

SOLUBILIZACIÓN DE FUENTES DE FÓSFORO ASOCIADAS A UN COMPUESTO ORGÁNICO ENRIQUECIDO CON BIOFERTILIZANTES

SOLUBILIZATION OF PHOSPHORUS SOURCES ASSOCIATED WITH AN ORGANIC COMPOUND ENRICHED WITH BIOFERTILIZER

Leandro Rosatto-Moda^{1*}, Renato de Mello-Prado², Leónides Castellanos-González³,
Alfredo Reyes-Hernández⁴, Gustavo Caione¹, C. Naudi Silva-Campos¹

¹Post-graduación en Agronomía. ²Departamento de Solos e Adubos. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". s/n, CEP 14884-900, Ciudad de Jaboticabal, Estado de São Paulo, Brasil. (lerosattomoda@yahoo.com.br), (gustavocaione@agronomo.eng.br), (cidncampos@yahoo.com.br), (rmp Prado@fcav.unesp.br). ³Universidad de Cienfuegos, Carretera a Rodas km 4, Cuatro Caminos, 59430, Cuba. (lcastellanos@ucf.edu.cu). ⁴Departamento de Ciencias Agropecuarias de la Facultad Agropecuaria de Montaña Escambray, Universidad de Sancti Spiritus, Cuba. (alfredo@fame.suss.co.su).

RESUMEN

El enriquecimiento de un compuesto orgánico con biofertilizantes a base de microorganismos (bacterias solubilizadoras de fósforo, BSF) puede mejorar las propiedades de los fertilizantes de fosfato aplicados a los suelos para mayor disponibilidad de nutrientes. El diseño experimental fue bloques completos al azar en un arreglo factorial de tratamientos 4x2+1: 1) cuatro fuentes de fósforo: roca fosfatada, fosfato natural, superfosfato triple (SFT) y roca fosfórica cubana; 2) dos fuentes de biofertilizante preparadas a base de cachaza enriquecida con microorganismos y sin enriquecimiento; y 3) un testigo absoluto (sin cachaza ni abonado); repetido tres veces. Los datos se analizaron con ANDEVA y las medias de tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las evaluaciones de P disponible (metodología Bray-2 y Oniani) y las cuantificaciones de las bacterias totales y solubilizadoras y de hongos en el suelo se realizaron 30, 60 y 90 d después de iniciar el experimento. Después de 60 d, la población de BSF fue menor en el testigo ($p \leq 0.05$) y el contenido de P (Bray-2) fue mayor para SFT ($p \leq 0.01$). La aplicación del biofertilizante aumentó el contenido de P comparado con el testigo. A los 90 d el P (Bray-2) aumentó con el tratamiento SFT, el cual aumentó ($p \leq 0.01$) el P en el suelo a los 60 y 90 d independientemente de la presencia del biofertilizante enriquecido con microorganismos. El uso de cachaza enriquecida con microorganismos asociada con diferentes fuentes de P, y aplicadas al suelo con alto contenido de

ABSTRACT

The enrichment of an organic compound with biofertilizers of microorganisms (solubilizing phosphorus bacteria, BSF) can improve the properties of phosphate fertilizers applied to soils to increase nutrient availability. The experimental design was randomized complete blocks with a factorial 4x2 +1 arrangement of treatments: 1) four sources of phosphorus: phosphate rock, natural phosphate, triple superphosphate (TSP) and Cuban phosphate rock; 2) two sources of bio-fertilizer prepared from filter cake (cane waste) enriched with microorganisms and no enrichment; 3) and an absolute control (no filter cake or fertilizer); repeated three times. Data was analyzed with ANOVA and treatment means were compared using Tukey ($p \leq 0.05$). Assessments of available P (Bray-2 and Oniani methodology) and the quantification of total and solubilizing bacteria and fungi in the soil were performed 30, 60 and 90 d after starting the experiment. After 60 d, the population of BSF was lower in the control ($p \leq 0.05$) and the content of P (Bray-2) was higher for SFT ($p \leq 0.01$). The application of the bio-fertilizer increased the P content compared to the control. At 90 d P (Bray-2) increased with the SFT treatment, which also increased ($p \leq 0.01$) P in the soil at 60 and 90 d regardless of the presence of microorganism-enriched bio-fertilizer. The use of filter cake enriched with microorganisms associated with different sources of P, and applied to the soil with a high content of P, did not change the soil populations of total and solubilizing bacteria and fungi in the short term. TSP promoted the highest levels of P in the soil, irrespective of the presence of the organic compound enriched with P solubilizing microorganisms.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: junio, 2013. Aprobado: junio, 2014.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 48: 489-500. 2014.

P, no alteró las poblaciones de bacterias totales y solubilizadoras y hongos del suelo a corto plazo. El SFT promovió los mayores niveles de P en el suelo, independientemente de la presencia del compuesto orgánico enriquecido con microorganismos solubilizadores de P.

Palabras clave: P disponible, microorganismos, superfosfato triple, fosfato natural.

INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es un nutrimento caracterizado por el alto grado de interacción con el suelo lo cual, unido a su deficiencia en vastas zonas de la agricultura brasileña, lo convirtió en el elemento más crítico en los suelos. La concentración de P total varía desde poco más de cero en suelos muy arenosos, hasta 2000-3000 mg kg⁻¹. El principal determinante del P total extraíble es el material parental (óxidos de Fe y Al, cenizas volcánicas o caliza) del suelo; en la solución del suelo, el contenido de este elemento es muy bajo (Raij, 2011).

