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, p.96.
- BARROSO, C. B., & NAHAS, E. (2005). The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. *Applied Soil Ecology*, 29(1), 73-83.
- BARROSO, C. B., & NAHAS, E. (2008). Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(4), 529-535.
- BATISTA, F. D. C., FERNANDES, T. A., ABREU, C. S., OLIVEIRA, M. C., RIBEIRO, V. P., GOMES, E. A., ... & OLIVEIRA, C. (2018). Potencial de microrganismos rizosféricos e endofíticos de milho em solubilizar o fosfato de ferro e produzir sideróforos. *Embrapa Milho e Sorgo-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)*.

- BEHERA, B. C., SINGDEVSACHAN, S. K., MISHRA, R. R., DUTTA, S. K., & THATOI, H. N. (2014). Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—a review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2), 97-110.
- BENITE, A. M. C., MACHADO, S. D. P., & MACHADO, B. D. C. (2002). Sideróforos: uma resposta dos microrganismos. *Química Nova*, 25, 1155-1164.
- BINI, D.; LOPEZ, M. V. Transformações microbianas do fósforo. In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. (ed.). *Microbiologia do solo*. Piracicaba: ESALQ, 2016. p. 149-166.
- BODHANKAR, S., GROVER, M., HEMANTH, S., REDDY, G., RASUL, S., YADAV, S. K., ... & SRINIVASARAO, C. (2017). Maize seed endophytic bacteria: dominance of antagonistic, lytic enzyme-producing *Bacillus* spp. *3 Biotech*, 7(4), 1-13.
- BRITO, L. F., LÓPEZ, M. G., STRAUBE, L., PASSAGLIA, L. M., & WENDISCH, V. F. (2020). Inorganic phosphate solubilization by rhizosphere bacterium *Paenibacillus sonchi*: gene expression and physiological functions. *Frontiers in microbiology*, 11, 3122.
- CERECETTO, V., SMALLA, K., NESME, J., GARAYCOCHEA, S., FRESIA, P., SØRENSEN, S. J., ... & LEONI, C. (2021). Reduced tillage, cover crops and organic amendments affect soil microbiota and improve soil health in Uruguayan vegetable farming systems. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(3), fiab023.
- CHAI, B., WU, Y., LIU, P., LIU, B., & GAO, M. (2011). Isolation and phosphate-solubilizing ability of a fungus, *Penicillium* sp. from soil of an alum mine. *Journal of Basic Microbiology*, 51(1), 5-14.
- CHOUYIA, F. E., ROMANO, I., FECHTALI, T., FAGNANO, M., FIORENTINO, N., VISCONTI, D., ... & PEPE, O. (2020). P-Solubilizing *Streptomyces roseocinereus* MS1B15 with multiple plant growth-promoting traits enhance barley development and regulate rhizosphere microbial population. *Frontiers in Plant Science*, 1137.

- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (2021). Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Brasília, DF, v. 8, safra 2020/21, n. 12. Décimo segundo levantamento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>.
- DE ABREU, C. S., FIGUEIREDO, J. E. F., OLIVEIRA-PAIVA, C. A., DOS SANTOS, V. L., GOMES, E. A., RIBEIRO, V. P., ... & MARRIEL, I. E. (2017). Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. *Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- DE JESUS SANTOS, A. F., MARTINS, C. Y. S., SANTOS, P. O., CORRÊA, É. B., BARBOSA, H. R., SANDOVAL, A. P. S., ... & SOARES, A. C. F. (2014). Diazotrophic bacteria associated with sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm): potential for plant growth promotion. *Plant and soil*, 385(1), 37-48.
- DE SOUSA, S. M., DE OLIVEIRA, C. A., ANDRADE, D. L., DE CARVALHO, C. G., RIBEIRO, V. P., PASTINA, M. M., ... & GOMES, E. A. (2021). Tropical *Bacillus* strains inoculation enhances maize root surface area, dry weight, nutrient uptake and grain yield. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40(2), 867-877.
- DE SOUZA, A. E., DOS REIS, J. G. M., RAYMUNDO, J. C., & PINTO, R. S. (2018). Estudo da produção do milho no Brasil. *South American Development Society Journal*, 4(11), 182.
- DIVJOT, K. O. U. R., RANA, K. L., TANVIR, K. A. U. R., YADAV, N., YADAV, A. N., KUMAR, M., ... & SAXENA, A. K. (2021). Biodiversity, current developments and potential biotechnological applications of phosphorus-solubilizing and-mobilizing microbes: a review. *Pedosphere*, 31(1), 43-75.
- DOS SANTOS, T. T., & VARAVALLO, M. A. (2011). Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 32(2), 199-212.
- DU, J., HOU, F., & ZHOU, Q. (2021). Response of soil enzyme activity and soil bacterial community to PCB dissipation across different soils. *Chemosphere*, 283, 131229.

