

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CAMPUS DE JABOTICABAL

ESTÍMULO DA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO RESULTANTE
DA CO-INOCULAÇÃO DE *Aspergillus niger* E *Burkholderia*
cepacia

Rosângela Rodrigues Braz

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Outubro - 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

ESTÍMULO DA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO RESULTANTE
DA CO-INOCULAÇÃO DE *Aspergillus niger* E *Burkholderia*
cepacia

Rosângela Rodrigues Braz

Orientador: Prof. Dr. Ely Nahas

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Ciência do Solo).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Outubro - 2011

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Rosângela Rodrigues Braz – nascida em 04 de julho de 1981, em Aquidauana, MS, é Bióloga formada pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em 2003. Em 2009, iniciou suas pesquisas no mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Ciência do Solo), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – UNESP, Jaboticabal, SP.

A Deus muito obrigada,
Por me ensinar através de pessoas e acontecimentos o
essencial da vida.
Por esperar por mim quando não estou pronta, por me
ouvir quando não consigo completar as orações e acima de tudo,
Por me conduzir em “caminho que não conheço,
tornando os terrenos escabrosos em planos e jamais me
desamparando”
(Isaías 42.16).

“A ciência nos dá o conhecimento do mundo

e a religião nos dá o significado”.

Michael Keller.

DEDICO

À minha mãe Vitória Rodrigues, que me ensinou tudo que eu preciso saber para ser uma pessoa. Mais importante do que os títulos, é ser sua filha.

OFEREÇO

Ao meu amor amigo Renan Machado por quem você é e, por quem eu sou quando estou com você. Por fazer dias escuros,

claros. Por colocar música na minha vida e sabor em tudo que eu faço.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Ely por me dar a oportunidade de realizar um sonho e por ser um instrumento no meu crescimento.

Às minhas companheiras de toda hora, parceiras e conselheiras Aline Costa de Lucio, Greicy Mitzi Bezerra Moreno, Iolanda Maria Soares Reis, Verônica Gonzalez, vocês foram presentes de Deus na minha vida e me ensinaram a viver em comunidade. E por que nossa casa não ficaria completa sem eles, Oscar Boaventura e Matheus Dedemo, vocês fazem parte da família Farfaruei.

Aos aliados e companheiros de luta Breno Pupin, Meire Aparecida Silvestrini, Elaine Donata Ciabotti, Rose Luisa Tavares, Beatriz Costa, o encarajamento e apoio fizeram a diferença. Espero um dia poder retribuir a ajuda e tantos favores.

Aos amigos mais chegados que irmãos, reunidos nas famílias Machado, Pereira Mascioli, Mascioli Berlingeri, De Lucio, Ribeiro. Em especial ao Claudinei e Sheila pela aceitação, Márcia e Arthur pelo apoio incondicional. Jamais poderei retribuir, por isso, muito obrigada.

Aos que me apoiaram desde o começo e fizeram diferença nesse percurso, Marcos Sales Rodrigues, Fernando Mendes, Getulio Sabien, participantes dessa conquista.

Aos amigos que ficaram esperando por mim, que torceram e mesmo a distancia estiveram juntos o tempo todo, Yla B. Vasconcellos, Thiago Henrique Matheus e Olivia Macedo Matheus, e tantos outros amigos no Mato Grosso do Sul que esperam por mim.

Ao Luis Carlos de Assis, você contribuiu muito com meu trabalho.

À Edna M F. Dáquila, seu entusiasmo e cordialidade tornaram nosso ambiente melhor. Obrigada por fazer sempre além do que o solicitado, por tratar sem distinção e nos servir do comum sorriso todos os dias, levarei seu exemplo por onde for.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	ix, x
ABSTRACT	xi, xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Material.....	12
3.1.1. Fungo e bactéria inoculados.....	12
3.1.2. Meios de cultura.....	12
3.1.3. Fontes de fosfatos.....	14
3.1.4. Fontes de carbono.....	14
3.1.5. Fontes de nitrogênio.....	15
3.2. Métodos.....	15
2.2.1. Seleção de espécies avaliadas.....	15
2.2.2. Inóculos de <i>Aspergillus niger</i>	15
2.2.3. Inóculos de <i>Burkholderia cepacia</i>	16
2.2.4. Condução do ensaio.....	16
2.2.5. Efeito da fonte de carbono na solubilização de CaHPO ₄	16
2.2.6. Efeito da fonte de nitrogênio na solubilização de CaHPO ₄	17
2.2.7. Análises físicas	
2.2.7.1. Crescimento.....	17
2.2.8. Análises químicas	
2.2.8.1. Fosfato solúvel.....	18
2.2.8.2. Acidez titulável e pH.....	18

2.2.8.3. Carbono residual.....	19
2.2.8.4 Fosfatase ácida.....	20
4. RESULTADOS.....	21
5. DISCUSSÃO.....	41
6. CONCLUSÕES.....	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS.....	53

ESTÍMULO DA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO RESULTANTE DA CO-INOCULAÇÃO DE *ASPERGILLUS NIGER* E *BURKHOLDERIA CEPACIA*

RESUMO – O fósforo (P) é indispensável para todos os organismos e apresenta disponibilidade muito baixa para as plantas. Uma das alternativas para minimizar esse problema está na solubilização de fosfatos insolúveis por microrganismos P-solubilizadores (MSF). A atuação dos MSF têm sido estudada “in vitro” utilizando-se culturas individuais, porém não de forma co-inoculada. Pode se pressupor que em condições naturais deve haver interação entre as espécies. O objetivo deste estudo foi avaliar-se o efeito da co-inoculação de duas espécies de MSF na solubilização de diferentes fontes de P. O fungo *Aspergillus niger* e a bactéria *Burkholderia cepacia* foram crescidos de forma individual e co-inoculados (*A. niger* + *B. cepacia*) em meio líquido contendo fosfato de cálcio, alumínio ou ferro como fonte de P durante nove dias. O efeito da fonte de carbono (xilose, glicose, sacarose e amido) e da fonte de nitrogênio (cloreto de amônio, glicina, ácido glutâmico e nitrato de sódio) foram avaliados no processo de solubilização. Os fatores que influenciaram direta e indiretamente a solubilização de P como crescimento, acidez e pH, consumo de carbono e atividade enzimática foram avaliados. Quando as fontes de carbono e nitrogênio foram avaliadas, a fonte de P utilizada foi CaHPO_4 e os microrganismos foram crescidos durante seis dias. Dentre as fontes de fosfato, o maior crescimento ocorreu com FePO_4 , a maior quantidade de P solubilizado e atividade de fosfatase ácida foi encontrada com CaHPO_4 , e a mais alta produção de ácidos e redução do pH foi obtida com AlPO_4 . A eficiência de solubilização da co-cultura foi sempre maior do que a das culturas individuais em todas as fontes de P. Quando diferentes fontes de carbono foram estudadas, os maiores índices de solubilização de CaHPO_4 e de crescimento foram observados com a co-cultura. A maior produção de ácidos, redução de pH e consumo

de carbono ocorreram no meio com *A. niger*. A maior atividade de fosfatase ácida foi observada no meio com *B. cepacia*. Dentre as fontes de nitrogênio, o maior crescimento dos MSF, redução do pH e consumo de carbono ocorreu no meio com cloreto de amônio. Por outro lado, a maior quantidade de CaHPO_4 solubilizado se deu em meio com ácido glutâmico. A mais alta produção de ácidos orgânicos foi registrada no meio com nitrato de sódio. A atividade de fosfatase ácida foi superior em meio com glicina quando comparada às demais fontes de nitrogênio. Entre os MSF, a co-cultura cresceu, solubilizou P inorgânico e consumiu a fonte de carbono mais do que as culturas individuais. O fungo produziu a maior quantidade de ácidos resultando na maior redução do pH do meio. A mais alta atividade enzimática ocorreu com *B. cepacia*. Estes resultados sugerem que no solo, a ação sinérgica dos microrganismos pode resultar em maiores quantidades de fosfatos solubilizados.

Palavras-Chaves: Ácidos orgânicos, carbono; fósforo, nitrogênio.

STIMULATION OF PHOSPHATE SOLUBILIZATION RESULTING FROM CO-INOCULATION OF *ASPERGILLUS NIGER* AND *BURKHOLDERIA CEPACIA*

ABSTRACT- Phosphorus is essential for organisms and has very low availability to plants. One alternative to minimize this problem is solubilizing insoluble phosphates forms of P by P-solubilizing microorganisms (PSM). The performance of PSM have been studied "in vitro" using individual cultures, but not in co-culture. It can be assumed that under natural conditions should be interaction between species. The aim of this study was to evaluate the effect of co-inoculation of two species of MPS in to solubilize different sources of P. The fungus *Aspergillus niger* and *Burkhoderia cepacia* bacteria were grown individually and co-inoculated (*A. niger* – *B. ceacia*) in liquid medium containing calcium, aluminum or iron phosphate as a source of P for nine days. The effect of carbon source (xylose, glucose, sucrose and starch) and nitrogen source (ammonium chloride, glycine, glutamic acid and sodium nitrate) were evaluated in the process of solubilization. The factors that directly and indirectly influenced the solubilization of P as PSM growth, production of acid, decrease pH, carbon consumption and phosphatase activity were evaluated. When the carbon and nitrogen sources were evaluated, the source of P used was CaHPO_4 and MSP were grown for six days. Among the sources of phosphate, the greatest PSM growth was found with FePO_4 , the largest amount of P solubilized and acid phosphatase activity was found with CaHPO_4 , and the highest production of acids and pH reduction was obtained with AlPO_4 . The efficiency of solubilization by co-culture was always greater than that of single cultures in all sources of P. When different carbon sources were studied, the highest rates of CaHPO_4 solubilization and PSM growth were observed with the co-culture. The increased production of acids, pH decrease and carbon consumption were found in the middle with

A. niger. The highest acid phosphatase activity was found in the medium with *Burkholderia cepacia*. Among the nitrogen sources, the largest PSM growth, pH decrease and carbon consumption were found in the medium with ammonium chloride. On the other hand, the highest amount of CaHPO_4 solubilized was found in medium with glutamic acid. The highest production of organic acids was recorded in medium with sodium nitrate. The Acid phosphatase activity was higher in medium with glycine when compared to other nitrogen sources. Among the PSM, co-culture has growth, CaHPO_4 solubilized and consumed the carbon source more than the single cultures. The fungus produced the highest amount of acid resulting in more pH reduction of the medium. The highest enzyme activity was found with *B. cepacia*. These results suggest that in the soil, due to the synergistic action of PSM can result in higher amounts of dissolved phosphates.

Key Words: Organic acids, carbon, phosphorus, nitrogen.

1. INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é um elemento indispensável para todos os seres vivos, participando da composição de macromoléculas vitais como ácidos nucleicos e fosfolípidios, do metabolismo energético com a molécula adenosina trifosfato, além de outros processos biológicos como fotossíntese e respiração. Assim, o P não pode ser substituído por outros elementos, sendo fundamental para a manutenção da vida em geral, refletindo sua importância na produção agrícola mundial.

O P pode ser encontrado na forma orgânica, em seres vivos, ou inorgânica em rochas e fosfato precipitado no solo. Contudo, apresenta disponibilidade muito baixa para as plantas, especialmente em regiões tropicais pelas características dos solos. Além disso, as rochas fosfáticas, material de origem do elemento, são consideradas recursos não renováveis.

Uma das alternativas para minimizar esse problema está na utilização de microrganismos do solo capazes de transformar formas insolúveis de P, orgânicas e inorgânicas, em fontes disponíveis através da solubilização, utilizando diferentes mecanismos como a produção de ácidos orgânicos e síntese enzimática. Estas espécies podem ser encontradas juntas, dividindo espaço e nutrientes, interagindo direta e indiretamente entre si.

A ação dos microrganismos na absorção do P pelas plantas pode contribuir para a diminuição da quantidade de fertilizantes industrializados, não apenas reduzindo o custo da produção como também na redução da poluição ambiental, uma vez que no processo de produção dos fertilizantes, há liberação de resíduos prejudiciais ao ambiente, como ácidos e seus derivados.

Considerando a importância desses microrganismos, faz-se necessário conhecer a fisiologia e o comportamento de espécies com potencial de solubilização. Considerando que os organismos não vivem isolados no ambiente, mas atuam de forma associada e utilizam mecanismos diversos sobre os elementos naturais, é importante avaliar a interação existente entre espécies distintas e o efeito combinado destas espécies sobre fontes insolúveis de P.

Devido ao pouco conhecimento sobre o efeito da interação de microrganismos solubilizadores de fosfato, torna-se fundamental um estudo minucioso, em condições de laboratório, sobre a relação existente entre espécies diferentes de microrganismos solubilizadores de P.

Pressupondo que os microrganismos vivam de forma natural em constante interação, interferindo direta e indiretamente no comportamento das espécies circundantes, buscou-se neste estudo avaliar o desempenho conjunto de duas espécies solubilizadoras de fosfato, comparando o crescimento, a produção de ácidos orgânicos e atividade enzimática, consumo de açúcar em diferentes condições de cultivos, estimando o possível aumento na oferta de P para ao meio com a co-cultura dos P-solubilizadores, através da produção de ácidos orgânicos e redução do pH, quantificando o crescimento e a quantidade de C assimilado bem como a atividade enzimática sintetizada nessas condições.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Importância do P

O fósforo (P) é um nutriente exigido em grandes quantidades pelas plantas, pois faz parte das proteínas, coenzimas, ácidos nucleicos e inúmeros outros substratos celulares que atuam nos processos metabólicos vitais das plantas, como fotossíntese, transferência de características genéticas, respiração ou mesmo transferência e armazenamento de energia através da molécula de ATP (DECHEN & NACHTIGALL, 2007).

O P é depois do nitrogênio, o nutriente que mais limita a produção agrícola, pois apesar da considerável quantidade do elemento no solo tanto orgânico quanto inorgânico, possui baixa disponibilidade, devido à forte ligação com outros minerais como cálcio (Ca), ferro (Fe) e alumínio (Al), tornando-se indisponível para as plantas (GYANESHWAR et al., 1998).

Em relação ao conteúdo de P no solo, este pode ser classificado como baixo, médio e alto. Solos alcalinos são ricos em fosfato de Ca enquanto que solos ácidos apresentam maior quantidade de Fe e Al (RANNO et al., 2007). Os solos ácidos são predominantes no Brasil e a solubilidade dos fosfatos associados ao Fe e Al é mais baixa do que os fosfatos associados ao Ca (BARROSO & NAHAS, 2005).

O pH do solo determina grande parte da ionização do P, podendo sua disponibilidade ser aumentada ou não, dependendo das associações que se formam entre o P e outros elementos químicos. Outro fator que agrava a situação é o fato das rochas fosfáticas, material de origem do P, constituir um recurso natural relativamente escasso, que não se renovam ou possuem similares (NAHAS, 2007).

Com o atual consumo da produção agrícola, estima-se que as reservas economicamente exploradas no dias atuais serão exauridas dentro de 125 anos e as

reservas totais dentro de 340 anos (SMIT et al., 2009). Se for considerada a expectativa de aumento de uso do solo para produção agrícola devido ao crescimento da população mundial, a ingestão de carne e o aumento na utilização de cultivo para biocombustível e bioenergia, os recursos provavelmente durarão apenas 75 anos, para as reservas disponíveis e 170 anos, para as reservas totais. Esses cálculos de duração dos recursos podem ser muito otimistas se considerar as grandes perdas registradas na retirada de P das minas (SMIT et al., 2009).

A limitação do P na maioria dos solos no mundo (BATJES, 1997), inclusive em países como o Brasil, que produz e exporta alimentos, devido à baixa fertilidade natural do solo em decorrência da quantidade P disponível, exige a necessidade de aplicação de fertilizantes fosfatados na produção agrícola (SMIT et al., 2009). Essa limitação pode ser minimizada com a aplicação de fertilizantes químicos, porém este método além de oneroso, gera poluentes ambientais (LI & QUI, 2011).

A interferência humana na aplicação de P via fertilizantes, nos ambientes agrícolas pode torná-los locais de estabilidade do elemento, quando bem manuseados. No entanto, quando mal manejados, esse elemento é lixiviado para os ambientes aquáticos, onde a diluição impede sua recuperação, causando danos severos a esse ambiente (GATIBONI, 2003).

Microrganismos solubilizadores de fosfato

Determinados microrganismos possuem a capacidade de solubilizar P a partir de rochas insolúveis, sendo assim, uma maneira promissora para reduzir os custos e minimizar a poluição ambiental. Os mecanismos atribuídos a esses solubilizadores de P incluem acidificação, quelação e reações de troca catiônica (CHAI et al., 2011).

Os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) possuem importante função na solubilização de formas indisponíveis de P, tornando-as solúveis para as plantas devido à mudança no microambiente do solo (SHARAN et al., 2008). Tais microrganismos podem imobilizar parte do mineral para seu próprio metabolismo e dispor uma parte às plantas (ACHAL et al., 2007).

A solubilização de fosfatos realizada tanto por fungos quanto bactérias (BARROSO & NAHAS, 2008; ÇAKMAKÇI et al., 2010) pode favorecer a disponibilidade de P às plantas e minimizar os custos com fertilizantes industrializados (SRIVIDYA et al., 2009). Apesar disso, o comportamento desses microrganismos diverge grandemente, uma vez que bactérias têm maior habilidade para colonizar raízes de plantas (PUENTE et al., 2004) e fungos são mais tolerantes à acidez, possuindo maior potencial como agente de conversão da forma insolúvel para solúvel de P (CHUANG et al., 2007).

Existem diferenças no potencial dos microrganismos em solubilizar fosfato (SILVA FILHO & VIDOR, 2000). Estudos mostraram que bactérias destacam-se na solubilização de fosfato mais do que certas espécies de fungos, por serem estes, especializados em retirar os íons fosfato do solo (SOUCHIE et al., 2006). Essas bactérias encontradas no solo podem aumentar a produtividade da planta, sendo normalmente reconhecidas como rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP), dentre as quais se destaca o gênero *Burkholderia* sp. (BASHAN & HOLGUIN, 1997; PANDEY et al., 2006).

Por outro lado, outros trabalhos apontam uma capacidade superior de fungos edáficos em relação às bactérias na solubilização de P *in vitro*. Estudo realizado com *Penicillium bilaii*, evidenciou que o fungo possui a habilidade de dissolver fosfato de Ca e apatita, tanto em culturas individuais quanto associadas com raízes de plantas (VASSILEV et al., 2007).