La adsorción del P en los suelos puede ser afectada por el contenido de materia orgánica, el pH, el contenido de calcio, hierro trivalente y aluminio, así como por el tiempo de contacto entre los fertilizantes y el suelo (Santos *et al.*, 2008; Korndörfer y Melo, 2009). De acuerdo con la recomendación de base, el P debe aplicarse de forma localizada, por lo general en el surco, lo cual disminuye su fijación (Raij, 2011). Sin embargo, para una mejor utilización de P es necesario estudiar sus diferentes fuentes, las prácticas de manejo y la influencia de la materia orgánica (MO) en la disponibilidad de P para obtener índices de rendimiento mayores con la fertilización fosfatada (Korndörfer y Anderson, 1997). El efecto de diferentes fuentes de P sobre su concentración en el suelo fue evaluado por Ernani *et al.* (2001) y Frandoloso *et al.* (2010), quienes usaron superfosfato triple (SFT), fosfato natural de Arady (fertilizantes aplicados a todo el suelo) y fosfato natural de Gafsa (fertilización fosfatada dirigida al surco) y encontraron niveles de P más altos cuando se aplicó SFT. Además, Resende *et al.* (2006a) detectaron promedios más altos de P en el suelo cuando aplicaron superfosfato triple, fosfato reactivo de Arad y fosfato natural de Araxá, a todo el suelo, comparados con el testigo (sin P).

Los mecanismos causantes de una menor adsorción del P se deben a combinaciones del aumento de

Key words: Available P, microorganisms, triple superphosphate, natural phosphate.

INTRODUCTION

Phosphorus (P) is a nutrient, characterized by a high degree of interaction with the soil, which together with its vast areas of deficiency in Brazilian agriculture, made it the most critical element in soils. The concentration of total P varies from just over zero in very sandy soils, up to 2000-3000 mg kg⁻¹. The main determinant of total extractable P is the soil parent material (Fe and Al oxides, volcanic ash or limestone); in the soil solution, the content of this element is very low (Raij, 2011).

The adsorption of P on soils can be affected by the content of organic matter, the pH, calcium content, trivalent iron and aluminum, as well as the contact time between the fertilizers and the soil (Santos *et al.*, 2008; Korndörfer and Melo, 2009). According to basic knowledge, P should be applied in a localized way, usually in the groove, which decreases its attachment (Raij, 2011). However, for a better utilization of P it is necessary to study its different sources, management practices and the influence of organic matter (OM) on P availability to obtain higher yielding indices with phosphate fertilization (Korndörfer and Anderson, 1997). The effect of different sources of P on its concentration in the soil was evaluated by Ernani *et al.* (2001) and Frandoloso *et al.* (2010), who used triple superphosphate (TSP), Arady natural phosphate (fertilizers applied to the entire soil) and Gafsa natural phosphate (P fertilization applied to the groove) and found higher levels of P when TSP was applied. Furthermore, Resende *et al.* (2006a) found higher averages of P in the soil when applying triple superphosphate, Arad reactive phosphate and Araxá natural phosphate to the whole soil, compared to the control (no P).

The mechanisms leading to a lower adsorption of P are the result of combinations of increased pH, less exchangeable Al and the amount of P mineral released by OM sources (Iyamuremye and Dick, 1996). The competitive adsorption between organic acids and P (Erich *et al.*, 2002), affected by oxides of Fe and Al can potentially reduce the number of adsorption sites (organic acids such as citrate and oxalate and humic and fulvic acids can block the adsorption sites of the oxy-hydroxides of Fe and Al), releasing P in the soil

pH, disminución del Al intercambiable y de la cantidad de P mineral liberada por fuentes de MO (Iyamuremye y Dick, 1996). La adsorción competitiva entre los ácidos orgánicos y el P (Erich *et al.*, 2002), afectados por óxidos de Fe y de Al pueden potencialmente reducir el número de sitios de adsorción (los ácidos orgánicos como citrato y oxalato, y los ácidos húmicos y fúlvicos pueden bloquear los sitios de adsorción de los oxi-hidróxidos de Fe y Al), liberando P en la solución del suelo (Guppy *et al.*, 2005). Por ello se infiere que la adición de un portador orgánico aumentaría la disponibilidad de P en el suelo, pues habría mayor actividad microbiana debido al aumento del contenido de MO en el suelo, y también por la liberación de ácidos orgánicos.

Los microorganismos del suelo desempeñan una función fundamental en los procesos de mineralización y solubilización del P. Así, el estudio de procedimientos microbiológicos que favorecen la disponibilidad de P es importante (van Veen, 1997; Mendes y Reis Junior, 2003). La presencia de microorganismos del suelo que pueden solubilizar fosfatos naturales, propician su aprovechamiento por las plantas. Según Young (1990), hay resultados favorables en programas de inoculación de microorganismos solubilizadores de fosfatos, pero las condiciones de crecimiento de estos microorganismos en el suelo se deben estudiar (Barroti y Nahas, 2000). Así, se ha estudiado la solubilización de fosfatos por microorganismos del suelo, incluyendo bacterias y hongos (Kim *et al.*, 1998; Stamford *et al.*, 2004; Deubel y Merbach, 2005; Fankem *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2007; Stephen y Jisha, 2009).

La hipótesis de esta investigación fue que la eficiencia agronómica de diferentes fuentes de P es mayor al adicionar un compuesto orgánico enriquecido o no con microorganismos solubilizadores de fosfato, porque el aumento de los compuestos orgánicos en el suelo disminuirá la adsorción de P y aumentará su disponibilidad. Debido a las propiedades químicas de los fertilizantes fosfatados solubles adicionados a la cachaza enriquecida con microorganismos, se afectaría la eficiencia de liberación del P soluble de dicho fertilizante. El objetivo fue evaluar, en laboratorio, el efecto de la cachaza con y sin enriquecimiento de microorganismos asociados, con diferentes fuentes de P solubles sobre el contenido de P disponible y la población microbiológica del suelo, utilizando un tipo de suelo representativo del cultivo de la caña de azúcar en Cuba.

solution (Guppy *et al.*, 2005). Therefore, we inferred that the addition of an organic carrier would increase soil P availability due to a higher microbial activity resulting from the increased content of OM in the soil, and also by the release of organic acids.