- EMBRAPA. (2006). Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). Sistema brasileiro de classificação de solos.
- ETESAMI, H., & JEONG, B. R. (2021). Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi, phosphate-solubilizing bacteria, and silicon to P uptake by plant: a review. *Frontiers in Plant Science*, 12, 1355.
- ETESAMI, H., & MAHESHWARI, D. K. (2018). Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and environmental safety*, 156, 225-246.
- FABIAŃSKA, I., GERLACH, N., ALMARIO, J., & BUCHER, M. (2019). Plant-mediated effects of soil phosphorus on the root-associated fungal microbiota in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 221(4), 2123-2137.
- FEDRIZZI, S. M. G. (2006). Produção de metabolitos antimicrobianos e sideróforos de isolados provenientes de Terra Preta Antropogênica da Amazônia Ocidental (Dissertação de Doutorado em Ciências. Universidade de São Paulo).
- FERNANDEZ-GNECCO, G., SMALLA, K., MACCARIO, L., SØRENSEN, S. J., BARBIERI, P., CONSOLO, V. F., ... & BABIN, D. (2021). Microbial community analysis of soils under different soybean cropping regimes in the Argentinean south-eastern Humid Pampas. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(3), fiab007.
- FERREIRA, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e agrotecnologia*, 35, 1039-1042.
- GAO, M., DONG, Y., ZHANG, Z., & SONG, Z. (2020). Effect of dibutyl phthalate on microbial function diversity and enzyme activity in wheat rhizosphere and non-rhizosphere soils. *Environmental Pollution*, 265, 114800.
- GARCIA-LOPEZ, A. M., & DELGADO, A. (2016). Effect of *Bacillus subtilis* on phosphorus uptake by cucumber as affected by iron oxides and the solubility of the phosphorus source. *Agricultural and Food Science*, 25(3), 216-224.

- GARCÍA-LÓPEZ, A. M., AVILÉS, M., & DELGADO, A. (2016). Effect of various microorganisms on phosphorus uptake from insoluble Ca-phosphates by cucumber plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 179(4), 454-465.
- GILBERT, N. (2009). The disappearing nutrient (vol 461, pg 716, 2009). *Nature*, 461(7267), 1041-1041.
- GLOBALFERT (2021) Boletins Informativos. 2º Reporte anual do mercado de fertilizantes Disponível em: <https://globalfert.com.br/outlook-globalfert/>
- GOLDSTEIN, A., LESTER, T., & BROWN, J. (2003). Research on the metabolic engineering of the direct oxidation pathway for extraction of phosphate from ore has generated preliminary evidence for PQQ biosynthesis in *Escherichia coli* as well as a possible role for the highly conserved region of quinoprotein dehydrogenases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1647(1-2), 266-271.
- GOMES, E. A., SILVA, U. D. C., MARRIEL, I. E., OLIVEIRA-PAIVA, C. A., & LANA, U. D. P. (2014). Rock phosphate solubilizing microorganisms isolated from maize rhizosphere soil. *Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- GOMES, E. A., SILVA, U. D. C., PAIVA, C., LANA, U. D. P., MARRIEL, I. E., & DOS SANTOS, V. L. (2016). Microrganismos promotores do crescimento de plantas. *Embrapa Milho e Sorgo-Documentos (INFOTECA-E)*.
- GOMES, E., OLIVEIRA-PAIVA, C. A., DIAS, F., DOS SANTOS, F. C., & MARRIEL, I. (2011). Efeito da inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato sobre o crescimento de milho (*Pennisetum glaucum*) fertilizado com fosfato de rochas. *Embrapa Milho e Sorgo-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)*.
- HAMEEDA, B., HARINI, G., RUPELA, O. P., WANI, S. P., & REDDY, G. (2008). Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiological research*, 163(2), 234-242.