Ao estudar dez espécies de bactérias e três de fungos, comuns na rizosfera de arroz, RASHID et al. (2004) observaram que diferentes gêneros solubilizam P em quantidades distintas e quando os organismos foram avaliados separadamente, *A. niger* mostrou maior índice de solubilização de fosfato tricálcico do que os demais fungos. De forma geral, todos os fungos imobilizaram maiores quantidades de P do que espécies bacterianas. Situação contrária foi encontrada por OLIVEIRA et al. (2009) ao estudar 45 isolados selecionados a partir de 371 colônias comuns da rizosfera de milho e com capacidade para solubilizar fosfato orgânico e inorgânico em solo deficiente de P. As bactérias *Bacillus* sp e *Burkholderia* sp apresentam os maiores índices de

solubilização de fosfato tricálcico, com cerca de 67 e 58,5% respectivamente do P total solubilizado ao serem comparadas aos fungos.

Espécies solubilizadoras de fosfato estudadas

As duas espécies utilizadas neste estudo foram selecionadas devido à sua reconhecida capacidade em solubilizar fosfato. Tanto o fungo *Aspergillus niger* (SOUCHIE et al., 2005; BARROSO et al., 2006; EL-AZONI, 2008) quanto a bactéria *Burkholderia cepacia*, anteriormente descrita como *Pseudomonas cepacia* (CONYE et al., 2001) têm sido estudados por sua habilidade em dispor P (MARIANO et al., 2004; SONG et al., 2008) ao ambiente.

Ao ser comparado com outras espécies fúngicas como *Penicillium sp*, também solubilizador de fosfato, *A. niger* tem apresentado os maiores índices de solubilização (SILVA FILHO et al., 2002; DEMIREL et al., 2005; EL-AZONI, 2008; SABER et al., 2009). Porém, quando *A. niger* e *Penicillium sp* foram comparados com bactérias solubilizadoras de fosfato, os fungos solubilizaram as maiores quantidades de P independente da espécie (ILLMER & SCHINNER, 1992).

Mecanismos de solubilização dos microrganismos P-solubilizadores

Produção de ácidos orgânicos e redução de pH

Dentre os mecanismos utilizados pelos MSF, destaca-se a produção de ácidos orgânicos de baixo peso molecular (COLLAVINO et al., 2010). Além da produção de ácidos orgânicos, a redução do pH também é um importante fator na solubilização (DEMIREL et al., 2005; VASSILEV et al., 2006; CHUANG et al., 2007). A ação dos ácidos esta mais relacionada à concentração de H^+ do que com o tipo específico de ácido orgânico (KANG et al., 2008).

A qualidade dos ácidos orgânicos é mais importante do que sua quantidade, especialmente quando se refere à propriedade quelante, pois, esta torna os ácidos

mais efetivos. A carga negativa dos óxidos associa-se aos íons de carga positiva de outros minerais como Ca, magnésio (Mg), Fe, manganês (Mn) e zinco (Zn), liberando desta forma o fosfato solúvel (BARROSO & NAHAS, 2007).

BARROSO & NAHAS (2008) estudando *Aspergillus niger* encontraram correlação positiva entre a produção de ácidos e a solubilização do FePO_4 . VASSILEV et al. (2006) corroboram tais resultados mostrando que a solubilização de fosfatos inorgânicos tem sido atribuída principalmente à produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. O fungo *Aspergillus niger* é reconhecido por produzir ácidos orgânicos que atuam sobre fontes insolúveis de P, disponibilizando fosfatos solúveis (SOUCHIE et al., 2005; BARROSO et al., 2006; EL-AZONI, 2008).

A bactéria *Burkholderia cepacia*, também tem sido estudada por sua habilidade de promover o crescimento de plantas devido à solubilização de fosfato (MARIANO et al, 2004; SONG et al., 2008) e seu potencial em reduzir o pH do meio (LIN et al., 2006).

Atividade enzimática: Fosfatase ácida

Inúmeras enzimas sintetizadas pelos microrganismos e plantas, atuam na liberação de fosfato (NAHAS, 2002; PAWAR & THAKER, 2009; CHAIHARN & LUMYONG, 2009). Essa disponibilidade de P se deve à transformação da forma orgânica (Po) em inorgânica (Pi), assim, diferentes tipos de organofosfatos são hidrolizados como ocorre com outros minerais e absorvidos pelas plantas (CARPENTER-BOGGS et al., 2003; POZO et al., 2003; REZENDE et al., 2004; SINGH & KUMAR, 2008). A atuação das fosfatases depende da concentração de P no meio, agindo desta maneira como um mecanismo de controle (AON et al., 2001). A maioria dos microrganismos do solo possui atividade de algum tipo de fosfatase (NAHAS, 1991). As fosfatases ácidas produzidas por microrganismos são importantes devido a mineralização do P orgânico do solo (RAGHOTHAMA, 1999). *Burkholderia cepacia* é uma dessas espécies bacterianas com capacidade de sintetizar fosfatase ácida na ausência de fosfato solúvel (RODRIGUEZ et al., 2006).

Solubilização de fosfato insolúveis sob influencia de diferentes fontes de C e N

Devido a sua reatividade, o P tem alta capacidade para formar complexos de alta energia de ligação com vários minerais como Ca, Al e Fe (GOMES et al., 2010). Fosfatos complexados com Ca, como apatitas, fosfato tricálcico e dicálcico, além de fosfato de Ca precipitado “in vitro” têm sido utilizados na maioria dos trabalhos sobre a solubilização de fosfato por microrganismos (CUNNINGHAM & KUIACK, 1992). Outras fontes de P complexado com minerais como Al e Fe são tidas como fontes de menor capacidade de solubilização (BARROSO & NAHAS, 2005; FANKEM et al., 2006; SONG et al, 2008; SABER et al, 2009; GOMES et al., 2010).

O comportamento dos microrganismos frente à solubilização de fosfatos pode ser determinado pelas condições do meio, onde as fontes de C e N são determinantes para maior liberação de P (BARROSO et al.,2006; VASSILEV et al., 2006; XIE et al., 2009).

Quando fontes de C foram comparadas, a glicose foi a fonte que melhor favoreceu a solubilização de fosfato de rocha (MINHONI et al.,1991). Além das fontes de C, as fontes de N e o micronutrientes influenciam a redução do pH ou a produção de ácidos por microrganismos (SILVA FILHO & VIDOR, 2000). Segundo SILVA FILHO & VIDOR (2001) ao serem testados 16 isolados solubilizadores de Ca-P, seis apresentaram resultado positivo com fontes amoniacais em detrimento das fontes nítricas. O mesmo efeito foi observado com *A. niger* que apresentou maior crescimento e solubilização de $\text{Co}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e ZnO quando amônio foi utilizada em maior quantidade e fontes nítricas foram reduzidas (DIXON-HARDY et al., 1998).

Co-cultura de microrganismos

Pelos estudos realizados pode-se inferir a capacidade de bactérias e fungos para colonizar raízes de plantas e promover o crescimento desses vegetais. Inúmeras espécies têm sido avaliadas nas mais diversas condições. Por exemplo, estudo

realizado com diferentes gêneros solubilizadores de P, em que isolados de *Penicillium sp* solubilizaram quantidades superiores ou iguais às apresentadas por *Pseudomonas sp* que, por sua vez, foram superiores as de *Bacillus sp.*, e estes as de *Aspergillus sp.* (SILVA FILHO & VIDOR, 2000).

Ainda que haja semelhanças, determinadas espécies podem se destacar em comparação a outras, como a bactéria *Pseudomonas cepacia* que mostrou ser capaz de solubilizar a maior variedade de fosfatos em meio líquido, reduzir o pH e produzir ácidos, superando outros 42 isolados testados nas mesmas condições (NAHAS, 1996).

Pelos estudos realizados pode-se inferir a capacidade de bactérias e fungos para colonizar raízes de plantas e promover o crescimento desses vegetais. Contudo, esses organismos têm sido estudados separadamente em condições de laboratório ou com aplicações diretas na planta (WANI et al., 2007; COLLAVINO et al., 2010). Recentemente, têm crescido o interesse em avaliar o efeito sinérgico de bactérias e fungos e o impacto combinado desses microrganismos, porém, pouco se sabe sobre os mecanismos de interação de bactérias e fungos micorrizicos (ARTURSSON et al., 2006).

A co-cultura microbiana pode ser utilizada nas mais variadas aplicações, por exemplo, Arriaga & Revala (2005) estudaram a capacidade de *Fusarium solani* na degradação de n-hexane, um composto orgânico volátil emitido por diferentes resíduos industriais. Os fungos mostraram melhor desempenho na decomposição desse composto quando comparado às bactérias, ou seja, *F. solani* apresentou uma taxa de 95% de consumo contra 15% da atividade bacteriana, proporcionando um percentual de mais de 100% no efeito combinado entre fungo e bactéria.

Em condições naturais, os microrganismos tem sido co-inoculados diretamente no solo, próximo à rizosfera a fim de promover o crescimento das plantas, onde se observa que algumas espécies se destacam em comparação com outras, ainda que ambas apresentem a mesma habilidade em condições *in vitro* (COLLAVINO et al., 2010).

Ao aplicar bactéria simbiótica, assimbiótica e solubilizadora de fosfato em diferentes combinações, WANI et al. (2007) perceberam que a dupla inoculação aumentou a produção de matéria seca da planta. Além disso, houve estímulo no desenvolvimento ainda maior quando os três microrganismos foram co-inoculados, com crescimento de 250% da biomassa seca do vegetal

Outra forma de co-cultura são os biofertilizantes, onde a associação de microrganismos tem sido utilizada com a finalidade de aumentar a fixação biológica do N (CAMACHO et al., 2001; ASKARY et al., 2009) e, em conjunto, a solubilização microbiana de fosfatos insolúveis (DUBEY et al., 1997; ZAIDI & KHAN, 2006; WANI et al., 2007; OUAHMANE et al., 2009). A utilização de bactérias fixadoras de N₂ e solubilizadoras de fosfato em plantas aumentou o número e a biomassa de nódulos, produção de sementes e conteúdo de proteína (WANI et al., 2007). XIE et al.(2009) avaliando trinta isolados em três meios de cultura diferentes observaram que a taxa de solubilização obtida quando os microrganismos são testados juntos difere da atuação individual, resultando em diferentes valores de pH e produção de ácidos orgânicos.

Uma vez que se reconheça a atuação microbiana na solubilização de P e se pretenda utilizar essa capacidade para potencializar a absorção de fosfato por plantas, deve-se compreender como os microrganismos se comportam diante de diferentes condições ambientais e ofertas variáveis de P. SOUCHIE et al. (2005) mostraram que quando expostos a variados meios de cultura com fontes diferentes de C e P, tanto bactérias quanto fungos solubilizadores apresentaram resultados significativamente distintos. Deve-se questionar, portanto, de que maneira e em quais proporções esses organismos cooperam ou competem na disponibilização de P no solo.

Apesar dos microrganismos viverem em constante interação em ambiente natural, a relação existente entre os MSF co-inoculados não tem sido investigada em condições de laboratório, a fim de avaliar o efeito que uma espécie possa ter sobre outra e a interação de ambas sobre fontes de P.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Fungo

O fungo utilizado foi *Aspergillus niger*, isolado de um Nitossolo Vermelho, com capacidade de solubilizar fosfatos inorgânicos de Ca, Al e Fe (BARROSO & NAHAS, 2005). Este fungo está estocado no Laboratório de Microbiologia do Solo e foi replicado a cada 30 dias para obtenção dos inóculos utilizados nos ensaios.

Bactéria

A bactéria *Burkholderia cepacia* foi isolada do solo e mostrou alta habilidade em solubilizar fosfato de rocha e fosfato de Ca (NAHAS, 1994). Esta espécie encontra-se estocada no laboratório de Microbiologia do Solo e foi replicada a cada trinta dias para manutenção e utilização de inóculos durante os experimentos.

Meios de cultura

Meios sólidos para crescimento e manutenção das culturas e solubilização de fosfato insolúvel estão descritos nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Meio Sabouraud (MEDVEDFEF et al., 2001).

Peptona de soja	10,0 g
Glicose	40,0 g
Ágar nutriente	15,0 g
H ₂ O q.s.p.	1000 mL
pH	7,0

Tabela 2. Meio Nutriente Ágar (BURNETT, 1957).

Extrato de carne	3,0 g
Peptona de carne	5,0 g
NaCl	1,0 g
Ágar nutriente	15,0 g
H ₂ O q.s.p.	1000 mL
pH	7,0

O meio líquido utilizado nos ensaios de solubilização de fosfatos insolúveis está descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Meio para solubilização – MS (NAHAS et al., 1994)

NaCl	0,1 g
NH ₄ Cl	1,0 g
KCl	0,2 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,2 g
Glicose	30,0 g
Extrato de levedura	0,5 g
H ₂ O q.s.p.	1000 mL
pH	7,0

Fontes de fosfatos

Foram utilizados os fosfatos de Al (AlPO_4), Fe (FePO_4) e Ca ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). A quantidade de P adicionada no meio de cultura foi de $0,36\text{g/L}^{-1}$. Os minerais utilizados e sua solubilidade estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Características das fontes de fósforo.

Composto	Mineral	Solubilidade em água	Solubilidade em ácido
AlPO_4	Variscita	Insolúvel	Ligeiramente solúvel
$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Brushita	Insolúvel	Ligeiramente solúvel
FePO_4	Estrengita	Insolúvel	Solúvel (HCl)

Baseado em TISDALE et al. (1985) e LIDE & FREDERIKSE (1998).

Fontes de C

Glicose, sacarose e xilose foram utilizadas como fontes de C na concentração de 12g L^{-1} . Amido foi adicionado ao meio de cultura na concentração de 1g L^{-1} .

As fontes de C foram esterilizadas separadamente antes da inoculação. Em tais condições, a fonte de N utilizada foi cloreto de amônio ($1,0\text{g L}^{-1}$)

Fontes de N

Cloreto de amônio, nitrato de sódio, glicina e ácido glutâmico foram utilizados como fontes de N na concentração de $0,26\text{g L}^{-1}$. Em tais condições, a fonte de C utilizada foi glicose (12g L^{-1}).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Seleção das espécies avaliadas

Para selecionar as espécies que foram utilizadas neste estudo, um grupo de 20 isolados foram testados em meio de cultura sólido para solubilizadores (NAHAS, 1994) com CaHPO_4 como fonte de P. Os isolados foram obtidos do solo (NAHAS, 1994; BARROSO, 2002) estocados no Laboratório de Microbiologia do Solo da Unesp/ FCAV. Os microrganismos foram inoculados por picada e incubados por 7 dias a 30°C. A atividade solubilizadora foi obtida pela relação halo/colônia. Dentre os isolados bacterianos, o isolado 342 destacou-se, sendo identificado como *Burkholderia cepacia* (PEDRINHO et al, 2009). Entre os fungos, a espécie com maior atividade foi *Aspergillus niger* (BARROSO & NAHAS, 2002).

3.2.2. Obtenção dos inóculos utilizados nos estudos de solubilização.

Inóculo de *Aspergillus niger*

O fungo *Aspergillus niger* foi crescido em tubos contendo meio Sabouraud inclinado a 30°C por 8 dias. O fungo foi sistematicamente replicado a partir de cultura anterior. A cada trinta dias, novas culturas eram inoculadas e descartadas as anteriores não utilizadas após esterilização. Suspensões de esporos foram obtidas utilizando dois tubos de meio inclinado, a partir do qual foram realizadas raspagens com 10 mL de água desionizada esterilizada. Após diluição, foram realizadas contagens do número de esporos com câmara de Neubauer a fim de obter suspensão com $22,3 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ (BARROSO & NAHAS, 2005).

Inóculo de *Burkholderia cepacia*

B. cepacia foi cultivada em meio nutriente ágar por cinco dias. Dois tubos foram raspados com 10 mL de água e a suspensão concentrada com células bacterianas foi diluída de 10^{-1} a 10^{-7} e inoculadas em placas com meio de cultura sólido utilizando 0,1 mL da suspensão. A concentração de células foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda (λ) 600 nm.

Na diluição 10^{-7} foram encontrados em média 92 colônias de bactérias. Essa contagem correspondeu a $9,2 \times 10^9$ células na suspensão concentrada. A leitura da absorbância da suspensão concentrada foi de A_{600} 3,24. A suspensão concentrada de bactérias foi diluída para obter $4,6 \times 10^9$ células mL^{-1} correspondendo a A_{600} 1,508. Essa correspondência entre o número de células e a leitura foi utilizada em todos os ensaios.

3.2.3. Condução do ensaio

Os microrganismos foram inoculados individualmente e associados em placas de Petri contendo meio de cultura líquida. Meios de cultura não inoculados foram utilizados como controle (SI). Todos os organismos foram incubados por até nove dias a 30°C em cultura estacionária, sendo retiradas três amostras de cada cultura no dia da inoculação e a cada três dias de crescimento, a partir dos quais se determinaram os atributos químicos, físicos e físico-químicos.

3.2.4. Efeito da fonte de C na solubilização de CaHPO_4

Conforme a condução do ensaio acima descrita, a glicose, fonte de C utilizada na solubilização das fontes de P, foi substituída por sacarose, amido e xilose em concentrações supracitadas. O crescimento dos microrganismos foi avaliado após 6 dias de incubação a temperatura de 30°C .

3.2.5. Efeito da fonte de N na solubilização de CaHPO_4 .

As fontes de N avaliadas foram incluídas no meio de cultura descrito anteriormente, substituindo-se cloreto de amônio por glicina, ácido glutâmico e nitrato

de sódio. O crescimento dos microrganismos foi avaliado após 6 dias de incubação a temperatura de 30°C.

3.2.6. Análises físicas – Crescimento.

Fungo *Aspergillus niger*

Quantificou-se a biomassa do fungo em termos de massa seca (mg mL^{-1}). Após filtração da cultura com fungo em funil de Buchner, o micélio retido em papel de filtro foi lavado com 50 mL de solução com HCl 1 Mol L^{-1} e 50 mL de água desionizada (BARROSO, 2002). A biomassa fúngica foi determinada após secagem em estufa à 105°C por 24 horas, descontando-se o peso seco do papel de filtro.

Bactéria *Burkholderia cepacia*

Quantificou-se a biomassa da bactéria e da co-cultura (*A. niger* + *B. cepacia*) em termos de massa seca (mg mL^{-1}). Determinou-se a biomassa da bactéria e da co-cultura após centrifugação e retirada do sobrenadante para análises químicas. Após a imediata centrifugação, foram adicionados no tubo de centrífuga 10 mL de HCl 1 mol L^{-1} . O sobrenadante foi descartado. A massa celular úmida retida nos tubos de centrífuga foi novamente suspensa com 10 mL de água desionizada com agitação. Após esta ressuspensão, a biomassa foi reservada em cadinho de porcelana seco e pré-pesado. A biomassa foi secada em estufa de secagem durante 24 horas a 105°C. O peso seco da biomassa foi descontado do peso do cadinho anteriormente registrado.