Soil microorganisms play a key role in the processes of mineralization and solubilization of P. Thus the study of microbiological processes that favor the availability of P is important (van Veen, 1997; Mendes and Reis Junior, 2003). The presence of soil microorganisms that can solubilize natural phosphate leads to its use by plants. According to Young (1990), there are favorable results in inoculation programs of phosphate solubilizing microorganisms, but the growth conditions of these microorganisms in the soil should be studied (Barroti and Nahas, 2000). Thus, solubilization of phosphates by soil microorganisms, including bacteria and fungi has been studied (Kim *et al.*, 1998. Stamford *et al.*, 2004; Deubel and Merbach, 2005; Fankem *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2007; Stephen and Jisha, 2009).

The hypothesis of this research was that the agronomic performance of different sources of P is enhanced by adding an organic compound either enriched or not with phosphate solubilizing microorganisms, because the increase of organic compounds in the soil will decrease the adsorption of P and increase its availability. Because of the chemical properties of the soluble phosphate fertilizers added to filter cake (cane waste; cachaza) enriched with microorganisms, the efficient release of soluble P of such fertilizer would be affected. The objective was to evaluate, in the laboratory the effect of filter cake with and without the enrichment of microorganisms, with different sources of soluble P on the available P content and soil microbial population using a representative soil type of sugar cane cultivation in Cuba.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted in the laboratory at the University of Cienfuegos, Cuba, using a representative soil, Sialítico Pardo, Pardo type, carbonate gender (Hernández *et al.*, 1999), which corresponds to a Typic Eutropept (Soil Survey Staff, 2010). We collected the soil samples in areas of growing sugar cane on a state-production farm, municipality of Cienfuegos, in 20 random points at 0-20 cm depth. The soil was air dried, turned around and sieved (2 mm) and the chemical analysis for fertility

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en laboratorio en la Universidad de Cienfuegos, Cuba, utilizando un suelo representativo, Pardo Sialítico, tipo Pardo, género carbonato (Hernández *et al.*, 1999), que corresponde a un Typic Eutropept (Soil Survey Staff, 2010). Las muestras de suelo se recolectaron en áreas de cultivo de caña-de-azúcar en una finca de producción estatal, municipio de Cienfuegos, en 20 puntos al azar a la profundidad de 0-20 cm. El suelo se secó al aire, se desterronó y tamizó (2 mm) y se realizó el análisis químico para fines de fertilidad con la metodología de Raij *et al.* (2001). Los valores obtenidos mediante el análisis químico fueron: pH en CaCl_2 6.9; MO 35 g dm^{-3} ; P resina 55 mg dm^{-3} ; K 1.7 mmol dm^{-3} ; Ca 644 mmol dm^{-3} ; Mg 28 mmol dm^{-3} ; H+Al 9 mmol dm^{-3} ; SB 673.7 mmol dm^{-3} ; CTC (capacidad de intercambio catiónico) 682.7 mmol dm^{-3} ; PSB (porcentaje de saturación de bases) 99 %. También se caracterizó el contenido de P en el suelo (Bray-2), igual a 2.4 mg kg^{-1} , de acuerdo con la metodología de Bray y Kurtz (1945).

El diseño experimental fue bloques completos al azar, en arreglo factorial de tratamientos $4 \times 2 + 1$: 1) cuatro fuentes de P: fosfato de Araxá (P_2O_5 36 % y P_2O_5 soluble en ácido cítrico al 2 % igual a 4 %), fosfato natural reactivo (Bayóvar) (P_2O_5 29 % y P_2O_5 soluble en ácido cítrico al 2 % igual a 14 %), superfosfato triple (SFT) (P_2O_5 45 % y P_2O_5 soluble en ácido cítrico al 2 % igual a 41 %), y roca fosfórica cubana (P_2O_5 24 % y P_2O_5 soluble en ácido cítrico al 2 % igual a 6.5 %); 2) dos fuentes de compuesto orgánico a base de cachaza (residuo obtenido del proceso de filtración de los jugos de la caña de azúcar): enriquecida con microorganismos, y sin enriquecimiento de microorganismos; 3) un testigo (sin cachaza, ni fertilización). La unidad experimental consistió de recipientes plásticos (200 mL) llenados con muestras de suelo, con los respectivos tratamientos.

Las propiedades químicas de la cachaza, de acuerdo con la metodología propuesta por Bataglia *et al.* (1983), fueron las siguientes (g kg^{-1}): N=18,0; P=12,1; K=4,3; Ca=96,4; Mg=10,2; S=3,4. En el compuesto orgánico se agregaron todas las fuentes de P en una concentración de 60 mg dm^{-3} de P soluble en ácido cítrico al 2 % (Malavolta, 1981).

El compuesto orgánico enriquecido se obtuvo del compostaje de la cachaza, con adición de biofertilizante conteniendo microorganismos. El biofertilizante fue Azotofos a base de *Pseudomonas fluorescens* y *Azotobacter fluorescens*, conteniendo 10^8 ufc mL^{-1} fue obtenido en el Laboratorio Barajagua, Instituto de Investigaciones de Suelos y Fertilizantes de Cuba. Diez gramos de Azotofos se agregaron a 1 L de agua destilada y de inmediato se enriqueció el compuesto orgánico añadiendo el biofertilizante (280 mL kg^{-1} cachaza).

purposes was performed with the methodology by Raij *et al.* (2001). The values obtained by chemical analysis were pH (CaCl_2) 6.9; OM 35 g dm^{-3} ; P Resin 55 mg dm^{-3} ; K 1.7 mmol dm^{-3} ; Ca 644 mmol dm^{-3} ; Mg 28 mmol dm^{-3} ; H+Al 9 mmol dm^{-3} ; SB 673.7 mmol dm^{-3} ; CTC (cation exchange capacity) 682.7 mmol dm^{-3} ; BSP (base saturation percent) 99 %. Soil P content was also estimated (Bray-2), equal to 2.4 mg kg^{-1} , according to the methodology by Bray and Kurtz (1945).