- HOFMANN, M., HEINE, T., MALIK, L., HOFMANN, S., JOFFROY, K., SENEGES, C. H. R., ... & TISCHLER, D. (2021). Screening for microbial metal-chelating siderophores for the removal of metal ions from solutions. *Microorganisms*, 9(1), 111.
- JANVIER, C., VILLENEUVE, F., ALABOUVETTE, C., EDEL-HERMANN, V., MATEILLE, T., & STEINBERG, C. (2007). Soil health through soil disease suppression: which strategy from descriptors to indicators?. *Soil biology and Biochemistry*, 39(1), 1-23.
- KAFLE, A., COPE, K. R., RATHS, R., KRISHNA YAKHA, J., SUBRAMANIAN, S., BÜCKING, H., & GARCIA, K. (2019). Harnessing soil microbes to improve plant phosphate efficiency in cropping systems. *Agronomy*, 9(3), 127.
- KAUR, G., & REDDY, M. S. (2014). Influence of P-solubilizing bacteria on crop yield and soil fertility at multilocal sites. *European Journal of Soil Biology*, 61, 35-40.
- KHAN, M. S., ZAIDI, A., AHMED, M., OVES, M., & WANI, P. A. (2010). Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi—current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 56(1), 73-98.
- KUMAWAT, K. C., SHARMA, P., NAGPAL, S., GUPTA, R. K., SIRARI, A., NAIR, R. M., ... & SINGH, S. (2021). Dual microbial inoculation, a game changer?—Bacterial biostimulants with multifunctional growth promoting traits to mitigate salinity stress in Spring Mungbean. *Frontiers in microbiology*, 11, 3491.
- LEMANOWICZ, J., HADDAD, S. A., BARTKOWIAK, A., LAMPARSKI, R., & WOJEWÓDZKI, P. (2020). The role of an urban park's tree stand in shaping the enzymatic activity, glomalin content and physicochemical properties of soil. *Science of The Total Environment*, 741, 140446.
- LI, J., QIAN, G., ZHOU, K. Z., LU, J., & LIU, B. (2021). Belt and Road Initiative, globalization and institutional changes: implications for firms in Asia. *Asia Pacific Journal of Management*, 1-14.

- LIANG, J. L., LIU, J., JIA, P., YANG, T. T., ZENG, Q. W., ZHANG, S. C., ... & LI, J. T. (2020). Novel phosphate-solubilizing bacteria enhance soil phosphorus cycling following ecological restoration of land degraded by mining. *The ISME journal*, 14(6), 1600-1613.
- MARDAD, I., SERRANO, A., & SOUKRI, A. (2013). Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a Moroccan mineral phosphate deposit. *African Journal of Microbiology Research*, 7(8), 626-635.
- MARRA, L. M., OLIVEIRA, S. M. D., SOARES, C. R. F. S., & MOREIRA, F. M. D. S. (2011). Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. *Scientia Agricola*, 68(5), 603-609.
- MARSCHNER, P., CROWLEY, D., & RENGEL, Z. (2011). Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis—model and research methods. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(5), 883-894.
- MEHNERT, M., RETAMAL-MORALES, G., SCHWABE, R., VATER, S., HEINE, T., LEVICÁN, G. J., ... & TISCHLER, D. (2017). Revisiting the chrome azurol S assay for various metal ions. In *Solid State Phenomena* (Vol. 262, pp. 509-512). Trans Tech Publications Ltd.
- MENDES, I. C., SOUSA, D. M. G., DANTAS, O. D., LOPES, A. A. C., JUNIOR, F. B. R., OLIVEIRA, M. I., & CHAER, G. M. (2021). Soil quality and grain yield: A win–win combination in clayey tropical oxisols. *Geoderma*, 388, 114880.
- MITTER, E. K., TOSI, M., OBREGÓN, D., DUNFIELD, K. E., & GERMIDA, J. J. (2021). Rethinking crop nutrition in times of modern microbiology: innovative biofertilizer technologies. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 29.
- MURPHY, J. A. M. E. S., & RILEY, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta*, 27, 31-36.