3.2.7. Análises químicas

As análises químicas e físicas foram feitas com o filtrado obtido com o fungo e o sobrenadante reservado do meio de cultura crescido com as bactérias e a co-cultura.

3.2.7.1. Fosfato solúvel no meio de cultura (AMES, 1966).

A quantidade de P solubilizado no meio de cultura foi determinada em termos de $\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$. Foram adicionados 0,1 mL do sobrenadante no tubo de ensaio, 1,5 mL de água desionizada e 1,4 mL de solução R seguido de agitação. Os tubos foram incubados em banho-maria a 45°C por 20 minutos, efetuando-se leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda (λ) de 820 nm. Através de curva padrão pré-estabelecida com solução de KH_2PO_4 $0,0002 \text{ Mol L}^{-1}$ determinou-se a quantidade de P solubilizado.

Solução R

Misturou-se 1 parte de solução A e 6 partes de solução B no momento da determinação.

Solução A

Dissolveram-se 10 g de ácido ascórbico em 100 mL de água desionizada.

Solução B

Foi dissolvido 1,25g de molibdato de amônio em 30 mL de água desionizada, onde se acrescentou 7,3 mL de ácido sulfúrico concentrado e 300 mL de água desionizada.

3.2.7.2. Acidez titulável e pH (CEREZINE et al, 1988).

Tanto a produção de ácidos orgânicos quanto o pH do meio foram medidos através da titulação de 10 mL do sobrenadante das culturas individuais ou co-cultura com solução padrão de NaOH $0,02 \text{ Mol L}^{-1}$ até pH 7,0 com titulador automático Tritation Manager. Os valores da acidez titulável foram calculados em mg mL^{-1} e do pH em unidades.

3.2.7.3. C residual

Método (TREVELYAN e HARRISON, 1952)

A mistura de reação continha 0,5 mL do meio de cultura e 2,0 mL de água desionizada. A parte preparou-se solução antrona e após 1 hora de repouso fez-se

titulação com bureta vertendo-se 5 mL da reação incubada. Seguiu-se intensa agitação e posterior resfriamento por 15 minutos, sendo então feita a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda (λ) de 607 nm. Através de curva padrão pré-estabelecida com solução de glicose anidra (0,5 g em 250 mL de água desionizada) efetuaram-se as determinações das quantidade de C residual, calculadas em mg C mL⁻¹.

Solução de Antrona

0,1g de antrona para 50 mL de ácido sulfúrico, seguida de descanso por 1 hora antes do uso.

3.2.7.4. Método de SOMOGYI e NELSON (1944).

A quantidade de C residual no meio com xilose foi determinada utilizando o método de SOMOGYI & NELSON (1944), onde o volume utilizado foi diluído, utilizando-se 1 mL da amostra e 1 mL do reativo cúprico alcalino. As amostras foram fervidas por 20 minutos, resfriadas e em seguida foi adicionado 1 mL do reagente arsenomolybdato, adicionando 5 mL de água desionizada. A leitura foi realizada com espectrofotômetro na absorvância de 660 nm. Através de curva padrão pré-estabelecida com solução de glicose anidra (0,5 g em 250 mL de água desionizada) efetuaram-se as determinações das quantidade de C residual, calculadas em mg C mL⁻¹.

3.2.7.5. Fosfatase ácida (NAHAS, 1982)

A mistura da reação continha 0,2 mL do meio de cultura e 1,8 mL do substrato, sendo homogeneizada com leve agitação e incubação em banho-maria a 37°C por 20 minutos. Após o período de incubação, realizou-se leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda (λ) de 405 nm. Através de curva padrão pré-estabelecida com solução de paranitrofenol (pNF) com concentração de 100 μ g pNF mL⁻¹, determinou-se

a atividade da fosfatase ácida. A atividade enzimática foi avaliada em termos de $\mu\text{g pNF mL}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ biomassa seca.

Substrato

4 mMol L⁻¹ paranitrofenil fosfato (pNPP) em tampão acetato 0,1Mol L⁻¹ com pH 5,4.

4. RESULTADOS

Efeito das fontes de P

O crescimento do fungo *Aspergillus niger* e da bactéria *Burkholderia cepacia* isolados e co-inoculados em meio de cultura contendo CaHPO_4 (Ca-P), AlPO_4 (Al-P) ou FePO_4 (Fe-P) como fonte de P pode ser analisado na Figura 1 (A, B e C).

Independentemente da fonte de fosfato utilizada, o crescimento da bactéria, do fungo e da co-cultura (*A. niger* + *B. cepacia*) foi aumentando durante o período de incubação 0-9 dias. A produção de biomassa do fungo em meio com Ca-P variou de 4,36 a 9,78 mg mL^{-1} , da bactéria de 1,34 a 2,36 mg mL^{-1} e da co-cultura de 8,55 a 9,17 mg mL^{-1} (Figura 1 A). O maior crescimento da co-cultura (*A. niger* + *B. cepacia*) foi observado no 3º dia de incubação e depois estabilizou (Figura 1A).

A massa celular da co-cultura foi em média 2,1 vezes maior que a do fungo e 6,9 vezes que a da bactéria. Foi observada maior velocidade de crescimento do fungo em comparação à bactéria (Figura 1A). Enquanto a massa micelial aumentou 2,2 vezes no 6º ou 9º dia de incubação em relação ao 3º dia, a massa celular da bactéria aumentou apenas 1,3 e 1,8 vezes, respectivamente.

O aumento da biomassa dos microrganismos crescidos isolados ou co-inoculados em meio contendo Al-P ocorreu a partir do terceiro dia de incubação (Figura 1B). O pico de produção de biomassa de todas as culturas, exceto da bactéria, foi observado no sexto dia de incubação. Constatou-se redução da biomassa do fungo e da co-cultura após o sexto dia, enquanto que a bactéria permaneceu com o mesmo peso (Figura 1 B). Até o 6º dia de incubação, a biomassa da co-cultura foi 1,1 a 1,3 vezes maior que a soma das biomassas de *A. niger* e *B. cepacia*. Aumento da biomassa da co-cultura em relação ao fungo apenas foi observado no 3º dia. Entre as culturas individuais, o fungo cresceu 14 vezes a mais do que a bactéria no 3º dia de incubação e 16 vezes no 9º dia (Figura 1 B).

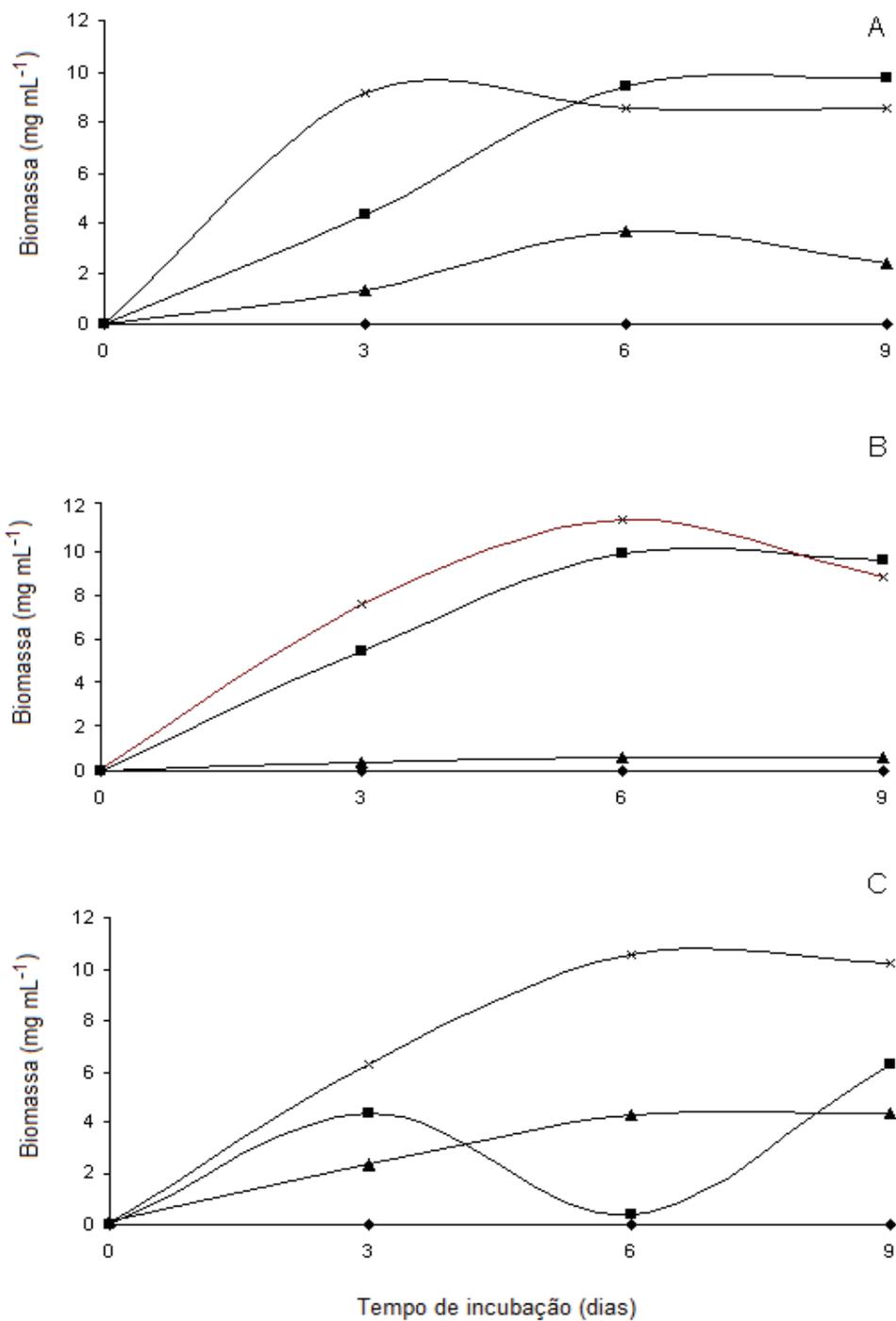


Figura 1. Crescimento de *Aspergillus niger* (—■—), *Burkholderia cepacia* (—▲—) e co-cultura (—*—) em meio com Ca-P (A), Al-P (B) e Fe-P (C). Meio não inoculado (controle) —◆—.

Quando os microrganismos foram crescidos em meio de cultura com Fe-P como fonte de P, a biomassa produzida foi semelhante à observada com meio Al-P (Figura 1B), variando de 6,43 a 9,56 mg mL⁻¹ com *A. niger*, 0,36 a 0,46 mg mL⁻¹ com *B. cepacia* e de 6,23 a 11,14 mg mL⁻¹ com a co-cultura (Figura 1C). O pico de crescimento da co-cultura ocorreu no 6º dia, com a produção de 11,14 mg mL⁻¹ biomassa. A produção máxima de biomassa pelo fungo foi verificada no 9º dia e da bactéria no 3º dia. A biomassa dos microrganismos co-inoculados foi em média 10% maior ao do fungo e mais de 95% acima do peso exibido pela bactéria em todo o período de avaliação do crescimento no meio com Fe-P.

A quantidade de fosfato observado no meio de cultura aumentou durante o período de incubação dos microrganismos (Figura 2). Constatou-se que a máxima quantidade de fosfato produzida pela bactéria foi no 9º dia, porém, com *A. niger* isto ocorreu no 3º dia com Ca-P e no 9º dia com Al-P e Fe-P (Figura 2A, B, C). Da mesma forma, com a co-cultura a quantidade máxima de Al-P e Fe-P ocorreu no 9º dia, enquanto que com Ca-P a maior solubilização ocorreu no 6º dia. As quantidades dos fosfatos solubilizados variaram de 649,95 a 1.103,64 µg PO₄⁻³ mL⁻¹ em meio com Ca-P, de 29,21 a 594,85 µg PO₄⁻³ mL⁻¹ com Al-P e de 12,92 a 168,80 µg PO₄⁻³ mL⁻¹ com Fe-P.

De modo geral, a co-cultura propiciou maior quantidade de fosfato solubilizado do que *A. niger* e este, mais do que *B. cepacia* em meio com Al-P e Fe-P. Porém, no meio com Ca-P a quantidade de fosfato acumulado por *A. niger* e co-cultura foi semelhante e maior do que a *B. cepacia* (Figura 2A). A eficiência de solubilização (ES) do Ca-P foi aumentando e, no final do período de incubação, 100% do fosfato foi solubilizado por *A. niger* - *B. cepacia* enquanto que, com as culturas isoladas, foram obtidos percentuais de 78% com *B. cepacia* e 91% com *A. niger* (Tabela 5). Proporções menores foram obtidas com os outros fosfatos estudados, isto é, no meio com Al-P a ES foi de 51, 5 e 54% e com Fe-P de 12, 4 e 15% quando foram inoculados *A. niger*, *B. cepacia* e co-cultura, respectivamente (Tabela 5).

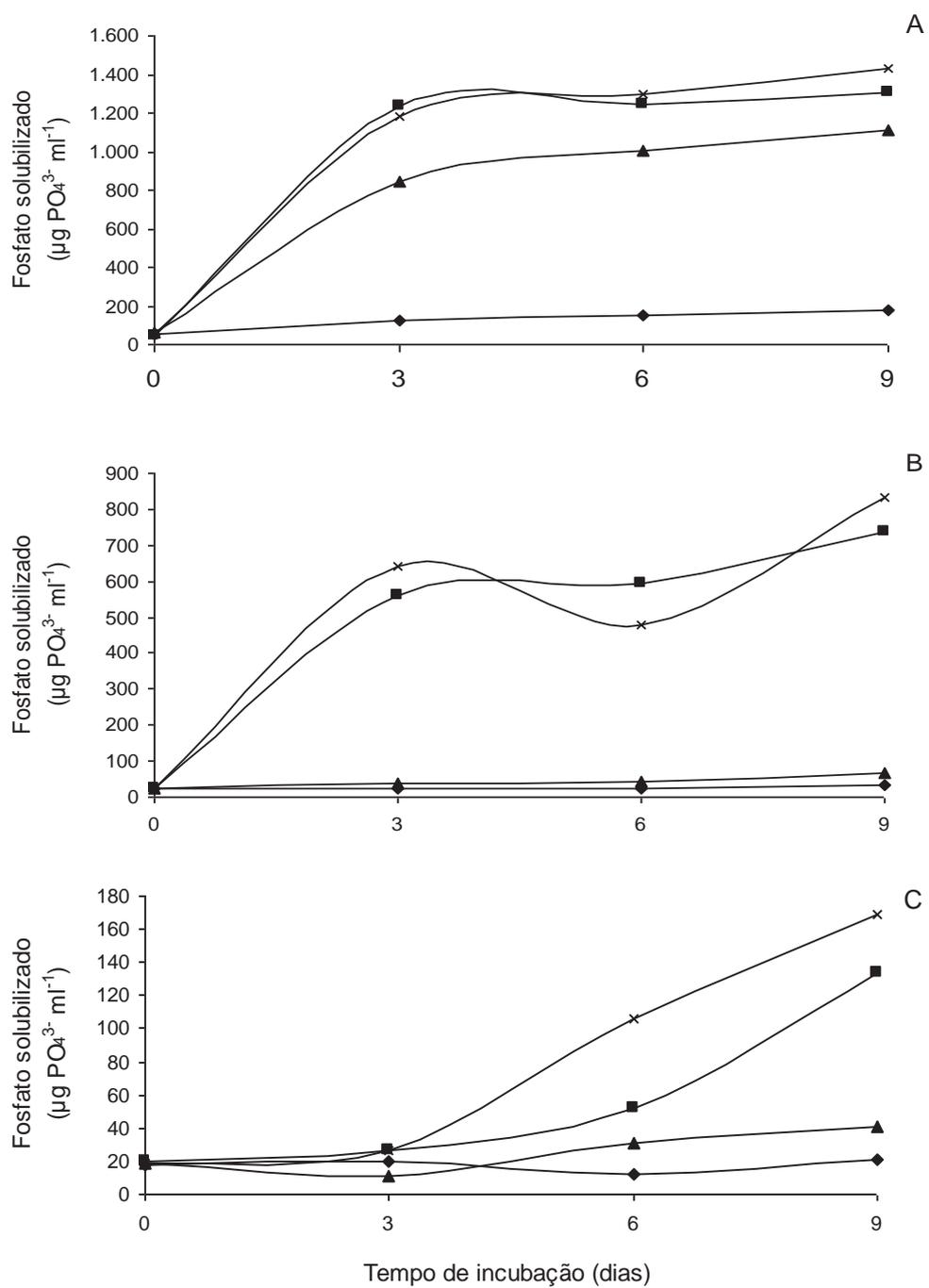


Figura 2. Solubilização de Ca-P (A), Al-P (B) e Fe-P (C) por *Aspergillus niger* (—■—), *Burkholderia cepacia* (—▲—) e co-cultura (—×—). Meio não inoculado (controle) —◆—.

O volume de ácidos orgânicos liberados pelos microrganismos estudados dependeu da fonte de fosfato adicionada ao meio de cultura (Figura 3). A produção de ácidos pelos microrganismos individuais ou associados aumentou consideravelmente no 3º dia de incubação. Em meio com Ca-P (Figura 3 A), esse aumento foi ainda observado no 6º dia de incubação do fungo. Com a co-cultura houve diminuição da produção de ácidos a partir do 6º dia de incubação. No 3º dia de incubação, possivelmente em decorrência da interação entre os microrganismos utilizados na co-cultura verificou-se maior estímulo da produção de ácidos ($5,39 \text{ mg mL}^{-1}$) que a soma da produção de ácidos pelo fungo ($4,34 \text{ mg mL}^{-1}$) e pela bactéria ($0,55 \text{ mg mL}^{-1}$) isolados (Figura 3 A).

Nos meios com Al-P e Fe-P as quantidades de ácidos secretadas também foram crescentes (Figura 3 B e C). No meio com Al-P a produção de ácidos aumentou no 6º dia com a co-cultura e no 9º dia com *A. niger* (Figura 3 B). Com Fe-P, a produção máxima de ácidos foi observada no 3º dia com a bactéria e no 6º dia com os demais microrganismos (Figura 3 C). Dentre os MSF, *B. cepacia* liberou menor quantidade de ácidos no meio do que *A. niger*. Também a co-cultura produziu maior quantidade de ácidos nos meios com Al-P e Fe-P do que no meio com os microrganismos individuais (Figura 3 B e C).