The experimental design was randomized complete blocks in a factorial arrangement of treatments $4 \times 2 + 1$: 1) four sources of P: Araxá phosphate (36 % P_2O_5 and P_2O_5 soluble in 2 % citric acid equal to 4 %), reactive natural phosphate (Bayóvar) (29 % P_2O_5 and P_2O_5 soluble in 2 % citric acid equal to 14 %), triple superphosphate (TSP) (P_2O_5 45 %, P_2O_5 soluble in 2 % citric acid equal to 41 %), and Cuban phosphoric rock (P_2O_5 24 %, and P_2O_5 soluble in 2 % citric acid equal to 6.5 %); 2) two sources of organic compound based on filter cake (cachaza, a residue obtained from the filtering process of sugar cane juice): enriched with microorganisms, and without enrichment of microorganisms; 3) a control (without filter cake nor fertilization). The experimental unit consisted of plastic containers (200 mL) filled with soil samples, with their respective treatments.

The chemical properties of filter cake, according to the methodology proposed by Bataglia *et al.* (1983) were the following (g kg^{-1}): N = 18,0; P = 12,1; K = 4,3; Ca=96,4; Mg=10,2; S=3,4. In the organic compound we added all sources of P at a concentration of 60 mg dm^{-3} of soluble P in citric acid at 2 % (Malavolta, 1981).

The enriched organic compound was obtained from filter cake composting, with the addition of the biofertilizer containing microorganisms. The biofertilizer was Azotofos composed of *Pseudomonas fluorescens* and *Azotobacter fluorescens*, containing 10^8 ufc mL^{-1} was obtained at the Barajagua Laboratory, Instituto de Investigaciones de Suelos y Fertilizantes de Cuba (Research Institute of Soils and Fertilizers of Cuba). We added 10 g of Azotofos to 1 L of distilled water and immediately the organic compound (filter cake) was enriched, adding the biofertilizer (280 mL kg^{-1} filter cake).

After composting, the dose of the organic compound applied to the containers was 12.5 g kg^{-1} soil, corresponding to 25 t ha^{-1} . Filter cake without enrichment was analyzed at the start of the experiment using the methodology by Martínez *et al.* (2006); then we determined the number of colonies of *Penicillium spp* (5×10^1 ufc g^{-1}), *Aspergillus spp* (1.3×10^1 ufc g^{-1}) and *Aspergillus terreus* (2.3×10^1 ufc g^{-1}).

We applied nitrogen in all treatments (200 mg dm^{-3}) in the form of urea (45 % N) and potassium (150 mg dm^{-3}) in the form of potassium chloride (60 % K_2O) (Malavolta, 1981).

Después del compostaje, la dosis del compuesto orgánico aplicada en los recipientes fue 12.5 g kg^{-1} suelo, correspondiente a 25 t ha^{-1} . La cachaza sin enriquecimiento se analizó al iniciar el experimento con la metodología de Martínez *et al.* (2006), y se determinó el número de colonias de *Penicillium spp* ($5 \times 10^1 \text{ ufc g}^{-1}$), *Aspergillus spp* ($1.3 \times 10^1 \text{ ufc g}^{-1}$) y *Aspergillus terreus* ($2.3 \times 10^1 \text{ ufc g}^{-1}$).

En todos los tratamientos se aplicó nitrógeno (200 mg dm^{-3}) en forma de urea (45 % N) y potasio (150 mg dm^{-3}) en forma de cloruro de potasio (60 % K_2O) (Malavolta, 1981).

El experimento se estableció el 14 de septiembre de 2012. El suelo de los recipientes fue regado diariamente manteniendo una humedad similar al 80 % de la capacidad de campo. A los 30, 60 y 90 d después de iniciar el experimento se muestreó el suelo para determinar el contenido de P disponible (Bray-2), con la metodología de extracción de Bray y Kurtz (1945), recomendada en Cuba para suelos con predominio de Ca, principalmente por ser práctico y de bajo costo (Broggi *et al.*, 2010). En este método se usó una solución extractora de $\text{HCl } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ y $\text{NH}_4\text{F } 0.03 \text{ mol L}^{-1}$: se pesó 1 g de suelo, se colocó en un tubo de centrifugado con tapa de rosca y se adicionaron 7 mL de solución extractora; luego se colocaron 40 s en un agitador horizontal, reposaron 16 h, se centrifugaron 5 min a 748 g , y se determinó P del suelo usando el método de Murphy y Riley (1962).

El contenido de P en el suelo se determinó de acuerdo con el método de Oniani (Pérez *et al.*, 2010), usado en Cuba para suelos carbonatados. Las muestras de 2 g de suelo se agitaron 3 min con 5 mL de solución extractora ($\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 0.05 \text{ mol L}^{-1}$), se filtraron y se determinó P según Murphy y Riley (1962).

Mientras se evaluó el contenido de P en suelo, se determinó la población microbiana: las muestras de suelo se colocaron en bolsas plásticas, protegidas de la luz y mantenidas en cajas térmicas hasta su ingreso al laboratorio; luego fueron tamizadas (malla de 2 mm), con una humedad ajustada entre 50 y 60 % de capacidad de campo; colocadas en bolsas de plástico con orificios de ventilación y guardadas en cámara fría (4°C) (Cardoso *et al.*, 2009). Para cuantificar las bacterias solubilizadoras de P (BSF) se usó el medio Pykoskaia (Martínez *et al.*, 2006); para conteo de las bacterias y hongos totales se usó el procedimiento de dilución en serie (Wollum, 1982), usando el medio de Bunt y Rovira (1955) pH 7.4; para contar bacterias totales se usó el medio de Martin (1950) pH 5.6, agregando 60 mg mL^{-1} penicilina, 40 mg mL^{-1} estreptomycin, y 70 mg mL^{-1} rosa bengala para contar hongos. Las placas fueron incubadas 24 h a 30°C para bacterias totales, 72 h para hongos totales y 96 h para BSF.

Los datos se analizaron con ANDEVA y las variables microbiológicas fueron convertidos en logaritmo. Para comparar las medias de los tratamientos se usó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), con el programa ASISTAT (Silva y Azevedo, 2009).