- NAHAS, E., CENTURION, J. F., & ASSIS, L. C. (1994). Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 18(1), 43-48.
- NEILANDS, J. B. (1984). Siderophores of bacteria and fungi. *Microbiological sciences*, 1(1), 9-14.
- NOVAIS, R. D., & SMYTH, T. J. (1999). Fósforo em solo e planta em condições tropicais (No. 631.422 N934). Universidade Federal de Vicosa, Vicosa, MG (Brasil). Dept. de Solos.
- OLIVEIRA, C. A., ALVES, V. M. C., MARRIEL, I. E., GOMES, E. A., SCOTTI, M. R., CARNEIRO, N. P., ... & SÁ, N. M. H. (2009). Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(9), 1782-1787.
- OLIVEIRA, T. B. D. (2016). Leveduras produtoras de AIA e solubilizadoras de P visando a promoção de crescimento de tomateiro. 65 p. Tese (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados), Universidade Federal de São Carlos, Araras.
- OLIVEIRA-PAIVA, C. A., COTA, L., MARRIEL, I., ALVES, V., GOMES, E., de SOUSA, S. M., ... & LANA, U. D. P. (2021). Validação da recomendação para o uso do inoculante BiomaPhos®(Bacillus subtilis CNPMS B2084 e Bacillus megaterium CNPMS B119) na cultura de soja. *Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)*.
- OLSEN, S. R. (1953). Inorganic phosphorus in alkaline and calcareous soils. *Agronomy*, 4, 89-122.
- PAES, M. C. D. (2006). Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. *Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)*.
- PENN, C. J., & CAMBERATO, J. J. (2019). A critical review on soil chemical processes that control how soil pH affects phosphorus availability to plants. *Agriculture*, 9(6), 120.

- PEREIRA, K. A., RIBEIRO, R. V., RODRIGUES DE OLIVEIRADAS, A., & AMARAL, A. D. G. (2019). Parámetros en la utilización de silaje de grano húmedo de maíz en la bovinocultura de corte. *Revista colombiana de ciencia animal recia*, 11(1), 102-113.
- RIBEIRO, V. P. (2018). Inoculação simples e mista com *Azospirillum brasilense* e *Bacillus* sp. em plantas de milho: desenvolvimento de tecnologias para sistemas agrícolas sustentáveis. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia) – Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei - MG. p. 73.
- RIBEIRO, V. P., GOMES, E. A., DE SOUSA, S. M., DE PAULA LANA, U. G., COELHO, A. M., MARRIEL, I. E., & DE OLIVEIRA-PAIVA, C. A. (2022). Co-inoculation with tropical strains of *Azospirillum* and *Bacillus* is more efficient than single inoculation for improving plant growth and nutrient uptake in maize. *Archives of Microbiology*, 204(2), 1-13.
- RIBEIRO, V., GOMES, E., MARRIEL, I., de ABREU, C. S., LANA, U. D. P., & OLIVEIRA-PAIVA, C. A. (2015). Potencial biotecnológico de bactérias endofíticas de milho. *Embrapa Milho e Sorgo-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)*.
- RICHARDSON, A. E. (2001). Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Functional Plant Biology*, 28(9), 897-906.
- RICHARDSON, A. E., & SIMPSON, R. J. (2011). Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant physiology*, 156(3), 989-996.
- RIZVI, A., ZAIDI, A., KHAN, M. S., SAIF, S., AHMED, B., & SHAHID, M. (2017). Growth improvement and management of vegetable diseases by plant growth-promoting rhizobacteria. In *Microbial strategies for vegetable production* (pp. 99-123). Springer, Cham.