O índice pH variou de 2,89 a 6,87 no meio com Ca-P, 2,66 a 7,07 com Al-P e 2,01 a 7,38 com Fe-P (Figura 4). Estes resultados mostram que houve acentuada redução do pH no 3º dia de incubação. Constatou-se ainda que os valores do pH diminuíram pouco após o 3º dia nos meios de cultura com todos os fosfatos porém muito pouco. Observa-se também que os valores de pH decresceram em média conforme a seguinte ordem Ca-P>Al-P>Fe-P. Em adição, verificou-se que de forma geral os menores valores de pH foram observados no meio crescido com *A. niger*, seguido da co-cultura e por final da bactéria (Figura 4).

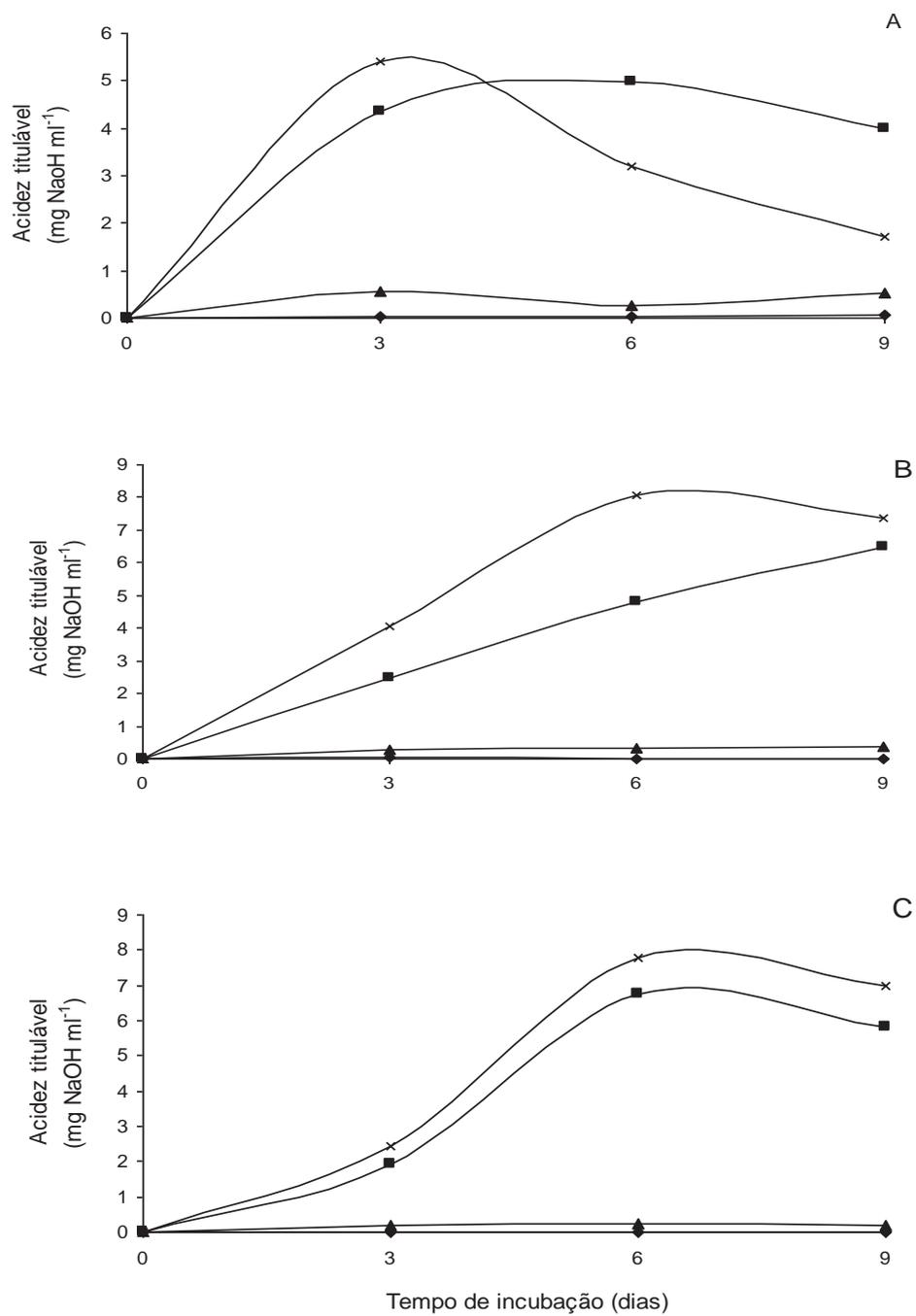


Figura 3. Produção de ácidos por *Aspergillus niger* (—■—), *Burkholderia cepacia* (—▲—) e co-cultura (—×—) em meio com Ca-P (A), Al-P (B) e Fe-P (C). Meio não inoculado (controle) —◆—.

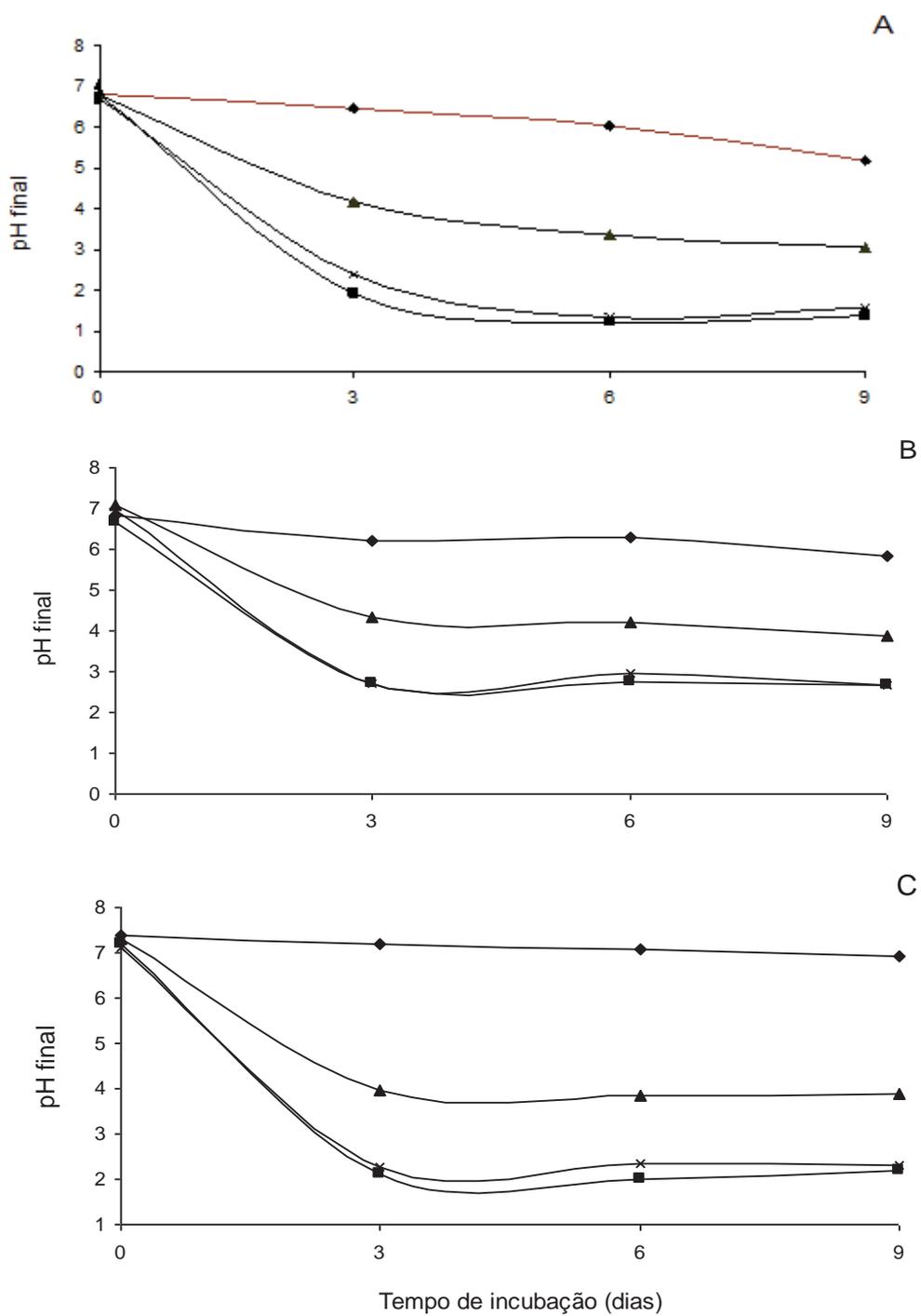


Figura 4. Crescimento de *Aspergillus niger* (■), *Burkholderia cepacia* (▲), co-cultura (×) em meio com Ca-P (A), Al-P (B) e Fe-P (C). Meio não inoculado (controle) (◆).

A concentração inicial de C do meio de cultura foi reduzida drasticamente após 3 dias de incubação dos microrganismos (Figura 5). Dentre as fontes de fosfato, no meio com Ca-P reduções de 68, 99 e 98% foram observadas com a inoculação de *A. niger*, *B. cepacia* e a co-cultura, respectivamente (Figura 5A). No 9^a dia de incubação, quase toda glicose foi consumida pelas culturas.

A utilização do açúcar no meio com Al-P foi mais lenta do que o observado com o Ca-P (Figura 5 A e B). No 3^o dia de incubação, reduções na quantidade de C do meio com *A. niger*, *B. cepacia* e co-cultura foram de 43, 30 e 44%, respectivamente. O consumo de glicose aumentou nos períodos subseqüentes e, no 9^o dia de incubação, verificou-se que houve o consumo de 83, 41 e 98%, respectivamente. Portanto, o maior consumo de glicose ocorreu na co-cultura e, em seguida, pelo fungo e a bactéria (Figura 5 B).

A mesma tendência de redução da quantidade inicial de C foi observada no meio com Fe-P, isto é, acentuado decréscimo de 57, 43 e 70% no meio com *A. niger*, *B. cepacia* e co-cultura, respectivamente (Figura 5 C). Também, a tendência de consumo de C foi constatada nos demais períodos de incubação e, no 9^o dia, foi de 82, 38 e 100%, respectivamente. Estes resultados mostram que houve maior consumo de C pela co-cultura e, em seguida, pelo fungo e a bactéria (Figura 5 C). Entre as fontes de fosfato, observou-se consumo decrescente médio na seguinte ordem Ca-P>Fe-P>Al-P.

A atividade da fosfatase ácida variou de 9.35 a 52.26 $\mu\text{g pNP mL}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ biomassa no meio com Ca-P (Figura 6 A). O pico da atividade enzimática foi observado no 6^o dia, seguido por acentuado declínio até o final da incubação (Figura 6A). A atividade da fosfatase ácida no meio crescido com *A. niger* e co-cultura aumentou até o 6^o dia e, em seguida estabilizou. A maior atividade enzimática em meio com Ca-P ocorreu com *B. cepacia*, sendo 1,7 e 3,1 vezes maior do que a atividade no meio de cultura com *A. niger* e co-cultura, respectivamente. (Figura 6 A).

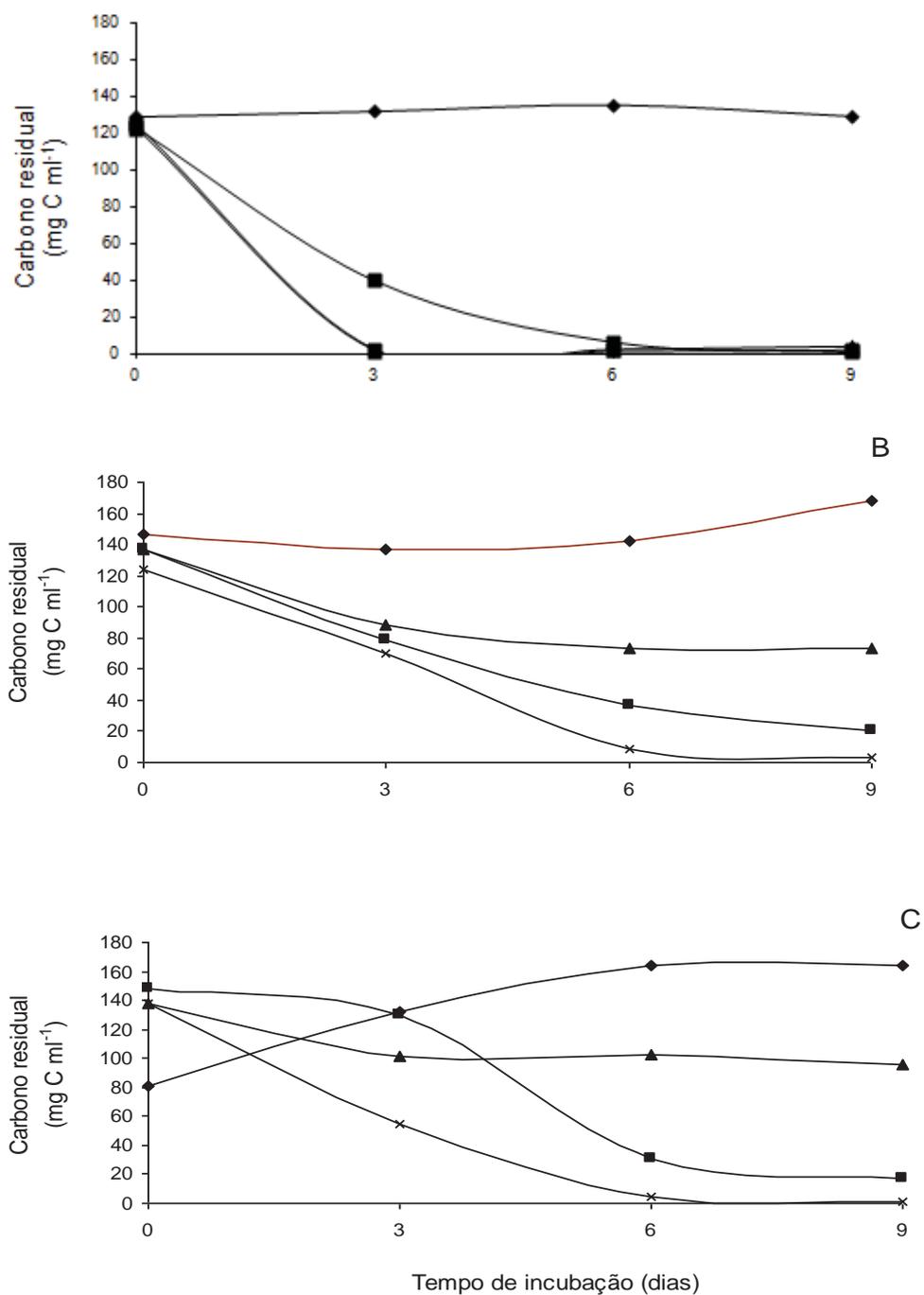


Figura 5. Consumo de C por *Aspergillus niger* (■), *Burkholderia cepacia* (▲) e co-cultura (×) em meio com Ca-P (A), Al-P (B) e Fe-P (C). Meio não inoculado (controle) (◆).

Utilizando-se Al-P, a atividade da fosfatase ácida variou de 0,00 a 13,24 $\mu\text{g pNP mL}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ biomassa (Figura 6 B). Tendências diversas foram observadas no meio Al-P comparado com Ca-P. A atividade observada no meio com o fungo e a co-cultura foi aumentando até o 6º dia e depois estabilizou; no meio com a bactéria a atividade foi crescente até o 9º dia. A atividade no meio com a co-cultura foi 1,8 vez maior do que a com o fungo e 12,7 vezes maior do que com a bactéria (Figura 6 B).

O perfil da atividade enzimática no meio com Fe-P (Figura 6 C) divergiu dos observados nos meios com os demais fosfatos. Observou-se pico de atividade da fosfatase ácida no 3º dia nos meios com *A. niger* e co-cultura (Figura 6 C). Porém, a atividade da *B. cepacia* foi crescente e aumentou bastante até o 9º dia comparada com as demais culturas. A atividade variou de 0,40 a 78,23 $\mu\text{g pNP mL}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ biomassa, sendo no meio com a bactéria 10,4 vezes maior que a do fungo e 11,9 vezes maior que a da co-cultura (Figura 6 C).

Tabela 1. Eficiência de solubilização (%) do CaHPO_4 pelo fungo *Aspergillus niger* e a bactéria *Burkholderia cepacea* isolados e associados.

	Tempo de incubação (dias)			
	0	3	6	9
Controle (sem inóculo)	3,64	8,59	10,43	12,63
<i>Aspergillus niger</i>	3,17	86,15	86,96	91,34
<i>Burkholderia cepacea</i>	4,04	58,93	64,44	77,70
<i>A. niger</i> + <i>B. cepacea</i>	3,67	82,84	90,43	100,06

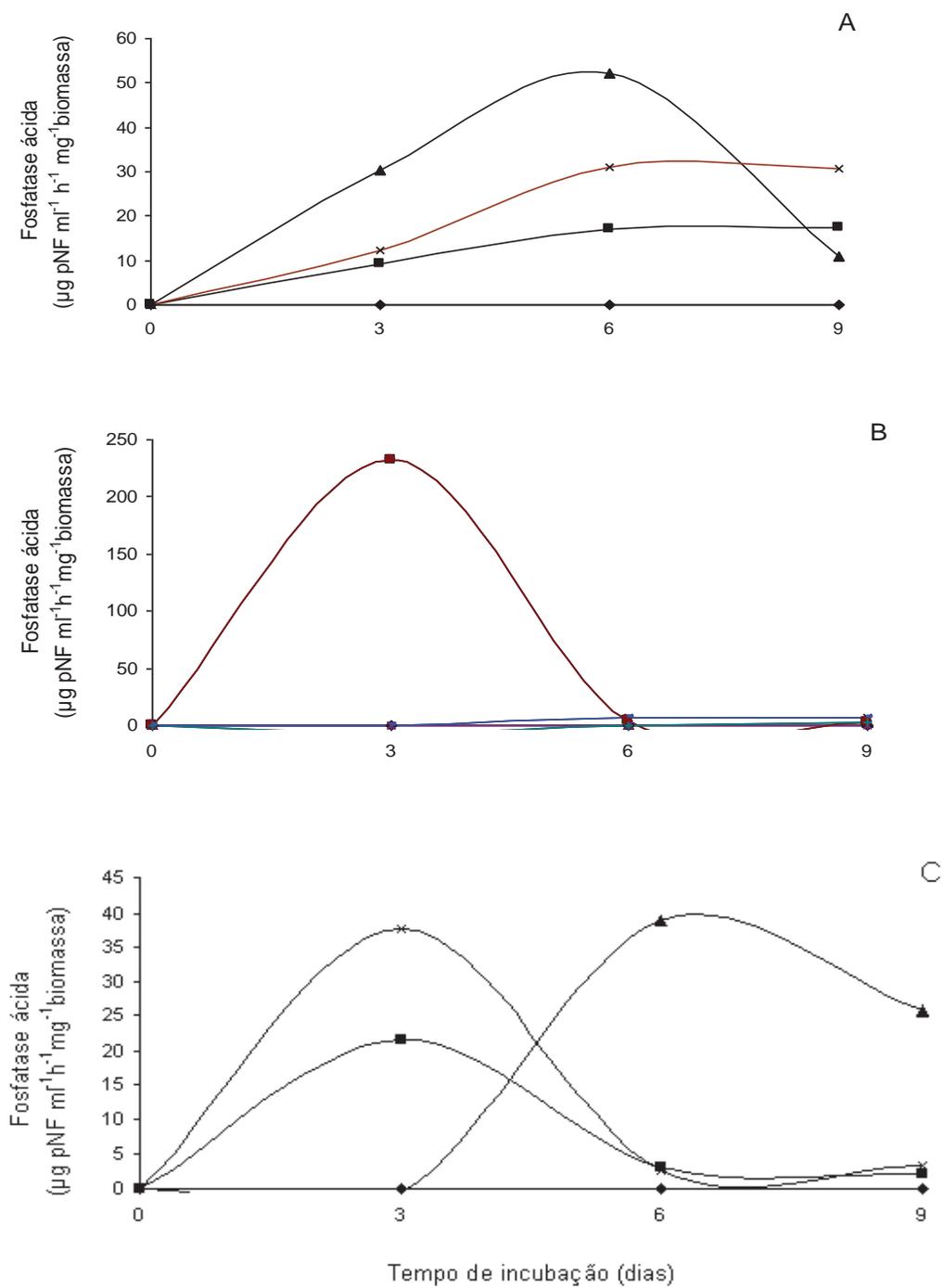


Figura 6. Atividade enzimática de *Aspergillus niger* (■), *Burkholderia cepacia* (▲), co-cultura (×) em meio com Ca-P (A), Al-P (B) e Fe-P (C). Meio não inoculado (controle) (◆).

