

Protocolo para crescimento de isolados bacterianos de nódulos de *Acacia mearnsii* e eficiência na solubilização de fosfato

Pedro Henrique Riboldi Monteiro¹, Etienne Winagraski¹, Raphael Antoine Anzalone³, Franquíele Bonilha da Silva⁴, Celso Garcia Auer^{1,2}, Antonio Rioyei Higa¹

¹Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná, Av. Prefeito Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico, 80210-170, Curitiba, Paraná, Brasil.

²Embrapa Florestas, Cx. Postal 319, 83411-000 Colombo, Paraná, Brasil.

³Departamento de Solos e Engenharia Agrícola, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, 80035-050, Curitiba, Paraná, Brasil.

⁴Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Avenida Bento Gonçalves, 7712, 91540-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

E-mail autor correspondente: rmonteiroef@gmail.com

Artigo enviado em 11/06/2018, aceito em 19/11/2018.

Resumo: Alguns grupos de bactérias rizosféricas apresentam capacidade de realizar a solubilização do fosfato no solo. Entretanto, a pesquisa com bactérias necessita de protocolos para prevenir a presença de fungos contaminantes, durante a fase de avaliação da capacidade de solubilização de fosfato *in vitro*, afinal o crescimento de fungos pode afetar a eficiência do protocolo adotado. Por esse motivo, o presente trabalho teve como objetivo: 1- estabelecer um protocolo para determinar um meio de cultura e a dosagem de cicloheximida para o crescimento de isolados bacterianos capazes de solubilizar o fosfato e reduzir a contaminação fúngica; e 2 – avaliar a eficiência de diferentes isolados bacterianos na solubilização de fosfato. Foram realizados três ensaios para avaliar a frequência fúngica, grau de contaminação e o índice de solubilização médio (ISM), durante o período de incubação. Os ensaios foram realizados em delineamento de blocos ao acaso. O primeiro em parcelas subdivididas no tempo, com o uso de dez isolados obtidos de nódulos de *Acacia mearnsii*, submetidos a cinco diferentes dosagens de cicloheximida (0; 25; 50; 75 e 100 mg.L⁻¹). O segundo observando o crescimento dos mesmos isolados em cada meio de cultura e o terceiro para determinar o melhor isolado quanto a solubilização quando comparado aos isolados indicados para a cultura. As avaliações de contaminantes ocorreram diariamente, enquanto que as mensurações do crescimento ocorreram aos 3, 5 e 7 dias de incubação. O cálculo do índice de solubilização médio (ISM) resultou da razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia, os resultados foram submetidos ao teste de Tukey ($p < 0,05$). As melhores bactérias que promoveram maior solubilização foram CNPF01F, CNPF01G, CNPF10B1. A partir dos resultados, recomenda-se o meio adaptado de Verma et al. (2001) contendo entre 50 e 75mg.L⁻¹ de cicloheximida como protocolo para avaliação de bactérias solubilizadoras de fosfato.

Palavras-chave: Fósforo, meio de cultura, bactéria.

Protocol for growth and solubilization of phosphate with bacterial isolates from nodules of *Acacia mearnsii*

Abstract: Some groups of rhizospheric bacteria have the capacity to perform phosphate solubilization in the soil. However, bacterial research requires protocols to prevent the presence of contaminating fungi, during the evaluation phase of phosphate solubilization in vitro, after all, the growth of fungi can affect the efficiency of the protocol adopted. The aim of this study was to establish a protocol for determining a culture medium and the dosage of cycloheximide for the growth of bacterial isolates capable of solubilizing phosphate and reducing fungal contamination; and 2 - to evaluate the efficiency of different bacterial isolates in phosphate solubilization. Three experiments were carried out to evaluate the fungal frequency, degree of contamination and the mean solubility index (ISM), during the incubation period. The tests were carried out in a randomized block design. The first was divided in time, using ten isolates obtained from nodules of *Acacia mearnsii*, submitted to five different doses of cycloheximide (0, 25, 50, 75 and 100 mg.L⁻¹). The second observing the growth of the same isolates in each culture medium and the third to determine the best isolate for solubilization when compared to the isolates indicated for culture. Contaminant evaluations occurred daily, while growth measurements occurred at 3, 5 and 7 days of incubation. The calculation of the mean solubility index (ISM) resulted from the ratio between the diameter of the halo and the diameter of the colony, the results were submitted to the Tukey test (p <0.05). The best bacteria that promoted higher solubilization were CNPF01F, CNPF01G, CNPF10B1. From the results, the adapted medium of Verma et al. (2001) containing between 50 and 75mg.L⁻¹ cycloheximide as a protocol for the evaluation of phosphate solubilizing bacteria.

Keywords: Phosphorus, culture medium, bacteria.