- RODRIGUES, R. B., OZORIO, L. D. M., PINTO, C. D. L. B., & BRANDAO, L. E. T. (2015). Product switch option in the fertilizer industry. *Revista de Administração (São Paulo)*, 50(2), 129-140.
- RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, M. Á., TORRES BÉJAR, M., BLANCO, L., BEJAR LUQUE, M. V., & SAMPEDRO QUESADA, M. I. (2020). Plant growth-promoting activity and quorum quenching mediated biocontrol of bacterial phytopathogens by *Pseudomonas segetis* strain P6.
- RODRÍGUEZ, H., & FRAGA, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17(4-5), 319-339.
- RODRÍGUEZ, M., TORRES, M., BLANCO, L., BÉJAR, V., SAMPEDRO, I., & LLAMAS, I. (2020). Plant growth-promoting activity and quorum quenching-mediated biocontrol of bacterial phytopathogens by *Pseudomonas segetis* strain P6. *Scientific reports*, 10(1), 1-12.
- RONQUIM, CARLOS CESAR (2020) *Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais / Carlos Cesar Ronquim. - 2.ed. - Campinas: Embrapa Territorial, 34 p.: il.*
- SANTOS, C. F., OLIVEIRA, R. S., & DO CARMO PINTO, S. I. (2021). Uso de bioativador associado à dosagens de fertilizante fosfatado na cultura do milho. *Nativa*, 9(1), 16-22.
- SANTOS, M. S., NOGUEIRA, M. A., & HUNGRIA, M. (2021). Outstanding impact of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 on the Brazilian agriculture: Lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 45.
- SANTOS, S., NETO, I. F., MACHADO, M. D., SOARES, H. M., & SOARES, E. V. (2014). Siderophore production by *Bacillus megaterium*: effect of growth phase and cultural conditions. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(1), 549-560.

- SANTOS, S.I.S.M., (2012) Produção de Sideróforos pela bactéria *Bacillus Megaterium*. 71p. Dissertação (mestrado) – ISEP – Instituto Superior de Engenharia do Porto.
- SCHWYN, B., & NEILANDS, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160(1), 47-56.
- SEPEHRI, M., & KHATABI, B. (2021). Combination of Siderophore-Producing Bacteria and *Piriformospora indica* Provides an Efficient Approach to Improve Cadmium Tolerance in Alfalfa. *Microbial Ecology*, 81(3), 717-730.
- SHAMEER, S., & PRASAD, T. N. V. K. V. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation*, 84(3), 603-615.
- SHARMA, S. B., SAYYED, R. Z., TRIVEDI, M. H., & GOBI, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(1), 1-14.
- SHRIVASTAVA, M., SRIVASTAVA, P. C., & D'SOUZA, S. F. (2018). Phosphate-solubilizing microbes: diversity and phosphates solubilization mechanism. In *Role of rhizospheric microbes in soil* (pp. 137-165). Springer, Singapore.
- SILVA, U. C., CUADROS-ORELLANA, S., SILVA, D. R., FREITAS-JÚNIOR, L. F., FERNANDES, A. C., LEITE, L. R., ... & DOS SANTOS, V. L. (2021). Genomic and phenotypic insights into the potential of rock phosphate solubilizing bacteria to promote millet growth in vivo. *Frontiers in microbiology*, 3238.
- SIMIONATO, A. V. C., SILVA-STENICO, M. E., TSAI, S. M., & CARRILHO, E. (2010). Evidences of siderophores synthesis by Grapevine *Xylella fastidiosa*, causal agent of pierce's disease, through instrumental approaches. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21, 635-641.
- SINHA, A. K., PARLI VENKATESWARAN, B., TRIPATHY, S. C., SARKAR, A., & PRABHAKARAN, S. (2019). Effects of growth conditions on siderophore producing

bacteria and siderophore production from Indian Ocean sector of Southern Ocean. *Journal of basic microbiology*, 59(4), 412-424.

SOUTO, L. A. (2020). *Microrganismos solubilizadores de fosfato: Usos e potencialidades na agricultura. (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, p.24.*

SOUZA, D. M. G. de; LOBATO, E.; REIN, T. A. (2004). Adubação com fósforo. In: SOUZA, D. M. G.; LOBATO, E. (Ed.). *Cerrado: correção do solo e adubação. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 147-168.*

SOUZA, R. D., AMBROSINI, A., & PASSAGLIA, L. M. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and molecular biology*, 38, 401-419.

SULEMAN, M., YASMIN, S., RASUL, M., YAHYA, M., ATTA, B. M., & MIRZA, M. S. (2018). Phosphate solubilizing bacteria with glucose dehydrogenase gene for phosphorus uptake and beneficial effects on wheat. *PloS one*, 13(9), e0204408.

TABATABAI, M. A. (1994). *Methods of Soil Analysis, Part 2-Microbiological and Biochemical Properties. Soil enzymes, 775-833.*

TEAM, R. C. (2018). *R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2012.*

TIAN, J., GE, F., ZHANG, D., DENG, S., & LIU, X. (2021). Roles of Phosphate Solubilizing Microorganisms from Managing Soil Phosphorus Deficiency to Mediating Biogeochemical P Cycle. *Biology*, 10(2), 158.