Efeito das fontes de C

A atividade do fungo *A. niger*, da bactéria *B. cepacia* e da co-cultura (*A. niger* + *B. cepacia*) no meio de cultura estacionário foi afetada com a utilização de fontes diferentes de C (Figura 7). Resultados da glicose como fonte de C, anteriormente obtidos foram incluídos para comparação (Figura 7).

O crescimento dos microrganismos variou dependendo da fonte de C utilizada, tendo sido estimulado no meio adicionado de glicose comparado com as outras fontes de C - xilose, sacarose e amido (Figura 7). Em média, maior crescimento foi observado com a co-cultura, seguido do fungo e da bactéria (Figura 7 A). A quantidade média de Ca-P solubilizado decresceu na seguinte ordem amido>glicose>xilose>sacarose, sendo de 705,07; 695,60; 510,43 e 71,73 $\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$, respectivamente. Essa tendência de decréscimo foi observada tanto para os microrganismos individuais como associados (Figura 7 B). Maior quantidade de fosfato solúvel foi encontrada no meio com amido crescido com a co-cultura (1028,67 $\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$) do que com o fungo (997,07 $\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$) e a bactéria (705,74 $\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$) (Figura 7 B).

A produção de acidez titulável no meio adicionado de Ca-P foi em média de 2,11 com glicose, 1,98 com sacarose, 1,33 com amido e 1,22 mg NaOH mL^{-1} com xilose, respectivamente. Com *A. niger*, a acidez do meio decresceu de acordo com a seqüência glicose > sacarose > xilose > amido. Com a co-cultura e com *B. cepacia* observou-se a seguinte relação: sacarose>glicose>amido>xilose e amido>xilose>glicose>sacarose (Figura 7 C). A maior liberação de ácidos ocorreu no meio adicionado com glicose (4,98 mg NaOH mL^{-1}) e em seguida com sacarose (3,88 mg NaOH mL^{-1}) no meio inoculado com *A. niger*. (Figura 7 C)

O pH inicial do meio adicionado de xilose, sacarose, glicose e amido diminuiu em média, para 3,76, 4,22, 4,14 e 3,58, respectivamente. Comparando-se o efeito dos microrganismos, verificou-se que o menor valor de pH foi observado no meio adicionado com xilose e inoculado com *A. niger* (1,83) e, em seguida, com a co-cultura (2,18). Com *B. cepacia*, o menor valor de pH foi verificado no meio com amido (3,46) (Figura 8 A).

A quantidade de glicose, xilose e sacarose adicionada ao meio de cultura foi de 12 g C L^{-1} e o amido foi adicionado na concentração de 1 g L^{-1} . Desse modo, a concentração de C no meio com amido não inoculado correspondeu a 43% da concentração observada nos meios com os demais carboidratos. Com base nas médias, verificou-se que o consumo de C decresceu na seguinte ordem: glicose>amido>sacarose>xilose independentemente da fonte de C utilizada. O maior consumo de C foi observado no meio com *A. niger*, seguido da co-cultura e a bactéria (Figura 8 B).

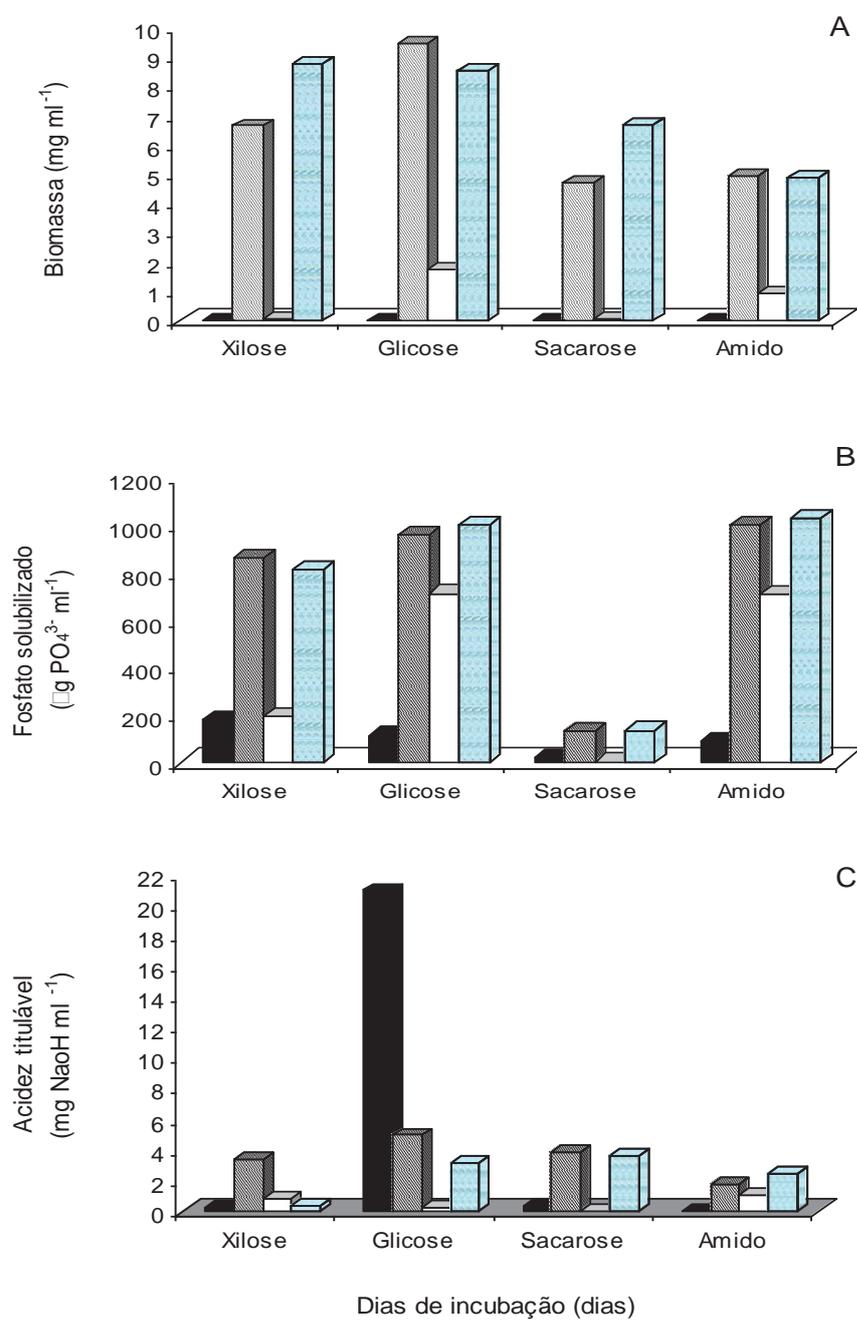


Figura 7. Crescimento (A) , fosfato solubilizado (B) e produção de ácidos (C) por *Aspergillus niger* (▨), *Burkholderia cepacia* (□) e co-cultura (■) em meio com xilose, glicose, sacarose e amido. Meio não inoculado (controle) (■) .

A atividade da fosfatase ácida foi bastante influenciada pela fonte de C como mostra a Figura 8 C. A maior atividade foi observada no meio com amido, em média de 42,14 $\mu\text{g pNP mL}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ biomassa, e decresceu 41% no meio com glicose, 57% com sacarose e 95% com xilose. Maior atividade foi encontrada no meio contendo amido (57,89 $\mu\text{g pNP de h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ biomassa) ou glicose (52,26 $\mu\text{g pNP mL}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ biomassa) crescido com *B. cepacia*, porém, nenhuma atividade foi observada no meio com xilose (Figura 8 C). Em seguida, verificou-se que *A. niger* propiciou maior atividade no meio com amido (41,65 $\mu\text{g pNP mL}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ biomassa) e co-cultura no meio com glicose (30,85 $\mu\text{g pNP mL}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ biomassa).

Efeito da fonte de N

Diversas fontes de N como nitrato de sódio, glicina e ácido glutâmico foram avaliadas sobre o crescimento e a atividade de *A. niger*, *B. cepacia* e da co-cultura (*A. niger* + *B. cepacia*) (Figura 9). Os resultados do cloreto de amônio como fonte de N, anteriormente obtidos foram incluídos para comparação (Figura 9).

A maior quantidade de biomassa foi encontrada no meio com cloreto de amônio e decresceu em média de 20% com nitrato de sódio, 33% com ácido glutâmico e 50% com glicina. Com cloreto de amônio, o maior crescimento foi verificado com o fungo (9,44 mg mL^{-1}) seguido pela co-cultura (8,55 mg mL^{-1}) (Figura 9 A). As demais fontes de N, nitrato de sódio, glicina e ácido glutâmico também estimularam o crescimento da co-cultura assim como aquele observado com o fungo ou a bactéria (Figura 9 A). A fonte de N preferencial da bactéria foi o cloreto de amônio (1,74 mg mL^{-1}). Com as outras fontes de N, o crescimento de *B. cepacia* foi bem inferior e variou de 0,44 a 0,26 mg mL^{-1} .

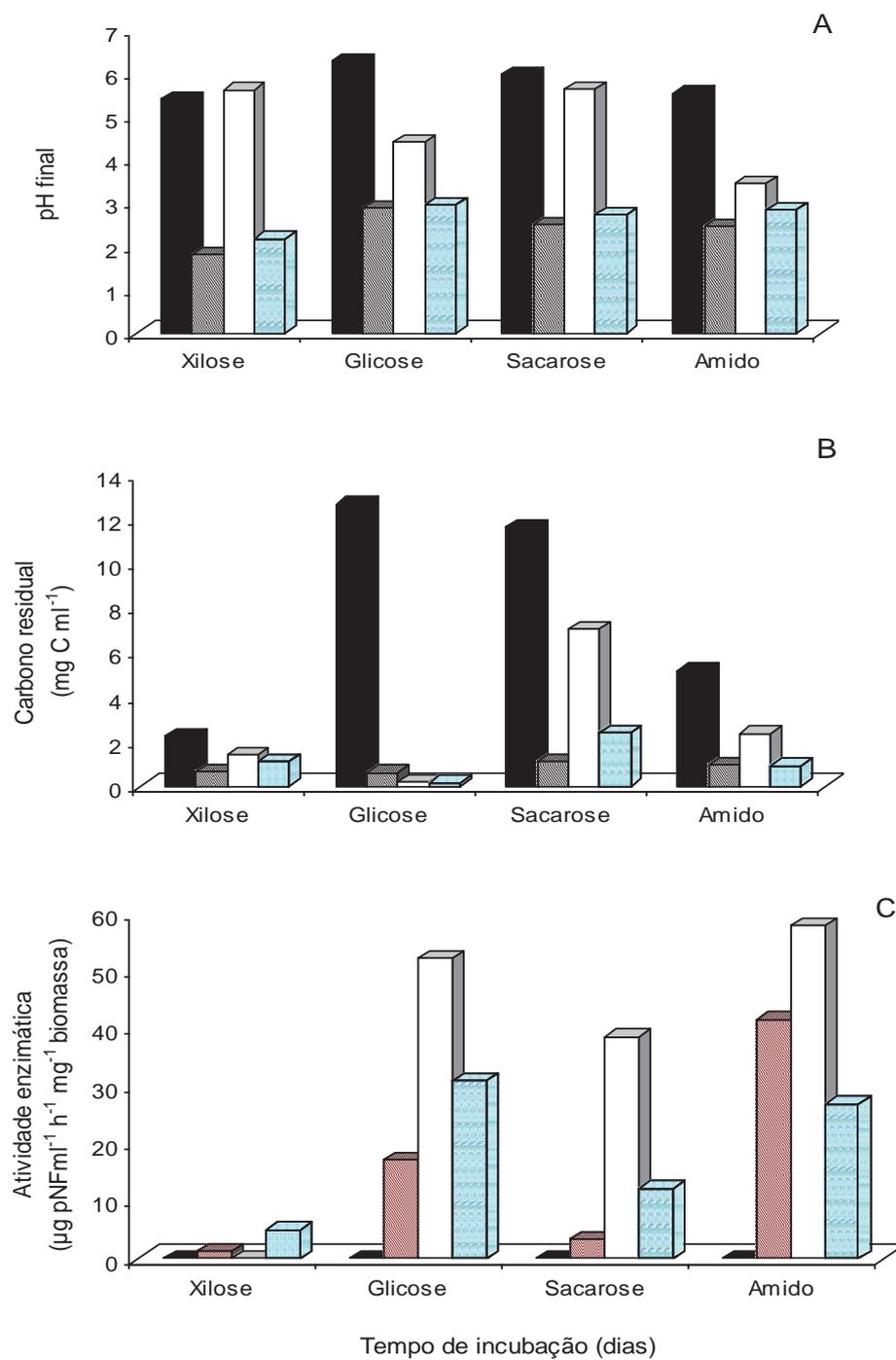


Figura 8. pH final (A), C residual (B) e atividade enzimática (C) de *Aspergillus niger* (▨), *Burkholderia cepacia* (□) e co-cultura (■) em meio com xilose, glicose, sacarose e amido. Meio não inoculado (controle) (■).

A quantidade de fosfato solubilizado variou com a fonte de N e o microrganismo (Figura 9 B). Considerando-se as médias, a concentração de fosfato do meio decresceu na seguinte ordem: ácido glutâmico>nitrato de sódio>cloreto de amônio>glicina. Porém, maior produção de fosfato solúvel foi obtida no meio com ácido glutâmico inoculado com a co-cultura ($1847,04 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$) e com nitrato de sódio inoculado com o fungo ($1677,35 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$) (Figura 9 B). Ainda, com a co-cultura verificou-se a solubilização de fosfato ($1365,09 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$) com glicina. Os microrganismos co-inoculados disponibilizaram o dobro de P do que o fungo e 3,9 vezes mais do que a bactéria.

A produção de ácidos variou em média de $2,11 \text{ mg NaOH mL}^{-1}$ com cloreto de amônio, $2,86 \text{ mg NaOH mL}^{-1}$ com ácido glutâmico, $3,72 \text{ mg NaOH mL}^{-1}$ glicina e $3,92 \text{ mg NaOH mL}^{-1}$ com nitrato de sódio, respectivamente. A maior acidez titulável ($9,36 \text{ mg NaOH mL}^{-1}$) resultante do fungo foi observada no meio com nitrato de sódio (Figura 9 C). A variação da produção de ácidos por efeito da fonte de N diminuiu no meio com o fungo de acordo com a relação: nitrato de sódio>glicina>ácido glutâmico>cloreto de amônio e com a co-cultura. O mesmo se deu na seqüência glicina>nitrato de sódio>ácido glutâmico>cloreto de amônio (Figura 9 C). A produção de ácidos por *B. cepacia* foi nula com ácido glutâmico e baixa com as demais fontes de N (Figura 9 C).

A redução do pH do meio não decresceu acompanhando a produção de ácidos, visto que o pH no meio com cloreto de amônio foi em média de 4,14, com nitrato de sódio de 4,72, com glicina de 4,16 e com ácido glutâmico de 5,26. A maior diminuição do pH foi ocasionada pelo fungo com glicina e nitrato de sódio e o inverso ocorreu com a co-cultura nos meios com glicina e nitrato de sódio (Figura 10 A). Em consequência da baixa produção de ácidos por *B. cepacia*, houve pouca diminuição do pH no meio com glicina (5,39) e cloreto de amônio (4,41). Inclusive, constatou-se alcalinização do meio adicionado de nitrato de sódio e ácido glutâmico (Figura 10 A).