Introdução

A disponibilidade de fósforo (P) na maioria dos solos brasileiros é baixa, tornando o elemento um fator limitante da produção agrícola e florestal (VALADARES et al., 2015; DIAS et al., 2015). Tal fato, leva por vezes ao uso excessivo de adubação ou mau planejamento da aplicação de fertilizantes químicos nas culturas florestais, à base deste elemento (MASSENSINI et al., 2008). A fertilização química com P quando realizada de forma inadequada eleva a taxa do nutriente no solo, mas as fontes fosfatadas encontram-se em formas indisponíveis geralmente imobilizada por cátions de Ca⁺², Mg⁺², Fe⁺³ e Al⁺³, ou seja, esses fertilizantes são lentamente disponibilizados para as plantas (CHAGAS JUNIOR et al., 2010).

Os microrganismos do solo apresentam função-chave na relação entre solo-planta. Dentre as populações microbianas do solo, existem as bactérias capazes de solubilizar e mineralizar P, a partir de fontes orgânicas e inorgânicas em formas solúveis disponíveis para as plantas através da secreção de ácidos orgânicos ou de fosfatases (SOUCHIER, 2005; CHAGAS JUNIOR et al., 2010; MOREIRA e ARAUJO, 2013).

Entre os diferentes grupos de bactérias do solo, as espécies que tem capacidade comprovada na solubilização do fosfato pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* e *Rhizobium*, além de fungos de solo pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (SOUCHIER, 2005; MOREIRA e ARAUJO, 2013).

A determinação dos isolados que possuem capacidade de solubilizar P de maneira eficiente podem ser identificadas em laboratório. Os isolados obtidos do solo, rizosfera ou nódulo são submetidos a testes de crescimento em diferentes meios de cultura com fosfato (SOUCHIER, 2005; CHAGAS JUNIOR et al., 2010). Após o período de desenvolvimento ou incubação forma-se um halo em volta da colônia crescida considerando que a estirpe é capaz de solubilizar o fosfato de maneira positiva (BAHADIR; LIAQAT; ELTEM, 2018).

Os testes laboratoriais de solubilização de fosfato podem ser realizados por diversos métodos. O teste usual aplicado no Laboratório de Biologia do Solo da UFPR é uma adaptação do método de Sylvester-Bradley (1982), com o acréscimo de extrato de levedura. Entretanto, esse meio pode apresentar altas taxas de contaminação por fungos (de 80 a 90% - dados não mostrados), o que dificulta a avaliação da solubilização do fosfato pela bactéria. Por esse motivo, torna-se necessário buscar alternativas para controlar essa contaminação do meio através de adaptação metodológica.

A cicloheximida é um composto inibidor da síntese de proteínas em eucariotos produzidas por bactérias do gênero *Streptomyces*, geralmente aplicada para o controle de organismos contaminantes. Na microbiologia agrícola, a contagem de bactérias pelo método da semeadura em superfície utiliza o meio de cultivo de Thorton na dosagem de 40 mg.L⁻¹ para controlar o crescimento de fungos contaminantes (PARKINSON et al., 1971). Trabalhos desenvolvidos para a determinação de bactérias solubilizadoras na área das Ciências Agrárias também tem utilizado a

metodologia de Verma et al. (2001), adaptadas com o acréscimo de uma fonte de fosfato insolúvel na composição final.

O objetivo do presente trabalho foi determinar o crescimento e a eficiência na solubilização de fosfato de isolados bacterianos aplicados em dois métodos de cultivo e diferentes dosagens de cicloheximida para o controle de fungos contaminantes, afim de estabelecer um protocolo final.

Material e Métodos

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Biologia do Solo, no Departamento de Solos e Engenharia Agrícola da Universidade Federal do Paraná. Foram realizados três ensaios: os dois primeiros para avaliação de isolados bacterianos solubilizadores de fosfato e o controle de fungos contaminantes com diferentes dosagens de cicloheximida que variaram de 0; 25; 50; 75 e 100 mg.L⁻¹ de meio de cultura:

Ensaio 1 – constituído pelo meio de cultivo GES de Sylvester-Bradley et al. (1982) com adaptações: 10 g.L⁻¹ de glicose; 0,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura; 0,1 g.L⁻¹ de KNO₃; 15 g.L⁻¹ de ágar; 10 ml.L⁻¹ de Fe-EDTA (para obter esse composto foi realizada a dissolução de 3,72 g de Fe-EDTA e 3,78 g de FeSO₄.7H₂O em 900 mL de água destilada aquecida à 80 °C, quantidade suficiente para 1000 mL); Após a diluição é adicionado 2 ml.L⁻¹ das soluções de MgSO₄.7H₂O (10%), CaCl₂ (1%), em água destilada, além de 2 ml.L⁻¹ de solução de micronutrientes composta pela diluição de 0,2 g de Na₂MoO₄.2H₂O, 0,235 g de MnSO₄.2H₂O, 0,28 g de H₃BO₃, 0,008 g de CuSO₄.5H₂O e 0,024 g de ZnSO₄.7H₂O em 200 mL de água destilada; 1 ml.L⁻¹ de solução de NaCl

(10%). O pH foi ajustado para 6,8, antes de verter o meio, com temperatura entre 45 e 50 °C e foram adicionadas mais duas soluções: 50 mL da solução de K₂HPO₄ (10%) e 100 mL de CaCl₂ (10%), esterilizadas separadamente em dois frascos de Erlenmeyer diferentes de 250 mL.