The experiment was established on September 14, 2012. The soil of containers was watered daily to maintain moisture close to 80 % of field capacity. At 30, 60 and 90 d after starting the experiment the soil was sampled to determine the content of available P (Bray-2), with the extraction methodology by Bray and Kurtz (1945), recommended in Cuba for soils with Ca predominance, mainly because it is convenient and inexpensive (Broggi *et al.*, 2010). In this method, we used a buffer solution of $\text{HCl } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ and $\text{NH}_4\text{F } 0.03 \text{ mol L}^{-1}$: 1 g of soil was weighed, placed in a centrifuge tube with screw cap, adding 7 mL of extraction solution; then it was placed for 40 s on a horizontal shaker, left to dwell for 16 h, centrifuged for 5 minutes at 748 g , and the soil P was determined using the method by Murphy and Riley (1962).

The P content in the soil was determined according to the method by Oniani (Pérez *et al.*, 2010), used in Cuba for carbonated soils. The 2 g samples of soil were shaken for 3 min with 5 mL of extraction solution ($\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 0.05 \text{ mol L}^{-1}$), filtered and P determined by the Murphy and Riley (1962) method.

While evaluating the content of P in the soil, the microbial population was determined: soil samples were placed in plastic bags, protected from light and kept in coolers and then taken to the laboratory; then they were sieved (2 mm mesh) with an adjusted humidity between 50 and 60 % of field capacity; packed in plastic bags with ventilation holes and kept in a cold room (4°C) (Cardoso *et al.*, 2009). To quantify P solubilizing bacteria (BSF) we used the Pykoskaia method (Martínez *et al.*, 2006); for counting the bacteria and fungi, we used the total serial dilution procedure (Wollum, 1982), and the Bunt and Rovira medium (1955) pH 7.4; to count total bacteria the Martin (1950) procedure was used pH 5.6, adding 60 mg mL^{-1} penicillin, 40 mg mL^{-1} streptomycin, and 70 mg mL^{-1} rose bengal to count fungi. The plates were incubated for 24 h at 30°C for total bacteria, 72 h for total fungi and 96 h for BSF.

Data were analyzed with ANOVA, and microbiological variables were converted into logarithm. To compare treatment means we used the Tukey test ($p \leq 0.05$) with ASISTAT program (Silva and Azevedo, 2009).

RESULTS AND DISCUSSION

The use of phosphate Araxá, Bayóvar® phosphate, TSP and Cuba phosphate, as well as filter cake with and without Azotofos enrichment did not change total bacterial and total fungi populations compared to the control (Table 1). The biofertilizer treatment increased the number of solubilizing bacteria in the soil, irrespective of the source of

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El uso de fosfato de Araxá, fosfato Bayóvar®, SFT y fosfato de Cuba, así como la cachaza con y sin enriquecimiento con Azotofos no cambió las poblaciones de bacterias totales y hongos totales respecto al testigo (Cuadro 1). El tratamiento con biofertilizante aumentó el número de bacterias solubilizadoras en el suelo, independientemente de la fuente de fertilizante fosfatado. Pero los tratamientos no afectaron las BSF.

Por lo tanto, los valores más altos de las UFC observados en los tratamientos con cachaza enriquecida con biofertilizantes refuerzan la hipótesis de que la utilización de residuos orgánicos tiene una función fundamental para la actividad microbiana en los suelos agrícolas (Cardoso *et al.*, 1995). Resultados semejantes fueron observados por Nuernberg *et al.* (1984): el número de microorganismos dependió de la fertilización y se obtiene una mayor población en el suelo con fertilización mineral u órgano-mineral con relación al testigo (no fertilizado). Además, Nahas *et al.* (1994) estudiaron el efecto de inoculación de un hongo solubilizador de fosfato en maíz, y re-

phosphate fertilizers. But the treatments did not affect the BSF.

Thus, the highest values in the UFC observed in the treatments with filter cake enriched with biofertilizers reinforce the hypothesis that the use of organic waste is fundamental to microbial activity in agricultural soils (Cardoso *et al.*, 1995). Similar results were observed by Nuernberg *et al.* (1984): the number of microorganisms depended on fertilization and an increased population was obtained in the soil with mineral or organic-mineral fertilization in relation to the control (not fertilized). Furthermore, Nahas *et al.* (1994) studied the effect of inoculation of a phosphate solubilizing fungus on maize, and report that organic matter treatments increased the number of bacteria and fungi.

The content of P in the soil evaluated with the Bray-2 and Oniani methods at 30 d was influenced by the treatments compared to the control. Similar results were reported by Resende *et al.* (2006a), who detected a difference in the content of P in the soil between the average of the factorial and the control (no P).

The action of microorganisms present in the filter cake did not increase the soil P content probably

Cuadro 1. Población microbiológica y contenido de P disponible en suelo tratado con fuentes de P en presencia y ausencia del compuesto orgánico enriquecido con biofertilizante a los 30 días de iniciar el experimento; Cienfuegos, Cuba, 2012.
Table 1. Microbiological population and content of available P in the soil treated with P sources in the presence and absence of organic compound enriched with biofertilizer 30 days after the start of the experiment; Cienfuegos, Cuba, 2012.

Fuentes de P	Bacterias totales	Hongos totales	BSF	P (Bray-2)	P (Oniani)
	UFC g ⁻¹ suelo			mg kg ⁻¹	
Fosfato de Araxá	9.0	5.8	5.6	12.1	26.2
Fosfato Bayóvar®	9.1	5.6	5.6	11.9	27.7
Superfosfato Triple	9.1	5.8	5.8	12.6	23.6
Fosfato de Cuba	9.0	5.8	5.8	12.4	26.4
Compuesto orgánico					
Con enriquecimiento	9.0	5.8	5.8 a	12.4	26.2
Sin enriquecimiento	9.1	5.7	5.5 b	12.2	25.8
	Valores de F				
Fuentes de P (P)	0.12 ns	2.28 ns	1.21 ns	0.46 ns	2.00 ns
Compuesto orgánico (C)	1.31 ns	3.39 ns	6.34 [†]	0.30 ns	0.11 ns
P x C	0.73 ns	0.64 ns	1.71 ns	2.15 ns	1.52 ns
Factorial x control	0.002 ns	1.84 ns	0.06 ns	109.80 [‡]	71.00 [‡]
Media del control	9.1	5.6	5.7	4.8 b	10.7 b
Media del factorial	9.1	5.8	5.7	12.3 a	26.0 a
CV (%)	3.7	2.8	5.4	10.2	12.2

ns=no significativo; [†]p≤0.05; [‡]p≤0.01. Las medias con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes (p≤0.05) ♦
 ns=not significant; [†]p≤0.05; [‡]p≤0.01. Means with a different letter in a column are statistically different (p≤0.05).

portan que los tratamientos con materia orgánica aumentaron el número de bacterias y hongos.