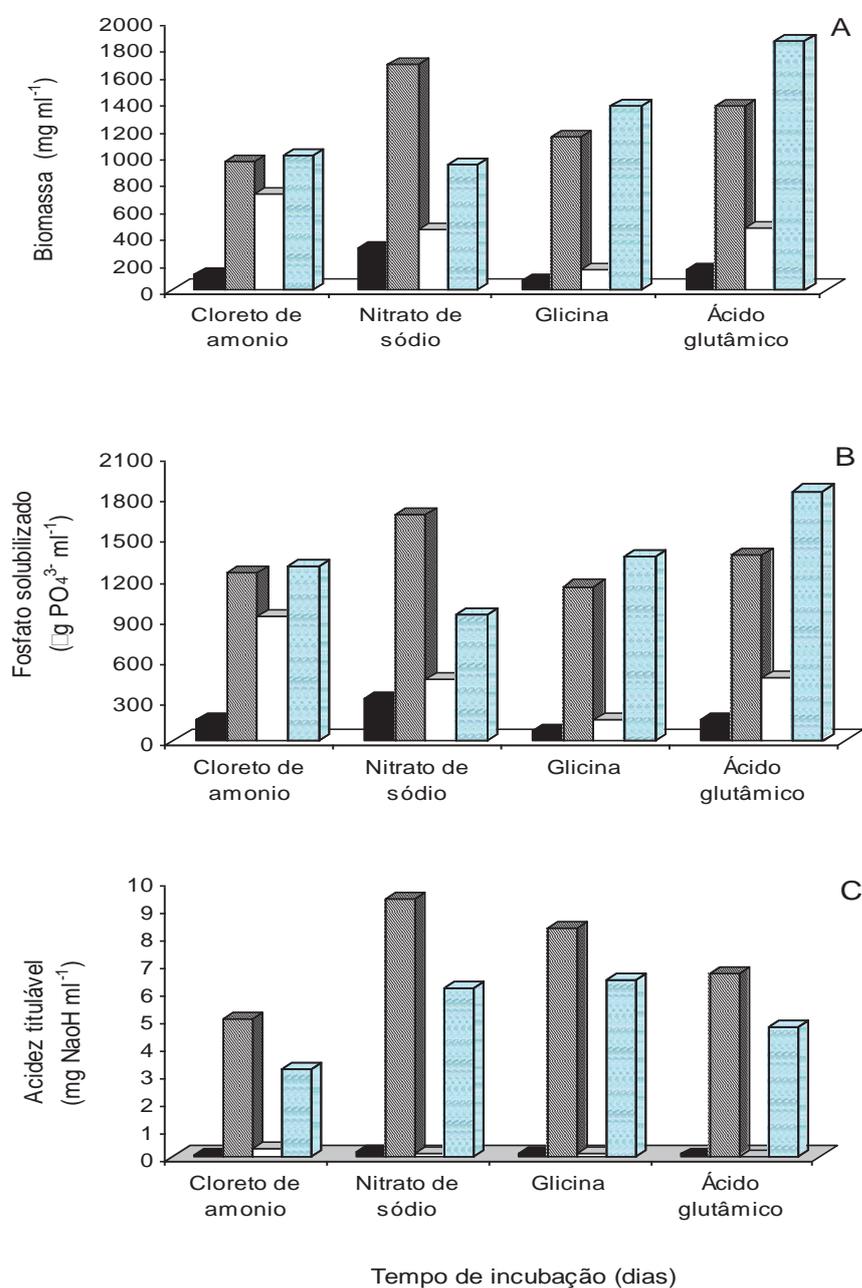


Figura 9. Crescimento (A), fosfato solubilizado (B) e produção de ácidos (C) por *Aspergillus niger* (▨), *Burkholderia cepacia* (□) e co-cultura (▤) em meio com cloreto de amonio, nitrato de sódio, glicina e ácido glutâmico. Meio não inoculado (controle) (■).

O consumo de glicose como fonte de C pelos microrganismos nos meios adicionados de diversas fontes de N pode ser apreciado na Figura 10 B. A menor quantidade de C residual ao final do período de incubação foi observada no meio com cloreto de amônio (média de $3,41 \text{ mg C mL}^{-1}$), seguida de glicina ($5,84 \text{ mg C mL}^{-1}$), ácido glutâmico ($6,05 \text{ mg C mL}^{-1}$) e nitrato de sódio ($6,95 \text{ mg C mL}^{-1}$) (Figura 10 B). O maior consumo de glicose foi verificado no meio inoculado com a co-cultura e em seqüência por *A. niger*. Muito pouca glicose foi consumida por *B. cepacia* por efeito das fontes de N (Figura 10 B).

A atividade da fosfatase ácida dependeu da fonte de N adicionada ao meio de cultura e não seguiu a mesma tendência entre as culturas utilizadas (Figura 10 C). Com *B. cepacia* decresceu na seguinte ordem: glicina>nitrato de sódio>cloreto de amônio>ácido glutâmico (Figura 10 C). Com *A. niger* verificou-se a seguinte resposta: cloreto de amônio>glicina> ácido glutâmico>nitrato de sódio e, com a co-cultura: cloreto de amônio>ácido glutâmico>glicina>nitrato de sódio (Figura 10 C).

A maior atividade foi verificada com *B. cepacia* nos meios com glicina ($195,98 \mu\text{g pNP mL}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ biomassa}$), nitrato de sódio ($67,91 \mu\text{g pNP mL}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ biomassa}$) e cloreto de amônio ($52,26 \mu\text{g pNP mL}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ biomassa}$) (Figura 10 C). A atividade da fosfatase ácida no meio com *A. niger* e a co-cultura foi bem menor do que a observada com *B. cepacia* (Figura 10 C).

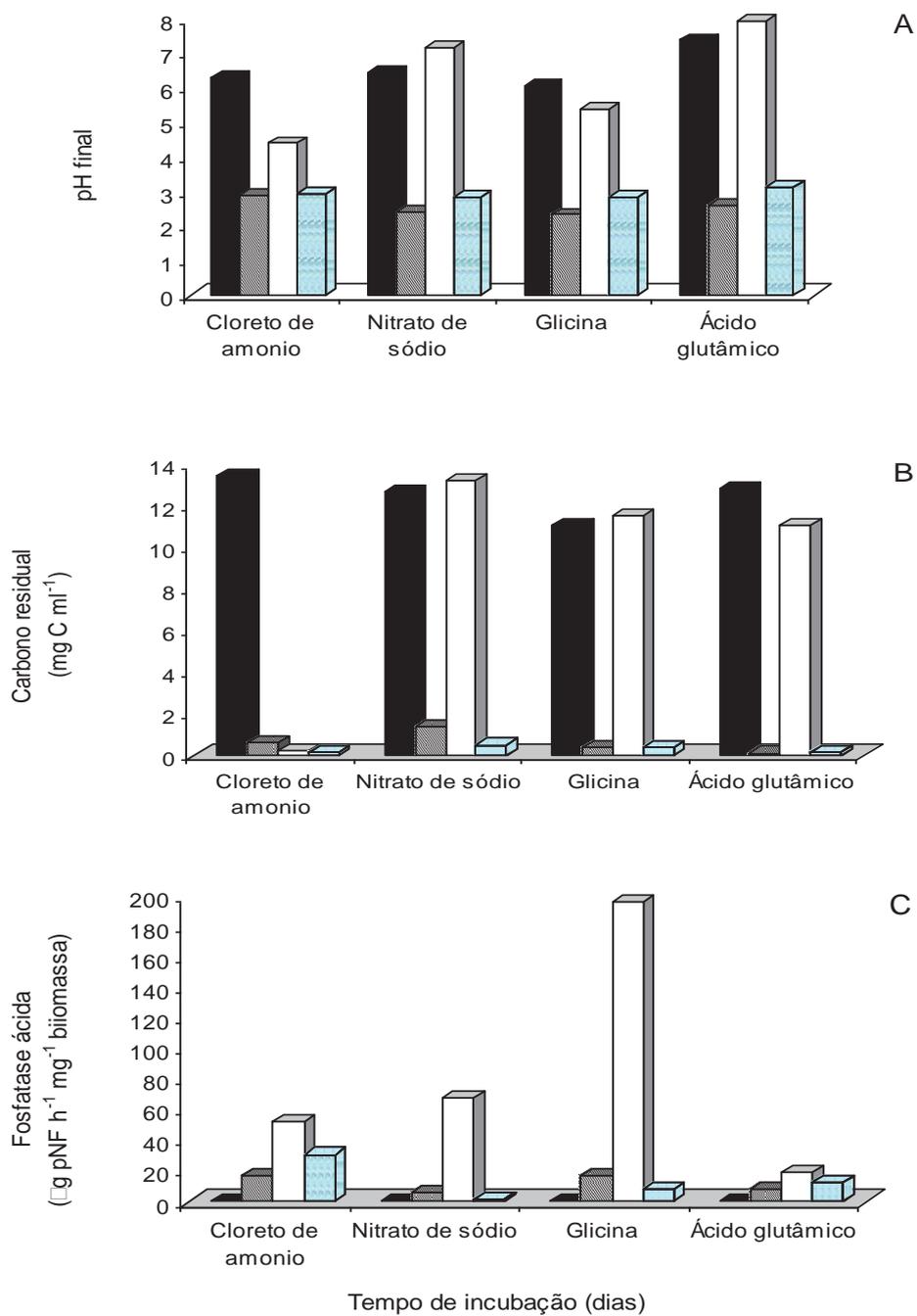


Figura 10. pH final (A), C residual (B) e Atividade enzimática (C) de *Aspergillus niger* (▨), *Burkholderia cepacia* (□) e co-cultura (■) em meio com xilose, glicose, sacarose e amido. Meio não inoculado (controle) (■).

5. DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato da utilização conjunta de dois microrganismos *A. niger* e *B. cepacia* na solubilização dos fosfatos de cálcio (Ca-P), alumínio (Al-P) e ferro (Fe-P). Os resultados apresentados aqui claramente mostram que a inoculação conjunta desses microrganismos é mutuamente benéfica e propicia aumento da quantidade de P solúvel no meio de crescimento que por sua vez, é resultante do efeito da produção de ácidos e diminuição do pH do meio de cultura.

Como era esperado, *B. cepacia* cresceu menos que o fungo, mas a produção de biomassa pela co-cultura foi maior que a dos microrganismos individuais para todas as fontes de fosfato estudadas. De modo geral, tanto as culturas individuais como a co-cultura cresceram rapidamente no período inicial e, em seguida estabilizaram. Essa tendência tem sido constatada por outros autores. Por exemplo, SOUCHIE & ABBOUD (2007), ao compararem 85 isolados de fungos e 46 de bactérias, reportaram que os fungos crescem mais do que bactérias, ainda que estas tenham crescimento inicial mais acelerado. Ao estudar 52 isolados, SILVA FILHO e VIDOR (2000) relataram que com exceção de um fungo todos os demais cresceram mais que 15 isolados de bactérias. GOMES et al. (2010) afirmaram que fosfato de ferro acidifica o meio de cultura comprometendo o crescimento das bactérias. Ao contrário, COLLAVINO et al. (2010) afirmaram que as bactérias solubilizadoras de fosfato crescem bem em condições ácidas. Neste estudo, a bactéria estudada cresceu menos que o fungo e a co-cultura, porém, porém não teve seu crescimento afetado pela diminuição do pH, que ocorreu após 3 dias de incubação.

O maior crescimento da co-cultura pode ser resultante de um efeito mutuamente benéfico entre as culturas individuais. Quantidades pequenas de P solúvel no meio, no período inicial de incubação, podem estimular o crescimento dos microrganismos (EL-AZONI, 2008). Em adição, tem sido verificado que o crescimento tem relação com a solubilização de fosfato (BARROSO & NAHAS, 2008). Portanto, devido a um metabolismo mais acelerado, a bactéria utilizaria mais rapidamente a pequena

quantidade de fosfato disponível, aumentando assim, seu crescimento e influenciando a solubilização do fosfato indisponível, Já a oferta de P solúvel promoveria então o crescimento do fungo.

A fonte de P influi no crescimento dos microrganismos. Assim, *Penicillium rugulosum* cresceu melhor em meio com hidroxiapatita, seguido por Al-P e finalmente Fe-P (REYES et al., 1999). Contrariamente, neste estudo, o fungo *A. niger* e a co-cultura cresceram mais nos meios com Al-P ou Fe-P do que com Ca-P.

Nos estágios iniciais, a concentração de P tende a diminuir, aumentando nos estágios tardios devido a ação do fungo para demanda de nutrientes (Saber et al., 2009). MSF agem de forma distinta dependendo do fosfato a ser solubilizado. Fontes como FePO_4 são menos solubilizados do que outras fontes como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e CaHPO_4 . Mesmo fontes complexas como $\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ são tidas como mais facilmente solubilizadas do que Fe-P pelos MSF (FANKEM et al., 2006; BARROSO et al., 2006; SONG et al., 2008; SABER et al., 2009; COLLAVINO et al., 2010; CHAI et al., 2011). Em acordo com esses autores, a solubilização dos fosfatos decresceu neste estudo na seguinte ordem: Ca-P>Al-P>Fe-P.

Os microrganismos estudados variaram na sua habilidade em solubilizar fosfatos insolúveis. Essa variação tem sido registrada na literatura, como relatado por OLIVEIRA et al. (2009), em que uma espécie do gênero *Burkholderia* se destacou dentre 255 isolados do Bioma Cerrado por ser mais eficiente na solubilização de Ca-P e redução do pH. Outra espécie dentro do mesmo gênero, *Burkholderia cepacia*, apresentou maior solubilização de Al-P juntamente com o fungo *Aspergillus terreus*. SOUCHIE et al. (2005) constataram a superioridade dos isolados de *Aspergillus sp.* na solubilização de AlPO_4 e apatita de Araxá ($3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{CaF}_2$) em relação aos isolados do gênero *Enterobacteriaceae*. Neste estudo, de modo geral, a quantidade de fosfato solubilizada variou na seguinte seqüência: co-cultura>fungo>bactéria.

A solubilização de fosfato por *A. niger* e *B. cepacia* foi previamente relatada como sendo de $1394 \text{ mg P}_2\text{O}_5 \text{ mL}^{-1}$ (RINU & PANDEY, 2010) e $200 \text{ mg P}_2\text{O}_5 \text{ mL}^{-1}$ (LIN et al 2006) ou $346 \text{ mg P}_2\text{O}_5 \text{ mL}^{-1}$ (SONG et al., 2008), respectivamente. A quantidade de Ca-P solubilizado no dia 9º dia por *B. cepacia* foi de $857,06 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$ e por *A.*

niger foi 1007,49 $\mu\text{g PO}_4^{3-}\text{mL}^{-1}$. Estes resultados demonstram que ambos os microrganismos foram altamente eficientes com E.S. de 78 e 91%, respectivamente. Resultados anteriores demonstraram ES por *A. niger* variando de 42% (VASSILEVA et al., 1998), 47% (RINU & PANDEY 2010) e 54% (OMAR, 1998). No entanto, nossos resultados mostraram que a co-cultura *A. niger* + *B. cepacia* solubilizou 1.103,64 $\mu\text{g PO}_4^{3-}\text{mL}^{-1}$ com ES de 100%, superior à obtida pelas culturas individuais.

A quantidade de Al-P e Fe-P solubilizada pela co-cultura foi também maior que as culturas individuais, embora em menor proporção do que com Ca-P. Uma hipótese plausível é que o sinergismo entre o fungo e a bactéria podem ter estimulado o crescimento e favorecido a solubilização dos fosfatos estudados. A eficiência MSF co-cultivados, dispondo P solúvel no meio com maior percentual para Ca-P, seguido por Al-P e Fe-P coincide com o resultado observado por ASOK & JISHA (2006) ao inocularem *Penicillium sp.* e *Bacillus sp.* verificaram que a combinação liberou maiores quantidade de P.

Embora vários mecanismos sejam utilizados, parece claro que a solubilização de fosfato pelo fungo, pela bactéria ou a associação de ambos seja atribuída à produção de ácidos e ao decréscimo do pH. Esta resposta tem sido confirmada por vários autores (VASSILEV et al., 2007; EL-AZONI, 2008; SONG et al., 2008; KANG et al., 2008; PARK et al., 2010). Além disso, pode-se concluir, com base nos resultados obtidos neste estudo, que diferenças na taxa de crescimento devem ter influenciado a produção de ácido, a redução do pH e, conseqüentemente, a solubilização do fosfato.

O efeito da acidez sobre a disponibilidade de P foi também observada por IVANOVA (2006) ao estudar bactérias *Erwinia sp.* e *Azotobacter sp.* que solubilizam fosfato de rocha. Outros autores também apontam a produção de ácidos orgânicos como responsáveis pela solubilização de fosfato (EL-AZONI, 2008; GOMES et al., 2010).

O aumento da produção de ácidos acompanhou o crescimento dos microrganismos, isto é, foi verificada acentuada secreção de ácidos no início do período de incubação e depois recrudescimento. A secreção de ácidos foi sempre maior na co-cultura do que a soma das culturas individuais nos meios com Al-P e Fe-P. Esta

tendência foi observada no meio com Ca-P no 3º dia de incubação. Em geral, no meio crescido com a bactéria a quantidade de ácidos produzida foi menor do que a verificada no meio com *A. niger*.

As quantidades de ácidos produzidas pelos microrganismos dependem da fonte de P utilizada. Isso foi observado com *A. niger* quando cultivado sob diferentes condições de meio, houve maior produção de ácidos e redução do pH com AlPO_4 , em comparação a CaPO_4 (BARROSO & NAHAS, 2006). BARDIYA & GAUR (1974) sugeriram que a natureza dos ácidos orgânicos produzidos é mais importante que a quantidade total de ácido. Porém, GYANEHWAR et al. (1998) relataram que, tanto o tipo como a quantidade de ácido, têm efeito sobre a solubilização de P. Vários ácidos produzidos por diferentes culturas poderiam potencialmente influenciar a solubilização de fosfatos. De acordo com LIN et al. (2006), *B. cepacia* CC-A174 secretou ácido glucônico e 2-ceto-ácido glucônico. Níveis significativos dos ácidos glicólico, oxaloacético, succínico, fumárico, málico, tartárico, cítrico foram produzidos por *A. niger* durante o processo de compostagem de palha com fosfato de rocha (SING & AMBERGER, 1991). No entanto, deve-se reconhecer também que a produção e secreção de ácidos orgânicos por qualquer microrganismo está relacionada ao fornecimento de nutrientes e à atividade metabólica correspondente do ciclo TCA (GALLMETZER & BURGSTALLER, 2002).

A quantidade e a natureza do ácido produzido pelo co-cultura e sua relação com a solubilização do fosfato são ainda desconhecidas. Segundo IVANOVA et al. (2006), a habilidade do microrganismo em solubilizar fosfato não está relacionada simplesmente com a produção de ácidos orgânicos, mas com a natureza do ácido orgânico produzido.

Enquanto a diminuição do pH pela bactéria variou de 3,8 a 5,0, a redução do pH causada pelo fungo (pH 2,0-3,4) foi semelhante a da co-cultura (pH 2,3 - 3,7). Análise quantitativa em *A. niger* mostrou que a redução drástica do pH interfere na dissolução de fosfato tricálcico e na concentração de fosfato solúvel (VASQUEZ, 2000; LIN et al., 2006). Desta forma, ainda que haja correspondência entre a diminuição do pH com a quantidade de fosfato disponível (IVANOVA, 2006) esta redução não é tão acentuada quanto nos fungos (MULLAN et al., 2002; SOUCHIE et al., 2007).