Ensaio 2 – o segundo meio de cultura foi uma adaptação da metodologia de Verma et al. (2001) com a seguinte composição: 10 g.L⁻¹ de glicose; 5 g.L⁻¹ de NH₄Cl; 1 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 15 g.L⁻¹ de ágar; 4 g.L⁻¹ de CaHPO₄; após todos os reagentes estarem dissolvidos foi ajustado o pH em 6,8.

Os meios de cultura foram preparados e esterilizados em autoclave (120 °C, 1 atm, 20 min), depois vertidos na câmara de fluxo contínuo em placas de Petri esterilizadas. A quantidade de meio variou 15 a 20 mL por placa. Com o objetivo de avaliar o melhor meio de cultivo e melhor dosagem do antibiótico, as placas permaneceram abertas até solidificar totalmente e permitir maior entrada de contaminantes.

Os isolados bacterianos testados foram obtidos a partir de nódulos de acácia negra (*Acacia mearnsii*) coletados em plantios clonais, no estado do Rio Grande do Sul. O isolamento foi realizado no Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas. Foram utilizados dez isolados que foram submetidos a um teste preliminar, os quais indicaram que nove isolados

realizavam solubilização de fosfato (CNPFF01F; CNPF01G; CNPF01H; CNPF02A; CNPF04A; CNPF06C; CNPF08D; CNPF10B1 e CNPF13A) e um não (CNPFF04E).

Em cada placa, cada isolado bacteriano foi inoculado em quatro pontos com auxílio de alça de platina, foram realizadas três repetições/placas. As placas foram incubadas em câmara BOD, na temperatura de 28 ± 2 °C por 7 dias, durante esse período as avaliações ocorreram aos 3, 5 e 7 dias. O mesmo procedimento ocorreu para todos os ensaios (1, 2 e 3) do presente trabalho.

Ensaio 3 – Após determinar o melhor meio de cultivo, foram utilizados os dez isolados dos ensaios anteriores e mais duas estirpes SEMIA 1126 e SEMIA 1127 sem aplicação da cicloheximida.

Avaliação da Frequência de Fungos Contaminantes

A avaliação da frequência nos meios de cultura foi feita somente ao fim do ensaio (sete dias de cultivo), considerando a frequência como o número de colônias fúngicas presentes nas placas.

Determinou-se o grau de contaminação das placas, por meio de uma escala visual (Figura 1), e contabilizando-se o percentual equivalente a cada grau da escala conforme a ocupação das colônias fúngicas para cada tratamento.

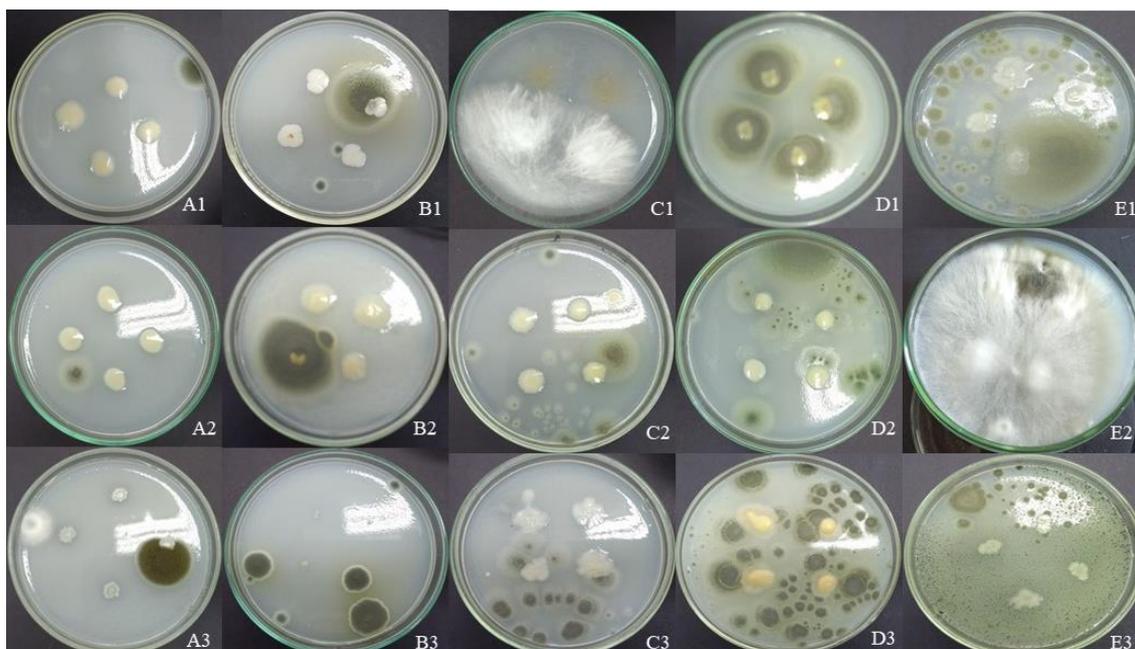


Figura 1. Escala visual* do grau de contaminação fúngica em meio de cultura.