El contenido de P en el suelo, evaluado con los métodos Bray-2 y Oniani a los 30 d, fue influenciado por los tratamientos comparado con el testigo. Resultados semejantes fueron reportados por Resende *et al.* (2006a), quienes detectaron una diferencia en el contenido de P en el suelo entre la media del factorial y el testigo (sin P).

La acción de los microorganismos presentes en la cachaza no aumentó el contenido de P del suelo, probablemente debido al poco tiempo de incubación que permitiera aumentar la población y inducir una solubilización mayor de P. Pero en otros estudios aumentó el contenido de P soluble con aplicación de *Acidithiobacillus* a los 90 d de iniciar el experimento (Stamford *et al.*, 2004), y también con la aplicación de Azotofos a los 120 d del inicio del experimento (Lima *et al.*, 2007).

A los 60 d de iniciar el experimento los tratamientos aplicados, comparados con el testigo, no afectaron a la población de bacterias y hongos totales del suelo (Cuadro 2), pero sí influyeron sobre las bacterias solubilizadoras, y no hubo diferencia entre el uso de fuentes de P y el compuesto orgánico.

El suelo es un medio extremadamente complejo y, según Van-Veen (1997), la resistencia a la introducción de organismos se debe a factores bióticos y abióticos: predación por protozoarios, competencia con poblaciones indígenas, disponibilidad de sustratos orgánicos, y espacio en el suelo donde los microorganismos puedan estar protegidos contra el ataque de predadores. Entre los factores abióticos que impiden el crecimiento de las bacterias introducidas en los suelos destacan la textura, el tipo de arcilla, la temperatura y el pH.

Los tratamientos tuvieron efecto comparados con el testigo ($p \leq 0.01$) en el contenido de P en el suelo, evaluado por los métodos de Bray-2 y por el método Oniani, a los 60 d de iniciar el experimento (Cuadro 2). La acción de los microorganismos en la cachaza no cambió el contenido de P del suelo, debido principalmente al corto período de tiempo del experimento.

Los tratamientos con diferentes fuentes de P causaron efectos distintos ($p \leq 0.01$) en el contenido de P en el suelo, y el valor más alto fue con los tratamientos SFT (15.1 mg kg^{-1}). Este efecto del SFT, comparado con los fosfatos naturales, también ocurrió en estudios en condiciones de campo con fosfato de

because of the short incubation time that would lead to increase the population and induce a greater solubilization of P. But in other studies the content of soluble P increased with the application of *Acidithiobacillus* 90 d after starting the experiment (Stamford *et al.*, 2004), and also with the application of Azotofos after 120 d of initiating the experiment (Lima *et al.*, 2007).

At 60 d of starting the experiment, we found that the applied treatments compared to the control did not affect the population of total bacteria and fungi in the soil (Table 2), but did influence solubilizing bacteria, and there was no difference between the use of P sources and the organic compound.

The soil is an extremely complex medium and, according to Van Veen (1997), resistance to the introduction of organisms is due to biotic and abiotic factors: protozoan predation, competition with indigenous populations, availability of organic substrates, and soil space where microorganisms may be protected from the attack by predators. Among the abiotic factors impeding the growth of bacteria introduced into the soil the most relevant are texture, clay type, temperature, and pH.

Compared to the control, treatments had an effect ($p \leq 0.01$) on the P content of the soil evaluated with the methods by Bray-2 and Oniani at 60 d of initiating the experiment (Table 2). The action of microorganisms on the filter cake did not change the content of P in the soil mostly due to the short time of the experiment.

Treatments with different P sources caused different effects ($p \leq 0.01$) on the content of P in the soil, and the highest value was with TSP treatments (15.1 mg kg^{-1}). This TSP effect, compared to natural phosphates, also occurred in studies under field conditions with Gafsa phosphate (Frndoloso *et al.*, 2010) and Arad phosphate (Ernani *et al.*, 2001).

Despite the beneficial effects of various microorganisms that solubilize soil P, generally they are not sufficiently numerous to compete with other organisms present in the rhizosphere; moreover, the P released by these microorganisms is not enough to increase the content of P in the soil (Rodríguez and Fraga, 1999). This ineffectiveness of microorganisms to release P is because the amount of solubilized P is too small to meet the needs of these organisms, and insufficient to promote significant increases in

Cuadro 2. Población microbiológica y contenido de P disponible en suelo tratado con fuentes de P en presencia y ausencia del compuesto orgánico enriquecido con biofertilizante a los 60 días de iniciado el experimento; Cienfuegos, Cuba, 2012.
Table 2. Microbiological population and content of available P in the soil treated with P sources with and without an organic compound enriched with biofertilizer at 60 days of initiating the experiment; Cienfuegos, Cuba, 2012.