VALLARINO, J. G., & OSORIO, S. (2019). Organic acids. In *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables (pp. 207-224). Woodhead Publishing.*

VAN, R., & VAN RAIJ, B. (1978). Seleção de métodos de laboratório para avaliar a disponibilidade de fósforo em solos.

- VANCE, C. P., UHDE-STONE, C., & ALLAN, D. L. (2003). Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New phytologist*, 157(3), 423-447.
- VARMA, P. K., UPPALA, S., PAVULURI, K., CHANDRA, K. J., CHAPALA, M. M., & KUMAR, K. V. K. (2017). Endophytes: role and functions in crop health. In *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives* (pp. 291-310). Springer, Singapore.
- VASSILEV, N., MENDES, G., COSTA, M., & VASSILEVA, M. (2014). Biotechnological tools for enhancing microbial solubilization of insoluble inorganic phosphates. *Geomicrobiology Journal*, 31(9), 751-763.
- VEGRO, C. L. R. (2018). Mercado de fertilizantes: aumento das importações preocupa. *Análises e Indicadores do Agronegócio*, São Paulo, 13(4), 1-5.
- VELLOSO, C. C. V. (2019). Caracterização de cepas de bacillus e avaliação do seu potencial de promoção de crescimento em genótipos de milho. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia) – Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei - MG. p. 127.
- VIANA, F., LIMA, J., FEITOZA, E. D. A., & MEDEIROS, R. (2013). Produção de sideróforos por leveduras antagônicas. Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E).
- VIEIRA VELLOSO, C. C., DE OLIVEIRA, C. A., GOMES, E. A., LANA, U. G. D. P., DE CARVALHO, C. G., GUIMARÃES, L. J. M., ... & DE SOUSA, S. M. (2020). Genome-guided insights of tropical *Bacillus* strains efficient in maize growth promotion. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(9), fiae157.
- VIEIRA, N. D. (2021). Resposta da soja a fontes e doses de fósforo em solos com diferentes teores de argila. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia / Londrina, 90f.

- WADT, P. G. S. (2003). Práticas de conservação do solo e recuperação de áreas degradadas. Embrapa Acre-Documentos (INFOTECA-E).
- WANG, S., WALKER, R., SCHICKLBERGER, M., NICO, P. S., FOX, P. M., KARAOZ, U., ... & BRODIE, E. L. (2021). Microbial Phosphorus Mobilization Strategies Across a Natural Nutrient Limitation Gradient and Evidence for Linkage With Iron Solubilization Traits. *Frontiers in microbiology*, 12.
- WHITELAW, M. A. (1999). Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in agronomy*, 69, 99-151.
- WIEGAND, M. C., GONZÁLEZ, P., & DE ARAUJO, J. C. (2016). Vulnerability towards eutrophication of two tropical lakes in both humid (Cuba) and semiarid (Brazil) climates. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, 21(2), 415-424.
- XIA, Q., WANG, J., & WAN, J. (2020). Role of siderophore-producing and arsenic-resistant bacteria in arsenic-contaminated environment. *Sheng wu gong cheng xue bao= Chinese journal of biotechnology*, 36(3), 450-454.
- XU, J. C., HUANG, L. M., CHEN, C., WANG, J., & LONG, X. X. (2019). Effective lead immobilization by phosphate rock solubilization mediated by phosphate rock amendment and phosphate solubilizing bacteria. *Chemosphere*, 237, 124540.
- YAHYA, M., UL ISLAM, E., RASUL, M., FAROOQ, I., MAHREEN, N., TAWAB, A., ... & YASMIN, S. (2021). Differential Root Exudation and Architecture for Improved Growth of Wheat Mediated by Phosphate Solubilizing Bacteria. *Frontiers in microbiology*, 12.
- YOUNG, L. S., HAMEED, A., PENG, S. Y., SHAN, Y. H., & WU, S. P. (2013). Endophytic establishment of the soil isolate *Burkholderia* sp. CC-A174 enhances growth and P-utilization rate in maize (*Zea mays* L.). *Applied Soil Ecology*, 66, 40-47.