*Escala: As letras A, B, C, D e E enumeradas de 1 a 3 representam exemplos do grau de contaminação em ordem crescente: grau 1 (+); 2 (++); 3 (+++); 4 (++++); 5 (+++++).

A partir das estruturas reprodutivas dos fungos isolados, realizou-se a preparação de lâminas semipermanentes com estas estruturas fúngicas coradas com corante de Amann. Por meio da observação dos detalhes das estruturas ao microscópio estereoscópio (50x) e ótico (100x e 400x), foi realizada a identificação com base em descrições e chaves sistemáticas apresentadas por Barnett e Hunter (1972).

Protocolos de Solubilização de Fosfato

A solubilização de fosfato foi determinada com o uso do índice de solubilização médio (ISM). Esse parâmetro foi obtido pelo cálculo da razão entre o diâmetro do halo que circunda a colônia bacteriana (halo resultante da solubilização) pelo diâmetro da colônia (HARA; OLIVEIRA, 2004). A mensuração dos diâmetros (mm) foi obtida com o uso de paquímetro digital. O índice de solubilização médio é calculado pelas fórmulas:

- (1) $DM_{col\hat{o}nia} = (D1_{col\hat{o}nia} + D2_{col\hat{o}nia})/2$
- (2) $DM_{halo} = D1_{halo} + D2_{halo}/2$
- (3) $ISM = DM_{halo}/DM_{col\hat{o}nia}$

Onde:

ISM = Índice de Solubilização Médio

DMhalo = diâmetro médio do halo (mm)

DMcolônia = diâmetro médio da colônia (mm)

Análise estatística

Os ensaios 1 e 2 foram conduzidos em delineamento em blocos ao acaso, para cada um dos meios de cultura, com arranjo fatorial onde os parâmetros foram os dez isolados aplicados (CNPFO1F; CNPFO1G; CNPFO1H; CNPFO2A; CNPFO4A; CNPFO4E; CNPFO6C; CNPFO8D; CNPFO10B1 e CNPFO13A) a cinco diferentes dosagens (0; 25; 50; 75 e 100 mg/L), com três repetições mensuradas aos 3, 5 e 7 dias de incubação.

O ensaio 3 foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com avaliação sobre a solubilização de fosfato dos 12 isolados testados (CNPFO1F; CNPFO1G; CNPFO1H; CNPFO2A; CNPFO4A; CNPFO4E; CNPFO6C; CNPFO8D; CNPFO10B1; CNPFO13A; SEMIA 1126 e SEMIA 1127) sem aplicação da cicloheximida, com três repetições mensuradas aos 3, 5 e 7 dias de incubação.

Os dados foram submetidos ao teste de Tukey à 5% de probabilidade com o uso do programa estatístico R (RStudio Team, 2016).

Resultados e Discussão

Frequência Fúngica e Grau de Contaminação

Ensaio 1

O uso de cicloheximida apresentou efeito inibitório fúngico

no meio de cultivo GES adaptado de Sylvester Bradley et al. (1982). A frequência de fungos contaminantes nas placas diminuiu de 73,33% na testemunha (sem aplicação) para 13,33% no tratamento 2 (50 mg.L⁻¹ de cicloheximida) (Figura 2A).

O grau de contaminação foi o nível de contaminação em que se encontrava cada tratamento de acordo com a frequência de fungos contaminantes (Figura 2B). Os resultados mostraram que o nível de contaminação não seguiu um padrão, mas permitiu observar qual a distribuição da contaminação entre as placas de cada tratamento. Os fungos contaminantes foram identificados e classificados em 11 morfotipos diferentes pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Rhizopus*.