Fuentes de P	Bacterias totales	Hongos totales	BSF	P (Bray-2)	P (Oniani)
	UFC g ⁻¹ suelo			mg kg ⁻¹	
Fosfato de Araxá	10.0	5.8	6.1	10.6 b	22.4
Fosfato Bayóvar*	10.0	5.8	6.3	11.1 b	25.3
Superfosfato Triple	9.9	5.8	6.5	15.1 a	26.5
Fosfato de Cuba	9.5	5.9	6.6	10.9 b	24.7
Compuesto orgánico					
Con enriquecimiento	9.9	5.8	6.5	12.3	25.0
Sin enriquecimiento	9.8	5.8	6.3	11.6	24.5
Valores de F					
Fuentes de P (P)	2.44 ns	0.90 ns	1.79 ns	5.12 [‡]	1.11 ns
Compuesto orgánico (C)	0.44 ns	2.56 ns	3.23 ns	0.52 ns	0.07 ns
P x C	1.04 ns	0.49 ns	2.24 ns	0.60 ns	0.64 ns
Factorial x control	1.13 ns	0.16 ns	7.26 [†]	25.25 [‡]	34.17 [‡]
Media del control	9.6	5.8	5.8 b	4.7 b	10.2 b
Media del factorial	9.9	5.8	6.4 a	11.9 a	24.7 a
CV (%)	4.0	1.9	5.8	20.8	17.6

ns=no significativo; [†]p≤0.05; [‡]p≤0.01. Las medias con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes (p≤0.05) ♦
 ns=not significant; [†]p≤0.05; [‡]p≤0.01. Means with a different letter in a column are statistically different (p≤0.05).

Gafsa (Frاندولoso *et al.*, 2010) y con fosfato de Arad (Ernani *et al.*, 2001).

A pesar de los efectos benéficos de varios microorganismos que solubilizan el P en el suelo, por lo general no son bastante numerosos para competir con otros organismos presentes en la rizósfera; además, el P liberado por esos microorganismos no es suficiente para aumentar el contenido de P en el suelo (Rodríguez y Fraga, 1999). Esta ineffectividad de los microorganismos para liberar el P se debe a que la cantidad de P solubilizado es muy escasa para suplir las necesidades de esos organismos, y es insuficiente para promover aumentos significativos en la cantidad del P necesario para las plantas (Kucey *et al.*, 1989; Richardson, 1994; Richardson, 2001).

A los 90 d de iniciar el experimento las poblaciones de microorganismos en el suelo no fueron afectadas por los tipos de fosfatos aplicados ni por el compuesto orgánico enriquecido (Cuadro 3), y con el tiempo se redujo el efecto de los tratamientos. Estos resultados concuerdan con los de Barroti y Nahas (2000), quienes no detectaron aumentos en las poblaciones de bacterias y hongos en los suelos, al utilizar superfosfato simple y fosfato de Araxá en los cultivos tratados.

the amount of P needed for plants (Kucey *et al.*, 1989, Richardson, 1994, Richardson, 2001).

At 90 d of starting the experiment the populations of microorganisms in the soil were not affected by the types of phosphates applied, nor by the enriched organic compound (Table 3), and over time the effect of treatments decreased. These results agree with those by Barroti and Nahas (2000), who did not detect increases in populations of bacteria and fungi in the soil when using simple superphosphate and Araxá phosphate in the crops treated.

The BSF populations depend on the different physical and chemical properties of organic matter content and soil P, and on agricultural practices (Kim *et al.*, 1998). The no influence of P fertilization on the bacteria of soils, either cultivated or not, was also noted by Sagardoy and Salerno (1983). But according to Nuernberg *et al.* (1984), the number of microorganisms depended on fertilization and a larger population was obtained with mineral or organic-mineral fertilization compared to the control (not fertilized). Nahas and Assis (1991) reported that the number of fungi, unlike bacteria, did not change with the addition of nutrients in the soil.

Cuadro 3. Población microbológica y contenido de P disponible en suelo tratado con fuentes de P con y sin compuesto orgánico enriquecido con biofertilizante a los 90 días después de iniciar el experimento; Cienfuegos, Cuba, 2012.**Table 3. Microbiological population and content of available P in the soil treated with P sources with and without an organic compound enriched with biofertilizer 90 days after starting the experiment; Cienfuegos, Cuba, 2012.**

Fuentes de P	Bacterias totales	Hongos totales	BSF	P (Bray-2)	P (Oniani)
	UFC g ⁻¹ suelo			mg kg ⁻¹	
Fosfato de Araxá	10.3	5.7	6.6	8.8 b	19.7
Fosfato Bayóvar*	10.1	5.8	6.0	8.8 b	19.2
Superfosfato Triple	9.9	5.7	6.0	12.3 a	21.7
Fosfato de Cuba	10.1	5.8	6.5	9.5 b	21.5
Compuesto orgánico					
Con enriquecimiento	10.3	5.8	6.2	10.1	20.6
Sin enriquecimiento	9.9	5.8	6.4	10.0	20.4
Valores de F					
Fuentes de P(P)	0.26 ns	1.53 ns	1.77 ns	7.39 [†]	0.73 ns
Compuesto orgánico(C)	1.91 ns	0.11 ns	0.59 ns	0.04 ns	0.02 ns
P x C	2.38 ns	2.74 ns	1.38 ns	0.33 ns	0.73 ns
Factorial x control	2.02 ns	0.22 ns	1.61 ns	48.54 [†]	27.75 [†]
Media del control	9.5	5.8	6.7	4.1 b	9.1 b
Media del factorial	10.1	5.8	6.3	9.5 a	20.5 a
CV (%)	6.7	1.6	9.1	14.9	18.4

ns=no significativo; [†]p≤0.05; *p≤0.01. Las medias con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes (p≤0.05) ♦
 ns=not significant; [†]p≤0.05; *p≤0.01. Means with a different letter in a column are statistically different (p≤0.05).

Las poblaciones de BSF dependen de las diferentes propiedades físicas y químicas, del contenido de materia orgánica, y de el P del suelo, así como de las prácticas agrícolas (Kim *et al.*, 1998). La no influencia de la fertilización fosfatada sobre las bacterias de los suelos, cultivados o no, también fue señalada por Sagardoy y Salerno (1983). Pero según Nuernberg *et al.* (1984), el número de microorganismos fue dependiente de la fertilización y se obtiene una mayor población en el suelo con fertilización mineral u órgano-mineral respecto al testigo (no fertilizado). Nahas y Assis (1991) reportaron que el número de hongos, a diferencia de las bacterias, no cambió con la incorporación de nutrimentos en el suelo.