Resultados anteriores mostraram uma diminuição no pH 7,0 para 3,0 durante o crescimento de *B. cepacia* DA23 (LIN et al., 2006). Estudos com *B. cepacia* apontam que houve correlação inversa entre o pH do meio e a concentração de P, indicando que houve produção de ácidos orgânicos pela bactéria (CHEN et al., 2006; PARK et al., 2010). Da mesma maneira, o pH do meio reduziu de 5,8-6,0 para 3,6-3,7 durante o crescimento de *A. niger* (VASSILEVA et al., 1998).

A maior diminuição no pH ocorreu no meio com Fe-P (médias de 3,4 a 4,8), seguida de Al-P (3,7 a 4,8) e Ca-P (4,0 a 5,1). Sugere-se que a menor solubilização de Fe-P em comparação às fontes testadas apesar da maior redução no pH se deva ao fato da solubilização não depende exclusivamente da acidificação que resultou na queda do pH (FANKEM et al., 2006). O maior índice de pH observado em Ca-P está de acordo com os resultados obtidos por SONG et al. (2008) ao inocularem *B. cepacia* com fosfato tricálcico, hidroxiapatita e fosfato de alumínio, observando-se que o maior pH do meio ocorreu com Ca-P em comparação às demais fontes.

Em meio adicionado de fosfato tricálcico, *A. niger* propiciou a redução do pH inicial de 7,4 para 4,94, (OGBO, 2010) e *B. cepacia* de 7,0 para 4,23 (SONG et al., 2008). Ao ser cultivada em meio com Ca_3PO_4 , a bactéria *B. cepacia* reduziu pouco o pH comparado com hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e fosfato de alumínio (SONG et al., 2008). Quando os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium italicum* foram comparados em meio de cultura com Ca_3PO_4 , o menor índice de pH foi registrado com *A. niger* (2,5) enquanto que *Penicillium italicum* registrou pH final 3,5 (SABER et al., 2009). Em outro estudo, PRADHAM & SUKLA (2006) também registraram maior queda de pH com *Aspergillus sp.* (7,0 para 4,0) em relação a *Penicillium sp.* (7,0 para 4,7).

Apesar da correspondência entre o pH e a solubilização de fosfato ter sido sensivelmente menor no meio com *B. cepacia* nas três fontes de P, em comparação ao fungo e a co-cultura, todas as culturas apontaram relação negativa e significativa entre a redução do pH e a liberação de fosfato de Ca e Al. Semelhantemente ao que foi verificados em *Aspergillus* (RINU & PANDEY, 2010), *B. cepacia* (SONG et al., 2008) e *Bacillus sp* (WANI et al., 2007).

Redução considerável da concentração de glicose, utilizada como fonte de C, foi observada no meio de cultura adicionado de Ca-P e inoculado com a co-cultura. Presumivelmente, a absorção de glicose pode levar à acidificação do meio, efeito observado em todas as culturas, resultando na diminuição no pH, conforme observado nos meios com Ca-P e Al-P. A quantidade de C no meio de cultura parece não afetar a quantidade de P liberado, porém, tende a afetar o crescimento dos microrganismos (REDDY et al., 2002). Este resultado foi observado nas culturas e fontes de P testadas, haja vista, que com o decorrer do tempo, a menor oferta de C coincidiu com a estabilização no crescimento dos microrganismos, inclusive com redução na biomassa da co-cultura com Al-P, no último período de avaliação.

O efeito da concentração de fosfato no meio de cultura sobre a atividade da fosfatase foi relatado anteriormente em fungos (KANG et al., 2008; RINU & PANDEY, 2010; OGBO, 2010) e bactérias (RAMALINGAM & PRASANNA, 2006). Atividade da fosfatase ácida está sob o controle de um mecanismo regulador de repressão e desrepressão sendo regulado pela concentração de fosfato (NAHAS & ASSIS, 1992).

Neste estudo, observou-se que o mecanismo de regulação teve impacto maior em *B. cepacia* do que em *A. niger* ou na co-cultura. Presumivelmente, o reduzido efeito deste mecanismo regulador na co-cultura foi devido à presença dominante do fungo *A. niger*. A exceção ocorreu com *A. niger* em Al-P onde não houve correspondência entre a concentração de fosfato e a atividade de fosfatase ácida, possivelmente devido a níveis insuficientes de fosfato alcançado para mediar a repressão completa da enzima. Outra possibilidade é devido a diminuição da atividade da fosfatase ácida ter sido constatada ao final do período de incubação. Respostas semelhantes foram obtidos em meios inoculados com *Aspergillus* sp PS-104 (KANG et al., 2008) e *A. niger* (OGBO, 2010), onde a atividade da fosfatase aumentou inicialmente e, posteriormente, manteve-se relativamente constante durante o período de incubação restante.

Efeito da fonte de C e N

B. cepacia e *A. niger* são microrganismos heterotróficos que dependem de uma fonte de C e energia para seu crescimento e atividade. Relatos anteriores mostraram o efeito de fontes de C e N sobre o crescimento e solubilização por diferentes microrganismos em culturas individuais (PRADHAN & SUKLA, 2006; SHARAN et al., 2008; PAWAR & THAKER, 2009), mas não em co-cultura.

Dentre as fontes de C utilizadas, as que propiciaram maior crescimento ao fungo e à co-cultura foram glicose e xilose, respectivamente. Assim como este resultado, glicose estimulou o crescimento de *Aspergillus tubingensis* e cinco mutantes, sendo a melhor fonte de C quando comparada à outras seis fontes testadas (RELWANI et al., 2008). Segundo KHELIF et al. (2009), a glicose, como fonte de C prontamente disponível, mesmo em pequenas quantidades, potencializou o crescimento de *Aspergillus alliaceus*.

Assim como o fungo, *B. cepacia* apresentou maior crescimento primeiramente com glicose, seguido por amido. O mesmo resultado foi relatado com *Xanthomonas campestris* crescidas. Com oito fontes diferentes de C, sendo a glicose a melhor fonte utilizada (SHARAN et al., 2008).

A solubilização de Ca-P sob as quatro fontes de C testadas foi maior com glicose seguido por amido tanto com a co-cultura quanto com o fungo. Para CHAI et al. (2011), em estudo com *Penicillium* sp. glicose foi a fonte com maior influência sobre a solubilização de fosfato tricálcico. ILLMER & SCHINNER (1992) relataram que *Penicillium* sp e *Pseudomonas* sp solubilizaram fosfato de rocha em maior quantidade com glicose e amido. Semelhantemente, *Paecilomyces marquandii* utilizou glicose e amido como as principais fontes de C para solubilização de seis fontes de P (AHUJA et al., 2007). Glicose também foi relatada como a melhor de cinco fontes diferentes de C testadas, promovendo a maior solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (PRADHAN & SUKLA, 2006). Estudo com *Aspergillus niger* isolado de minas de fosfato apontou amido como a melhor fonte para a solubilização de fosfato de rocha (LI et al., 2011). Outro fungo reconhecidamente solubilizador, *Aspergillus tubingensis* e quatro mutantes solubilizaram fosfato tricálcico utilizando glicose com maior influência sobre a liberação de P em comparação à outras quatro fontes avaliadas (RELWANI et al., 2008).

Com *B. cepacia*, glicose e xilose foram as fontes de C que maior efeito tiveram sobre a solubilização de P. Quando quatro isolados bacterianos da rizosfera das culturas *Triticum aestivum* e *Medicago sativa* foram avaliadas em meio líquido, três desses utilizaram glicose e sacarose para solubilizar as maiores quantidades de fosfato de rocha (FENG et al., 2009). Confirmando ser esta uma das fontes preferenciais para solubilização de fosfato por bactérias. O fato do amido ter sido a segunda melhor fonte para o crescimento e não ter proporcionado a maior solubilização foi explicado por SHARAN et al. (2008) segundo os quais nem sempre as fontes que interferiram no crescimento afetaram efetivamente a solubilização de P. Neste estudo, sacarose foi a fonte de C que menos promoveu a solubilização. O mesmo foi relatado por AHUJA et al. (2007) ao estudar o fungo *Paecilomyces marquandii* incubado com nove fontes diferentes de C.

Por conseguinte, o fungo deve utilizar diferentes mecanismos para solubilizar fosfatos inorgânicos que dependem, como ficou claro neste trabalho, da produção de ácidos e da diminuição do pH. Diversos fatores físicos e químicos são necessários para a solubilização de fosfatos e fontes de C e N influenciam a produção de ácidos orgânicos que afetam a solubilização (DAVE & PATEL, 2003). Portanto, a quantidade de ácidos produzidos e a diminuição do pH do meio de cultura dependem da produção de micélio e acarretam, como conseqüência, a solubilização de diferentes quantidades de CaHPO_4 (Ca-P), de AlPO_4 (Al-P) de FePO_4 (Fe-P) (AHUJA et al., 2007; SHARAN et al., 2008).

A produção de ácidos orgânicos foi maior com sacarose seguido por glicose quando os MSF foram co-inoculados. Com o fungo, as fontes mais expressivas foram glicose e sacarose. Estes resultados estão de acordo com o que foi relatado por BARROSO & NAHAS (2006), quando glicose e sacarose foram relatadas como as fontes que mais estimularam a produção de ácidos por *A. niger*. Segundo XU et al. (1989), glicose está entre os açúcares que mais favorecem a produção de ácido por *Aspergillus niger*. O menor valor de pH com a co-cultura e o fungo foi observado no meio com xilose e depois com amido. Assim como neste estudo, BARROSO & NAHAS

(2006) relataram que xilose está entre as fontes que mais reduziram o pH do meio com *A. niger*.

A glicose foi a fonte comum utilizada pelos MSF na acidificação do meio. Em meio com *B. cepacia*, a maior liberação de ácidos ocorreu com xilose seguida por glicose. No entanto, a maior redução do pH foi observada com glicose. Com *Xanthomonas campestris*, glicose foi a fonte que promoveu maior queda no pH ao ser comparada com oito fontes de C (SHARAN et al., 2008).

Como consequência do crescimento das culturas, as menores quantidades de C residual foram encontradas nos meios com glicose seguida de amido, tanto para a co-cultura quanto para os microrganismos crescidos individualmente. KHELIF et al. (2009) relataram que *Aspergillus alliaceus* consumiu e cresceu em fonte de C prontamente disponível nos estágios iniciais.

Ao serem as fontes de N comparadas, o maior crescimento foi observado com cloreto de amônio como fonte de N, seguido por nitrato de sódio para a co-cultura e ácido glutâmico para as culturas individuais. O mesmo resultado foi observado por BARROSO et al. (2006) avaliando *A. niger* com diferentes fontes de N. O crescimento do fungo *Diplocarpon mali* foi maior com peptona e nitrato de sódio, a segunda melhor fonte (ZHAO et al., 2010) apontando a diversidade dos microrganismos quanto às fontes utilizadas para crescimento.

De forma geral, as fontes de N que mais favoreceram a solubilização de Ca-P foram o ácido glutâmico e cloreto de amônio. Esta resposta foi verificada na literatura, mostrando que fontes amoniacais favoreceram a solubilização de fosfatos. Estudo com *A. niger* indicou que as fontes amoniacais propiciaram maior solubilização de fluorapatita (CEREZINE et al., 1988). Quando *Aspergillus sp* e *Penicillium sp* foram avaliados em meios com fontes distintas de N, a fonte amoniacal $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ foi que mais estimulou a solubilização (PRADHAN & SUKLA, 2006).

O efeito da fonte de N sobre a solubilização de Ca-P decresceu na seguinte ordem: nitrato de sódio < ácido glutâmico < cloreto de amônio. Resposta contrária foi relatada por BARROSO et al. (2006) apontando glicina e cloreto de amônio como as melhores fontes em relação nitrato de sódio com *Aspergillus niger*. Outro fungo

solubilizador, *Aspergillus tubingensis* e cinco mutantes foram mais influenciados por nitrato de potássio na solubilização de fosfato tricálcico (RELWANI et al., 2008). Segundo DIXON-HARDY et al. (1998) diversas espécies de fungos podem utilizar tanto fontes de amônio quanto nitrato. Assim, *A. niger* solubilizou fosfato de cobre e zinco, assim como óxidos de zinco utilizando ambas as fontes de N. Em contrapartida, estudo com outra espécie fúngica, *Paecilomyces marquandii*, mostraram que a espécie solubilizou maior quantidade de P utilizando sais de amônio, enquanto que nitrato de sódio foi citada ser a quarta fonte com maior influencia sobre a atividade solubilizadora do fungo (AHUJA et al., 2007).

A atividade solubilizadora de *B. cepacia* foi maior com cloreto de amônio e ácido glutâmico. Tais resultados foram encontrados por FENG et al. (2009) ao estudar quatro isolados bacterianos que solubilizaram as maiores quantidades de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ quando o meio foi suplementado com fontes amoniacais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NH_4NO_3 .

Tanto para a co-cultura quanto para o fungo, as fontes nitrogenadas que mais estimularam a produção de ácidos e redução do pH foram a glicina seguida por nitrato de sódio, assim como foram as que mais reduziram o pH. Segundo RELWANI et al. (2008), fungos acidificam o meio durante o crescimento, porém, esta acidez depende da fonte de N utilizada. LAPEYRIE (1991) sugere que a absorção NO_3^- pela célula estimularia a secreção de ácidos para compensar o potencial iônico celular.

Resposta contrária foi verificada com *Aspergillus sp* e *Penicillium sp* que apresentaram a maior queda no pH utilizando uma fonte amoniacal $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ (PRADHAN & SUKLA, 2006). Do mesmo modo, com *Aspergillus niger*, o menor valor de pH ocorreu com outro fonte contendo amônio (NH_4Cl) (BARROSO et al., 2006). A acidificação do meio bem como redução do pH com *B. cepacia* foram mais expressivos com cloreto de amônio, assim como a solubilização de fosfato foi maior para a bactéria utilizando esta fonte de N. A troca de prótons na presença de íons amônio favorece a produção de ácidos orgânicos e acelera a solubilização de P (AHUJA et al., 2007).

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, conclui-se que, o maior crescimento ocorreu com FePO_4 . Por outro lado, com CaHPO_4 houve a maior solubilização de fosfato acompanhada pelo maior consumo de C e atividade enzimática. Contudo, foi com AlPO_4 que ocorreu mais alta acidez e redução do pH.

A co-cultura cresceu e solubilizou P em maior quantidade, liberando mais ácidos e assimilando mais C com Al-P e Fe-P, além de apresentar a maior atividade enzimática com Al-P. *Aspergillus niger* apresentou a maior redução do pH e a maior liberação de ácidos com Ca-P, enquanto que a bactéria foi mais efetiva na síntese de fosfatase ácida com duas das três fontes de P testadas (Ca-P e Fe-P).

Entre as fontes de C, o maior crescimento e produção de ácidos ocorreu com glicose. A atividade solubilizadora e síntese de fosfatase ácida foi mais influenciada por amido que também proporcionou a maior redução do pH. Xilose, no entanto, foi a fonte mais consumida.

Ao avaliar os microrganismos, independente da fonte utilizada no meio de cultura, viu-se que o maior crescimento e solubilização ocorreu com a co-cultura, enquanto que a maior acidez, redução do pH e consumo de açúcar foi com *Aspergillus niger*. *Burkholderia cepacia*, no entanto, mostrou a maior atividade de fosfatase ácida.

Com as fontes de N, conclui-se que o maior crescimento, redução do pH e consumo de C ocorreu com cloreto de amônio. A maior solubilização deu-se com ácido glutâmico, enquanto que a acidificação do meio foi maior com nitrato de sódio. Glicina foi a fonte que influenciou a mais alta síntese enzimática.

Considerando os microrganismos, sem discriminar as fontes de N em estudo, notou-se que o maior crescimento, solubilização de P e consumo de açúcar foram realizadas pela co-cultura. O fungo produziu a maior quantidade de ácidos resultando na maior redução do pH do meio. Semelhantemente às fontes de açúcar, a atividade enzimática mais expressiva ocorreu com *B. cepacia*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHAL VARENYAM.; SAVANT V. V. ; SUDHAKARA REDDY M.; Phosphate solubilization by a wild type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus tubingensis*. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 39, n 2, p. 695-699, 2007.

AHUJA, A.; GHOSH, S.B.; SOUZA, S.F. D. Isolation of a starch utilizing, phosphate solubilizing fungus on buffered medium and its characterization. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3408–3411, 2007.

AMES, B. N. Assay of inorganic phosphate and phosphatases. **Methods Enzymol.**, v.8, p.115-116, 1966.

AON M. A.; CABELLO, M. N. ; SARENA, D. E. ; COLANERI, A. C.; FRANCO, M. G.; BURGOS, J. L. ; CORTASSA, S. I. Spatio-temporal patterns of soil microbial and enzymatic activities in an agricultural soil. **Applied Soil Ecology**, v. 18, n. 3, p. 239-254. 2001.

ARRIAGA, S.;REVAH, S. Removal of n-hexane by *Fusarium solani* with a gas-phase biofilter. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v.32, p. 548–553, 2005.

ARTURSSON, V.; FINLAY, R.D.; JANSSON, J.K. Interaction between arbuscular micorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2006.

ASKARY, M.; MOSTAJERAN, A.; AMOOAGHAEI, R.; MOSTAJERAN, M. Influence of the Co-inoculation *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium meliloti* plus 2,4-D on Grain Yield and N, P, K Content of *Triticum aestivum* (Cv. Baccros and Mahdavi).

American-Eurasian Journal Agriculture & Environmental Science, v.5, n.3, p. 296-307, 2009

ASOK, A.K.; JISHA, M.S. Role of phosphate solubilizers as bio fertilizer and anti fungal agent. **Pollution Research**, v. 25, n. 3, p. 515-518, 2006.

BARDIYA, M. C. AND GAUR, A. C. (1974) Isolation and screening of microorganisms dissolving low-grade rock phosphate. **Folia Microbiology**, v.19, 386–389.

BARROSO, C. B. Solubilização microbiana de fosfatos de ferro e de alumínio. 2002. 84 f. Dissertação (Mestre em Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP, 2002. 84f.

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

BARROSO, C.B.; PEREIRA, G.T.; NAHAS, E. Solubilization of CaHPO₄ and AlPO₄ by *Aspergillus niger* in culture media with different carbon and nitrogen sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 434-438, 2006.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilization of hardly soluble iron and aluminum phosphates by the fungus *Aspergillus niger* in the soil. **Development in Plant and Soil Sciences**, v. 102, p. 193-198, 2007.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 4, p.529-535, 2008.

BASHAN, Y. HOLGUIN, G. Azospirillum- plant relationships: environmental and physiological advances. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 103-121, 1997.