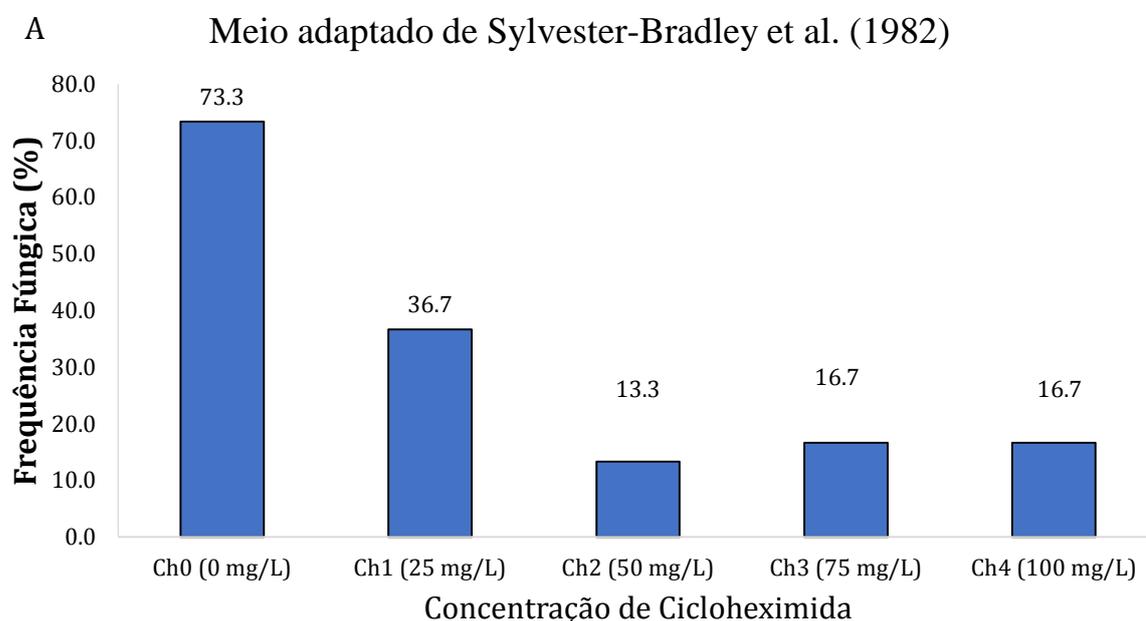


Figura 2. A) Frequência fúngica;

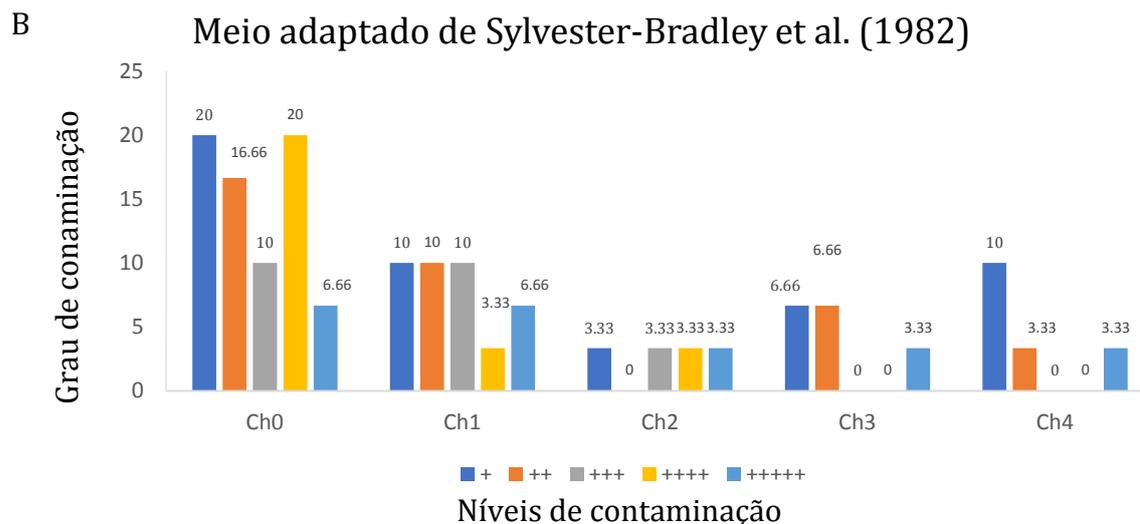


Figura 2. B) Grau de contaminação nas diferentes aplicações de cicloheximida no meio de cultura adaptado de Sylvester-Bradley et al. (1982).

Ensaio 2

No meio de cultura de Verma et al. (2001) modificado, a frequência fúngica variou de 26,7% e 33,3% na testemunha (sem aplicação) e no tratamento 1 (25 mg/L de cicloheximida), porém o melhor resultado foi obtido no tratamento 4 (100 mg/L de cicloheximida) com 10% de contaminação (Figura 3A). O grau de contaminação seguiu um padrão com níveis mais baixos quando comparados aos níveis de contaminação do experimento 1 (Figura 3B). O segundo ensaio resultou na identificação e classificação de somente dois morfotipos de gêneros de fungos: *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. Uma característica importante a ser considerada é que as espécies de fungos que se desenvolveram pertencem a gêneros fúngicos relatados como solubilizadores de fosfato, logo conseguem se desenvolver bem nesses meios de

cultura (SOUCHIER et al., 2005; VASSILEV et al., 2014). A diferença entre os meios de cultura quanto a diversidade de fungos contaminantes, a frequência fúngica e o grau de contaminação permite levantar a hipótese acerca da riqueza nutricional do meio de Sylvester Bradley et al. (1982) modificado com o acréscimo do extrato de levedura. O extrato de levedura apresenta alta quantidade de fósforo na composição diminuindo a necessidade de realizar o processo de solubilização do fosfato de cálcio presente no meio de cultura. Esses ingredientes, que tornam o meio nutricionalmente mais rico, diminuíram a qualidade de avaliação do ISM dos isolados, assim como permitiu o desenvolvimento de vários microrganismos.

Protocolos e Solubilização de Fosfato

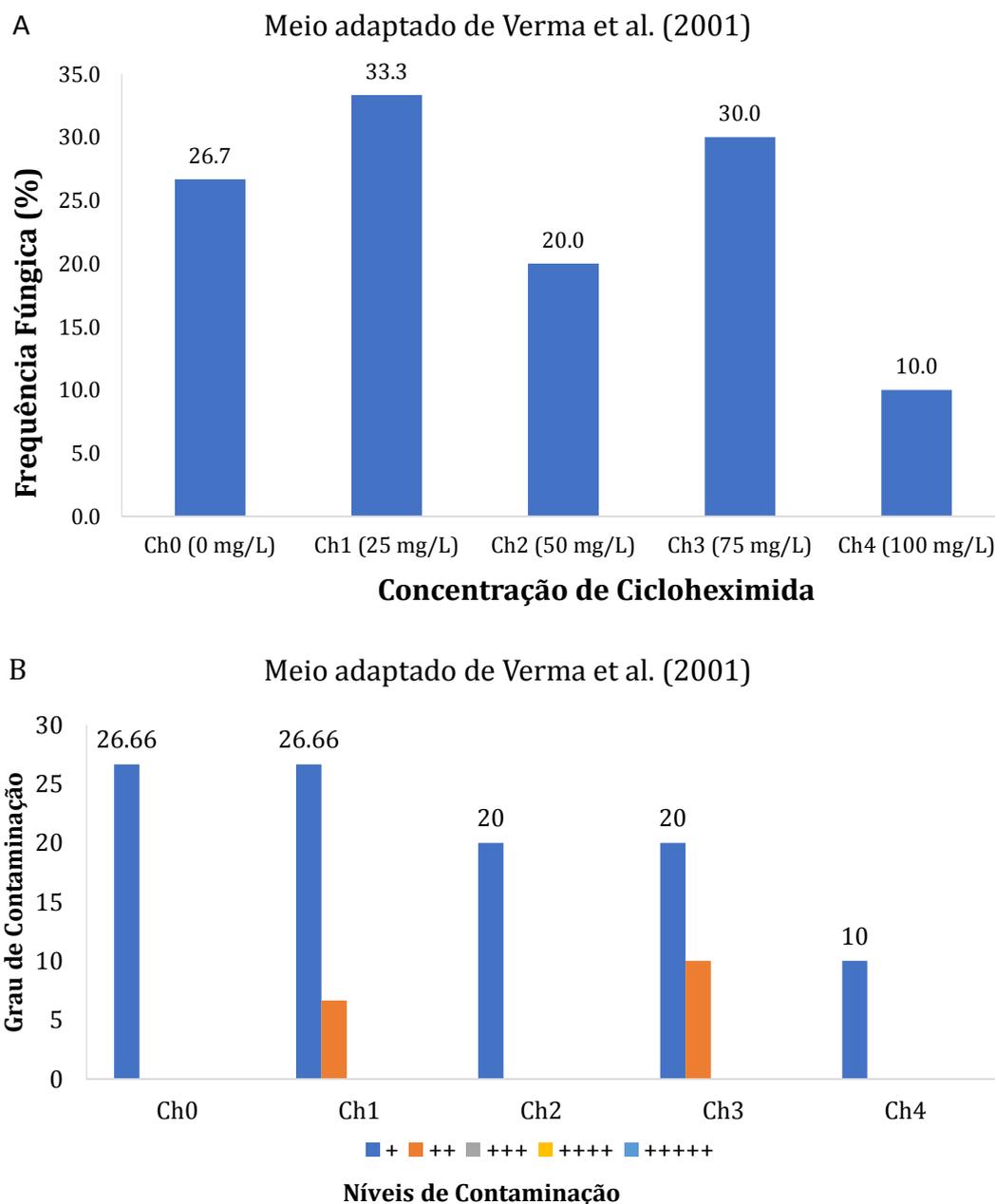


Figura 3. A) Frequência fúngica; B) Grau de contaminação nas diferentes aplicações de cicloheximida no meio de cultura adaptado de Verma et al. (2001).

Ensaio 1 e 2

Os resultados demonstram que o melhor método quanto à avaliação do ISM e controle fúngico a ser utilizado é o meio modificado de Verma et al. (2001) e as dosagens de cicloheximida entre testemunha e 75 mg.L⁻¹ não se diferenciaram estatisticamente quando observados

os índices de solubilização. Porém, ao analisar a quantidade na frequência fúngica e o grau de contaminação determinou-se que a dosagem de cicloheximida ideal era 50 mg.L⁻¹ (Tabela 1). A solubilização foi avaliada através da qualidade visual de formação dos halos ao fim do período de incubação de 7 dias.