BATJES, N.H. A world data set of derived soil properties by FAO-UNESCO soil unit for global modelling. **Soil Use Manage**, v. 13, p. 9-16, 1997.

BURNETT, G.W.; PELCZAR Jr., M.J. & CONN, H.J. Preparation of media. In: SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS. Manual of microbiological methods. McGraw-Hill Book Company, 315p, 1957.

ÇAKMAKÇI, R.; DÖNMEZ, M.F.; ERTÜRK, Y.; ERAT, M.; HAZNEDAR, A.; SEKBAN, R. Diversity and metabolic potencial of culturable bacteria from the rhizosphere of Turkish tea grown in acidic soils. **Plant and Soil**, v. 332, p. 299-318, 2010.

CAMACHO, M.; SANTAMARÍA, C.; TEMPRANO, F.; RODRIGUEZ-NAVARRO, D.N.; DAZA, A. Co-inoculation with *Bacillus* sp. CECT 450 improves nodulation in *Phaseolus vulgaris* L. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 11, p.1058-1062, 2001.

CARPENTER-BOGGS, L.; STAHL, P.D. ; LINDSTROM, M.J; SCHUMACHER, T.E. Soil microbial properties under permanent grass, conventional tillage, and no-till management in South Dakota. *Soil and Tillage Research*. v. 71, p. 15-23. 2003.

CEREZINE, P. C.; NAHAS, E.; BANZATTO, D. A. Soluble phosphate accumulation by *Aspergillus niger* from fluorapatite. *Applied and Microbiology Biotechnology*, v.29, p.501-505, 1988.

CHAI, B.; WU, Y.; LIU, P.; LIU, B. ; GAO, M. Isolation and phosphate-solubilizing ability of a fungus, *Penicillium* sp. From soil of an alum mine. **Journal of Basic Microbiology**, v. 51, p. 5-14, 2011.

CHAIHARN, M; LUMYONG, S. Phosphate solubilization potential and stress tolerance of rhizobacteria from rice soil in Northern Thailand. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 2, 305-314, 2009.

CHEN, Y.P.; REKLA, P.D.; ARUNSHEN, A.B.; LAI, W.A.; YOUNG, C.C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**, v. 34, p. 33-41, 2006.

CHUANG, C.-C., KUO, Y.-L., CHAO, C.-C., CHAO, W.-L. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 43, n. 5, p. 575-584, 2007.

CONYE, T; VANDAMME, P.; GOVAN, J. R. W.; LIPUMA, J. J. Taxonomy and Identification of the *Burkholderia cepacia* Complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3427-3436, 2001.

COLLAVINO, M.N.; SANSBERRO, P.A.; MIROGINSKI, L.A.; ASGUILAR, O.M. Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. **Biology and Fertility of Soils**, v. 46, 727-738, 2010.

CUNNINGHAM, J. E.; KUIACK, C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 5, p.1451-1458, 1992.

DAVE, A.; PATEL, H.H. Impact of different carbon and nitrogen sources on phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1; p. 33-36, 2003.

DECHEN, A. R.; NACHTIGALL, G. R. Elementos requeridos à nutrição de plantas. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. eds. Fertilidade do Solo. Viçosa-MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p.91-132.

DEMIREL, G.; YAYKASH, K. O.; YASAR A. The production of citric acid by using immobilized *Aspergillus niger* A9 and investigations of its various effects. **Food Chemistry**, v. 89, p.393-396, 2005.

DIXON-HARDY, J.E., KARAMUSHKA, V.I., GRUZINA, T.G., NIKOVSKA, G.N., SAYER, J.A., GADD, G.M. Influence of the carbon, nitrogen, and phosphorus source on the solubilization of insoluble metal compounds by *Aspergillus niger*. **Mycological Research**, v.102, n.9, p. 1050-1054, 1998.

DUBEY, S. K. Co-inoculation of phosphorus solubilizing bacteria with *Bradyrhizobium japonicum* to increase phosphate availability to rainfed soybean on vertisol. **Journal Indian Society Soil Science**, v. 45, p. 506–509, 1997.

EL-AZONI, I. M. Effect of phosphate solubilizing fungi on growth and nutrient uptake of soybean (*Glycine max* L.) plants. **Journal of Applied Science Research**, v. 4, p. 592 – 598, 2008.

FANKEM, H.; NWAGA, D.; DEUBEL, A.; DIENGE, L.; MERBACH, W. ETOA, F. X. Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elacis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 4, p. 2450-2460, 2006.

FENG, R.; YAO, T.; ZHOU, W.; LONG, R. Effects of different habitats and insoluble phosphates on phosphate solubilizing activity of four phosphate solubilizing bacteria. **Chinese Journal Applied Environmental Biology**, v. 15, n. 6, 856-860, 2009.

GALLMETZER, M. AND BURGSTALLER, W. Efflux of organic acids in *Penicillium simplicissimum* is an energy spilling process adjusting the catabolic flow to nutrient supply and activity of catabolic pathways. **Microbiology**, v. 148, p.1143-1149, 2002.

GATIBONI, L.C. Disponibilidade de formas de P do solo às plantas. 2003. 247 f. Tese (Doutor em Biodinâmica dos Solos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 2003. 247 f.

GOMES, E.A.; SILVA, U.C., LANA, G.P.; MARRIEL, I.E. Avaliação do potencial de solubilização de fosfato de ferro in vitro por fungos e bactérias do solo. **XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, Goiania, GO. CD-Rom, 2010.

GYANESHWAR, P.; NARESH KUMAR, G.; PAREKH, L.J. Effect of buffering on the phosphate-solubilizing ability of microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. V. 14, n. 5, p. 669-673, 1998.

ILLMER, P.; SCHINNER, F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 24, p.389-395, 1992.

IVANOVA, R.; BOJINOVA, D.; NEDIALKOVA, K. Rock phosphate solubilization by soil bacteria. **Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy**, vol. 41, n. 3, 297-302, 2006.

KANG, S.C.; PANDEY, P.; KHILLON, R.; MAHESHWARI, D.K. Process of rock phosphate solubilization by *Aspergillus* sp PS 104 in soil amended medium. **Journal of Environmental Biology**, v.29, p. 743-746, 2008.

KHELIFI, E., AYED, L., BOUALLAGUI, H., TOUHAMI, Y., HAMDY, M. Effect of nitrogen and carbon sources on Indigo and Congo red decolourization by *Aspergillus alliaceus* strain 121C. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, n.2-3, p. 1056-1062, 2009.

LAPEYRIE, F.; RANGER, J. & VAIRELLES, D. Phosphate solubilizing activity of ectomycorrhizal fungi *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 342-346, 1991.

LI, L.; QUI, S. Effect of different carbon sources on phosphate-solubilizing fungi isolated from phosphate mines. International conference on computer distributed control and intelligent environmental monitoring, 1124-1127, 2011.

LIDE, D.R.; FREDERIKSE, H.P.R.(Ed.). CRC handbook of chemistry and physics. Boca Raton: CRC, 1998. não pag.

LIN, T.F.; HUANG, H.I.; SHEN, F. T.; YOUNG, C.C. The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 957 – 960, 2006.

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P.; GOMES, A.M.A., NASCIMENTO, A.R.P.; DONATO, V.M.T.S. Importancia de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 1, p. 89-11, 2004.

MEDVEDFEF, M.G., et al. Comparación in vitro de la acción fungicida de solución saturada de azúcar y nitrato de econaxol. **Ars Pharmaceutica**, v. 42, p. 203-207, 2001.

MINHONI, M.T.; CARDOSO, E.J.B.N.; EIRA, A.F. Efeito de cinco tipos de matéria orgânica na solubilização microbiana de fosfato de rocha. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 15, p.29-35,1991.

MULLAN, A.; QUINN, J.P.; MCGRATH, J.W. Enhanced phosphate uptake and polyphosphate accumulation in *Burkholderia cepacia* grown under low pH condition. **Microbiology Ecology**, v. 44, p. 69-77, 2002.

NAHAS, E. Ciclo do P: transformações microbianas. Jaboticabal-SP: FUNEP, 1991. 67p.

NAHAS, E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. **World Journal Microbiology & Biotechnology**, v.12, p. 567-572. 1996.

NAHAS, E. Phosphate solubilizing microorganisms: Effect of carbon, nitrogen, and phosphorus sources. In Velázquez, E.; Rodríguez-Barrueco, C. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Salamanca, Spain, 12-19 July, 2002. Springer, Book Series: **Development in Plant and Soil Sciences**, v. 102, p. 111-115, 2007.

NAHAS, E.; ASSIS, L.C. Efeito da concentração de fosfato na solubilização de fluorapatita por *Aspergillus niger*. **Revista de Microbiologia**, v.23, p.37-42, 1992.

NAHAS, E.; CENTURION, J. F.; ASSIS, L. C. Efeito das características químicas dos solos sobre os microrganismos solubilizadores de fosfato e produtos de fosfatase. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 18, p.49-53, 1994

NAHAS, E.; Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. **Bragantia**, v. 61, n. 3, 267-275, 2002.

NAHAS, E.; TERENCE, H. F. & ROSSI, A. Effect of carbon source and pH on the production and secretion of acid phosphatase (E. C. 3.1.3.2) and alkaline phosphatase (E.C.3.1.3.1) in *Neurospora crassa*. **Journal General Microbiology**, v. 128, p. 2017-2121, 1982.

NELSON, N.A. A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v.153, n.2, p.375-380, 1944.

OGBO, F.C. Conversion of cassava wastes for biofertilizer production using phosphate solubilizing fungi. **Bioresource Technology**, v.101, p. 4120–4124, 2010.

OLIVEIRA, C.A.; ALVES, V.M.C.; MARRIEL, I.E.; GOMES, E.A.; SCOTTI, M.R.; CARNEIRO, N.P.; GUIMARÃES, C.T.; SCHAFFERT, R.E.; SÁ, N.M.H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 1782-1787, 2009.

OMAR, S. A. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular-arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.14, 211–218, 1998.

OUAHMANE, L.; REVEL, J. C.; HAFIDI, M.; THIOULOUSE, J.; PRIN, Y.; GALIANA, A.; DREYFUS, B.; DUPONNOIS, P. Responses of *Pinus halepensis* growth, soil microbial catabolic functions and phosphate-solubilizing bacteria after rock phosphate amendment and ectomycorrhizal inoculation. **Plant and Soil**, v. 320, p.169–179, 2009.

PANDEY, A.; TRIVEDI, P.; KUMAR, B.; PALNI, L. M. S. Characterization of a Phosphate Solubilizing and Antagonistic Strain of *Pseudomonas putida* (B0) Isolated

from a Sub-Alpine Location in the Indian Central Himalaya. **Current Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 102-107, 2006.

PARK, K-H.; LEE, O-M.; JUNG, H.I.; JEONG, J.H.; JEON, Y.-D.; HWANG, D-Y.; LEE, C-Y.; SON, H-J. Rapid solubilization of insoluble phosphate by a novel environmental stress-tolerant *Burkholderia vietnamiensis* M6 isolated from ginseng rhizospheric soil. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.86, p. 947–955, 2010.

PAWAR, V.C.; THAKER, V. S. Acid phosphatase and invertase activities of *Aspergillus niger*. **Mycoscience**, v. 50, n. 5, 323-330, 2009.

PEDRINHO, E.A.N.; LEMOS, E.G.M.; PEREIRA, R.M.; SCAQUITO, D.C.; SILVEIRA, É.L.; VAL-MORAES, S.P.; ALVES, L.M.C.; WICKERT, E.; VALARINI, M.J. Avaliação do impacto de lodo de esgoto na microbiota do solo utilizando o gene 16S rRNA. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 3, p. 447-452, 2009.

POZO, C.; MARTÍNEZ-TOLEDO, M.V.; RODELAS, B.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Response of soil microbiota to the addition of 3,3'-diaminobenzidine. **Applied Soil Ecology**, v. 23, n. 2, p. 119-126. 2003

PRADHAN, N.; SUKLA, L.B. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 10, p. 850-854, 2005.

PRADHAN, N.; SUKLA, LB. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 10, p. 850-854, 2006.

PUENTE, M.E.; BASHAN, Y.; LI, C.Y.; LEBSKY, V.K. Micorbial population and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. **Plant Biology**, v. 6, p. 629-642, 2004.

RAGHOTHAMA, K.G. Phosphate acquisition. **Annual Review of Plant Biology**, v. 50, p. 665-693, 1999.

RAMALINGAM, N; PRASANNA, B.G.. Effect of aluminum phosphate on alkaline phosphatase activity of polyurethane foam immobilized cyanobacteria. **Current Microbiology**, v. 53, p. 194–197, 2006.

RANNO, S. K.; SILVA, L. S.; MALLMANN, F. J. K. Fracionamento do P inorgânico em solos de várzea do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, n. 1, p. 47-54, 2007.

RASHID, M.; KHALIL,S.; AYUB, N.; ALAM, S.; LATIF, F. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microrganismsm (PSM) under in vitro conditions. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 2, p. 187-169, 2004.

REDDY, M. S.; KUMAR, S.; BABITA, K.; REDDY, M.S. Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 84, p. 187–189, 2002.

RELWANI, L., KRISHNA, P., SUDHAKARA REDDY, M. Effect of carbon and nitrogen sources on phosphate solubilization by a wild-type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus tubingensis*. **Current Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 401-406, 2008.

REYES, I. et al. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV- induced mutants. **Microbiology Ecology**, v. 28, p. 281-290, 1999.

REZENDE, L. A.; ASSIS, L. C.; NAHAS, E. Carbon, nitrogen and phosphorus mineralization in two soils amended with distillery yeast. **Bioresource Technology**., v. 94, n. 2, p. 159-167. 2004.

RINU, K.; PANDEY, A. Temperature-dependent phosphate solubilization by cold- and pH-tolerant species of *Aspergillus* isolated from Himalayan soil. **Mycoscience**, v. 51, p. 263–271, 2010.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R.; GONZALEZ, T.; BASHAN, Y. Genetics of phosphate solubilization and its potencial application for improving plant growth-promoting bacteria. **Plant and Soil**, v. 287, p.15-21, 2006.

SABER, W.I.A.; GHANEN, K.M.; EL-HERSH, M.S. Rock phosphate solubilization by two isolates of *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp and their promotion to mung bean plants. **Research Journal of Microbiology**, v. 4, p. 235-250, 2009.

SHARAN, A.; SHIKLA; DARMWAL, N. Efficient phosphorus solubilization bu mutant strain of *Xantomonas campestris* using different carbon, nitrogen and phosphorus sources. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 3087-3090, 2008.

SILVA FILHO, G.N.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de N, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 1495-1508, 2001.

SILVA FILHO, G.N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 311-319, 2000.

SILVA FILHO, G.N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivo de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 6, p. 847-854, 2002.

SINGH, D.K.; KUMAR, S. Nitrate reductase, arginine deaminase, urease and dehydrogenase activities in natural soil (ridges with forest) and in cotton soil after cetamiprid treatments. **Chemosphere**, v 71, p. 412–418, 2008.

SINGH, C.P.; AMBERGER, A. Solubilization and availability of phosphorus during decomposition of rock phosphate enriched straw and urine. **Biological Agriculture and Horticulture**, v.7, p. 261-269, 1991.

SMIT, A.L.; BINDRABAN, P.S.; SCHRÖDER, J.J.; CONJIN, J.G.; VAN DER MEER, H.G. Phosphorus in agriculture: global resources, trends and developments. **Plant research international**, v. 282, 2009.

SONG, O-R.; LEE, S-J.; LEE, Y-S.; LEE, S-C.; KIM, K-K.; CHOI, Y-L. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 151-156, 2008.

SOUCHIE, E. L.; SOUZA ABBOUD, A. C. de; CAPRONI, A. L. Solubilização de fosfato in vitro por microrganismos rizosféricos de guandu. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 2, p. 53-60, 2007.

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

SOUCHIE, E.L.; AZCÓN, R.; BAREA, J.M.; SAGGIN-JÚNIOR, O.J.; SILVA, E.M.R. Phosphate solubilization and synergism between P-solubilizing and arbuscular mycorrhizal fungi. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 41, n. 9, p.1405-1411, 2006.

SRIVIDYA S., SOUMYA S., POOJA K. E. Influence of environmental factors and salinity on phosphate solubilization by a newly isolated *Aspergillus niger* F7 from agricultural soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 9, p.1864-1870, 2009.

TISDALE, S. L.; BEATON, J. D.; NELSON, W. L. **Soil fertility and fertilizers**. 4.ed. New York: Mac Millan, 1985. 754p.

TREVELYAN, W. E.; HARRISON, J. S. Studies on Yeast Metabolism. 1. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. **Biochemistry Journal**, v. 50, p. 298–303, 1952.

VASQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M.E.; LOPEZ-CORTEZ, A.; BASHAN, Y. Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangrove in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soil**, v. 30, n. 5-6, 460-468, 2000.

VASSILEV, N.; MEDINA, A.; AZCÓN, R.; VASSILEVA, M. Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. **Plant and Soil**, v. 287, p.77-84, 2006.

VASSILEV, N.; MEDINA, A.; AZCÓN, R.; VASSILEVA, M. Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting

products on plant growth and P uptake. **Developments in Plant and Soil Sciences.**, v. 102, p. 77-84, 2007.

VASSILEVA, M.; VASSILEV, N.; AZCON, R. Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* on olive cake-based medium and its further application in a soil-plant system. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.14, 1998.

WANI , P. A.; KHAN, M. S.; ZAIDI, A. Co-inoculation of nitrogen-fixing and phosphate- solubilizing bacteria to promote growth, yield and nutrient uptake in chickpea. **Acta Agronomica Hungarica**, v. 55, n.3, p. 315–323, 2007.

XIE, J.; KNIGHT, J.D.; LEGGETT, M.E. Comparison of media used to evaluate *Rhizobium leguminosarum bivar viciae* for phosphate-solubilizing ability. **Canadian Journal of Microbiology**, v.55, p. 910- 915, 2009.

XU, D.B.; MADRID, C.P.; ROHR, M.; KUBICEK, C.P. The influence of type and concentration of carbon source on production of citric acid by *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology of Biotechnology**, v. 30, p. 553-558, 1989.

ZAIDI, A.; KHAN, M. S. Co-inoculation Effects of Phosphate Solubilizing Microorganisms and *Glomus fasciculatum* on Green Gram- *Bradyrhizobium symbiosis*. **Agricultural Science**, v. 30, p. 223-230, 2006.

ZHAO, H., HUANG, L., XIAO, C.L., LIU, J., WEI, J., GAO, X. Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and conidial production of *Diplocarpon mali*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n.6, p. 639-644, 2010.