Tabela 1. Análise estatística sobre o índice de solubilização médio (ISM) sobre a interação e a individualidade dos meios de cultura de Sylvester-Bradley et al. (1982) (SB) e Verma et al. (2001) (V) para os fatores isolado, tempo de cultivo, dose e método e as interações entre os fatores

Isolado	ISM			
	Ensaio 1 e 2		Ensaio 3	
	SB X V	SB	V	V
CNPF01F	1,5092 a	1,1914 ab	1,8270 b	2,1255 a
CNPF01G	1,4945 a	1,3208 a	1,6680 bc	1,6567 abc
CNPF01H	1,4653 ab	1,3524 a	1,5782 cd	1,5492 bc
CNPF02A	-	-	-	1,0057 d
CNPF04A	1,3495 bc	1,2503 ab	1,4486 de	1,3986 bcd
CNPF04E	0,9889 e	0,9778 c	1,0000 g	1,0000 d
CNPF06C	1,2248 d	1,1151 bc	1,3345 ef	1,3470 cd
CNPF08D	-	-	-	1,4585 bcd
CNPF10B1	1,5864 a	1,0875 bc	2,0853 a	1,8363 ab
CNPF13A	1,2456 cd	1,2993 a	1,1918 f	1,2440 cd
SEMIA 1126	-	-	-	1,0071 d
SEMIA 1127	-	-	-	1 d
Tempo (dia)				
3	1,306 b	1,0968 b	1,5148 b	1,3639 ab
5	1,4509 a	1,2479 a	1,6538 a	1,5279 a
7	1,3173 b	1,2532 a	1,3814 c	1,2654 b
Dose (mg.L⁻¹)				
0	1,3327 ab	1,1455 a	1,5197ab	
25	1,3478 ab	1,1886 a	1,5070 ab	
50	1,3997 a	1,2523 a	1,5469 ab	
75	1,4119 a	1,2453 a	1,5785 a	
100	1,2981 b	1,1650 b	1,4312 b	
Meio de Cultura				
SB	1,1994 b			
V	1,5167 a			

*Sylvester-Bradley et al. (1982) = SB; Verma et al. (2001) = V. Letras minúsculas diferentes nas colunas resultam em diferença estatística segundo o teste de Tukey a 1% de probabilidade

Os isolados mais eficientes na solubilização de fosfato foram CNPF10B1, CNPF01F e CNPF01G com ISM de 60, 52 e 51%, respectivamente, quando analisados os dados de interação dos fatores estudados nos dois meios de cultura e comparadas com a testemunha. Entre os dez isolados estudados, só foi possível avaliar oito deles, devido à grande contaminação dos isolados CNPF02A e CNPF08D, principalmente

no meio de Sylvester-Bradley et al. (1982).

Analisando os meios de cultura em separado, foi possível perceber a diferença na qualidade de mensuração do ISM. Os melhores isolados na solubilização de fosfato foram: CNPF01F, CNPF01G, CNPF01H, CNPF04A e CNPF13A para o meio de cultivo de Sylvester-Bradley et al. (1982) e CNPF10B1 para o meio de Verma et al. (2001) (Tabela 1).

De acordo com a classificação do nível de solubilização de isolados avaliado por Hara e Oliveira (2005) e Chagas Junior et al. (2010), para os isolados do presente trabalho em todos os ensaios foi possível determinar que somente dois deles apresentam nível médio de solubilização com valores de ISM maiores que 2 e menores do que 4, sendo esses CNPF01F e CNPF10B1. Os demais isolados apresentaram valores inferiores a 2, considerado como nível baixo de solubilização.

A eficiência dos meios na qualidade da formação de halo para a avaliação dos isolados apresentou diferença estatística nos índices de solubilização dos dois meios de cultivo, onde o meio de Verma et al. (2001) permitiu avaliar/classificar seis grupos de isolados e o meio de Sylvester-Bradley et al. (1982) permitiu a classificação de apenas três grupos.

A característica visual do halo foi mais evidente no meio de cultura Verma et al. (2001). Provavelmente, a presença do extrato de levedura adicionado ao meio de Sylvester-Bradley et al. (1982) aumentou a quantidade de fósforo disponível devido a composição da parede celular das leveduras, ficando disperso no meio, e as bactérias a utilizam reduzindo a necessidade de solubilizar o fósforo ligado à fonte de cálcio do meio.

Ao analisar os dados sobre o Ensaio 3 foi verificado que a estirpe SEMIA 1126 conseguiu solubilizar uma baixa quantidade de fosfato e a estirpe SEMIA 1127 não solubilizou o fosfato visualmente com formação de halo, durante o período de incubação de sete dias. Em processos de desenvolvimento de um inoculante, características além da nodulação e fixação biológica de nitrogênio como

a solubilização de fosfato tornam estirpes como a SEMIA 1126 de maior importância quando comparada a SEMIA 1127, caso esse isolado realmente não apresente a capacidade de solubilizar o fosfato. Entretanto, a quantidade que tal estirpe consegue solubilizar é baixa não diferenciando estatisticamente das estirpes que não apresentaram o halo de solubilização.

Nos três ensaios, os isolados que mais solubilizaram P foram CNPF01F, CNPF01G, CNPF01H, CNPF10B1 conseguindo índices de solubilização entre os três ensaios, índices que variaram entre 30% até 112 % a mais que a testemunha, durante o mesmo período de incubação. Esses valores de ISM reafirmam o potencial de uso desses microrganismos como potenciais promotores do crescimento de plantas (OUFDOU et al., 2016; BAHADIR; LIAQAT; ELTEM, 2018).

Os meios de cultura adotados no presente trabalho utilizam fontes de fosfato de ligação fraca, quando comparados a outros meios de cultura utilizados para avaliar a solubilização, os quais apresentam como fonte de fosfato férrico e de alumínio, entretanto o uso desses meios de cultura não poderiam ser reproduzidos por necessitarem de agitação contínua, para evitar a precipitação dos sais durante o período de incubação.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por fornecer bolsa de doutorado ao primeiro e segundo autores.

Conclusões

O uso da cicloheximida foi eficiente para o controle de fungos contaminantes.

O meio de cultura adaptado de Sylvester-Bradley et al. (1982), com adição de extrato de levedura não é indicado para a visualização da formação de halos por bactérias solubilizadoras de fosfato.

O meio de cultura de Verma et al. (2001) comprovou ser mais eficiente para a visualização dos halos de solubilização de fosfato pelas bactérias e determinar os ISM com maior qualidade.

Os melhores isolados bacterianos solubilizadores foram CNPF1F, CNPF01G e CNPF10B1.

O melhor protocolo para este tipo de estudo é o meio de cultura adaptado de Verma et al. (2001) com dosagem de cicloheximida entre 50 e 75 mg.L⁻¹.

Referências

- BAHADIR, P. S.; LIAQAT, F.; ELTEM, R. Plant growth promoting properties of phosphate solubilizing *Bacillus* species isolated from the Aegean Region of Turkey. **Turkish Journal of Botany**, Ancara, v. 42, n. 2, p.183-196, 2018.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Minnesota: Burgess, 3 ed. 1972. 241p.
- CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; NASCIMENTO DE OLIVEIRA, A.; WILLERDING, A. L. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá-PR, v. 32, n. 2, p. 359-366, 2010. 10.4025/actasciagron.v32i2.3185
- DIAS, L. P. R.; COLPO GATIBONI, L.; BRUNETTO, G.; SIMONETE, M. A.; BICARATTO, B. Eficiência relativa de fosfatos naturais na adubação de plantio de mudas de *Eucalyptus dunnii* Maiden e *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage em solo sem e com calagem. **Ciência Florestal**, Santa Maria-RS, v. 25, n. 1, p. 37-48, 2015. <http://dx.doi.org/10.5902/1980509817443>
- HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características Fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 7, p. 667-672, 2005.
- MOREIRA, A. L.; ARAÚJO, F. F. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* spp. como potenciais promotores de crescimento de *Eucalyptus urograndis*. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 37, n. 5, p. 933-943, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622013000500016>
- MASSENSINI, A. M.; SILVA, A. A.; REIS, M. R.; COSTA, M. D. Atividade de isolados bacterianos solubilizadores de fosfato na presença de formulações comerciais de glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 26, n. 4, p. 815-823, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582008000400013>
- OUFDOU, K.; BECHTAOUI, N.; EL ALAOUI, A.; BENIDIRE, L.; DAOUI, K.; GÖTTFERT, M. Symbiotic rhizobacteria for improving of the agronomic effectiveness of phosphate fertilizers. **Procedia Engineering**, v. 138, p. 325-331, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2016.02.092>

RSTUDIO: Integrate Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA. Disponível em: <http://www.rstudio.com/>

PARKINSON, D.; GRAY, T. R.; WILLIAMS, S. T. **Methods for studying the ecology of soil microorganisms**. Oxford, Blackwell Scientific Publications. 1971, 116p.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; TORRACA, S. L.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazônica**, Manaus-AM, v. 12, n. 1, p. 15-22, 1982. <http://dx.doi.org/10.1590/1809-43921982121015>.

SOUCHIER, E. L.; CAMPELLO, E. F. C.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. **Floresta**, Curitiba-PR, v. 35, n. 2, p. 329-334. 2005. <http://dx.doi.org/10.5380/RF.V35I2.4620>.

VALADARES, S. V.; SILVA, L. F.; VALADARES, R. V.; FERNANDES, L. A.; NEVES, J. C. L.; SAMPAIO, R. A. Plasticidade fenotípica e frações fosfatadas em espécies florestais como resposta à aplicação de fósforo. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 39, n. 2, p. 225-232, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-67622015000200002>.

VASSILEV, N.; MENDES, G.; COSTA, M.; VASSILEVA, M. Biotechnological tools for enhancing microbial solubilization of insoluble inorganic phosphates. **Geomicrobiology Journal**, v. 31, n. 9, p. 751-763, 2014.

<https://doi.org/10.1080/01490451.2013.822615>.

VERMA, S. C.; JAGDISH, K. L.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promotion and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00333-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00333-9).