Mientras que las bacterias crecen en un estrecho intervalo de pH más cercano a la neutralidad, los hongos crecen bien en medio ácido con un rango de pH más amplio (Alexander, 1977). Estas características explican por qué las bacterias respondieron más en el tipo de suelo utilizado (pH 6.9), mientras que los hongos no respondieron.

Hubo diferencia entre los tratamientos y el testigo (p≤0.01), en el contenido de P medido por el método Bray-2 y Oniani 90 d después de iniciar el experimento. Así, la acción de los microorganismos en la cachaza no

While bacteria grow in a narrow pH range close to neutrality, fungi grow well in an acidic medium with a wider range of pH (Alexander, 1977). These characteristics explain why bacteria showed a greater response in the type of soil used (6.9 pH), whereas fungi did not respond.

There were differences between the treatments and the control (p≤0.01) in the content of P measured by the Bray-2 and Oniani method 90 d after starting the experiment. Thus, we showed that the action of microorganisms in the filter cake was not important to raise soil P content. But this variable, evaluated with the Bray-2 method at 90 d, was undoubtedly affected by the type of phosphate fertilizer used (p≤0.01), regardless of whether the organic compound was enriched or not with biofertilizer. The highest concentration of P (12.3 mg kg⁻¹) was obtained with TSP, which is similar to what happened after 60 d. Therefore, differences in the content of available P detected by the Bray-2 and Oniani method were not sufficient to cause changes in total bacteria and fungi, or in the BSF.

These results are related to the high solubility of the TSP (acidic fertilizer), which favors the immediate responses of greater availability of P

fue importante para elevar el contenido de P del suelo. Pero esta variable, evaluada con el método Bray-2 a los 90 d, sí fue afectada por el tipo de fertilizante fosfatado empleado ($p \leq 0.01$), ya sea que el compuesto orgánico fuera enriquecido o no con biofertilizante. La mayor concentración de P (12.3 mg kg^{-1}) se obtuvo con SFT, lo cual se asemeja a lo ocurrido a los 60 d. Por lo tanto, las diferencias en el contenido de P disponible detectado por el método Bray-2 y Oniani no fueron suficientes para causar cambios en las bacterias totales y los hongos, ni en las BSF.

Estos resultados están relacionados con una solubilidad alta del SFT (fertilizante acidulado), lo que favorece las respuestas inmediatas de mayor disponibilidad de P (Resende *et al.*, 2006b). Según Ernani *et al.* (2001), los menores valores de P en el suelo ocurrieron al aplicar fosfato natural de Arad, de acuerdo con la menor solubilización de este fosfato. Otro factor que pudo contribuir al contenido bajo de P causados por los fosfatos naturales, es el pH alto (6.9) del suelo. El comportamiento de los fosfatos naturales es diferente porque dependen primeramente de la solubilización, la cual es favorecida por el contacto con el suelo y por la presencia H^+ (He *et al.*, 1996). Así, el pH del suelo, especialmente en las microrregiones alrededor de los gránulos de fertilizantes, es una variable del suelo con gran influencia en la disponibilidad de P para los vegetales, por su influencia sobre la disponibilidad de los fosfatos naturales (He *et al.*, 1996).

Los microorganismos no cambiaron la solubilización de los fosfatos debido a que este proceso resulta de la combinación de la reducción de pH y la producción de ácidos orgánicos por los microorganismos (Fankem *et al.*, 2006) los cuales, mediante las secreciones de diferentes tipos de ácidos orgánicos como ácido carboxílico (Deubel y Merbach, 2005) y la reducción de pH por otros factores, disocian el fosfato de calcio; esto también depende de la capacidad amortiguadora del medio (Stephen y Jisha, 2009).

En este sentido, Ernani *et al.* (2001) verificaron el buen comportamiento del fosfato natural de Arad para aumentar el rendimiento de la materia seca del maíz en suelo no calcáreo (pH en H_2O igual a 4.7), con relación al suelo calcáreo (pH en H_2O igual a 5.7), debido probablemente a la mayor disolución del fosfato natural en condiciones de pH bajo.

(Resende *et al.*, 2006b). According to Ernani *et al.* (2001), the lowest values of P in the soil occurred when applying Arad natural phosphate, in accordance with the lower solubilization of this phosphate. Another factor that could contribute to low P caused by natural phosphates is the high pH (6.9) of the soil. The behavior of natural phosphates is different because they depend primarily on solubilization, which is favored by contact with the soil and the presence of H^+ (He *et al.*, 1996). Thus soil pH, especially in the micro-regions around the fertilizer granules, is a variable of great influence on soil P availability for plants because of its influence on the availability of natural phosphates (He *et al.*, 1996).

Microorganisms did not affect solubilization of phosphates which was due to the fact that this process is a combination of pH reduction and the production of organic acids by microorganisms (Fankem *et al.*, 2006). From secretions of different types of organic acids such as carboxylic acid (Deubel and Merbach, 2005) and pH reduction as a result of other factors, these microorganisms dissociate the calcium phosphate, which also depends on the buffer capacity of the medium (Stephen and Jisha, 2009).

In this respect, Ernani *et al.* (2001) verified the good performance of the Arad natural phosphate to increase the yield of maize dry matter in non calcareous soil (pH in H_2O equal to 4.7) relative to the calcareous soil (pH in H_2O equal to 5.7), due probably to a higher dissolution of natural phosphate under low pH conditions.

CONCLUSIONS

The use of filter cake enriched with microorganisms associated with various P sources applied to the soil with high P content was not important to alter populations of total solubilizing bacteria, and soil fungi in the short term.

Triple superphosphate promoted the highest levels of P in the soil, irrespective of the presence of the organic compound enriched with P solubilizing microorganisms.

—End of the English version—

—*—

CONCLUSIONES

El uso de cachaza enriquecida con microorganismos asociada con diferentes fuentes de P aplicadas al suelo con alto contenido de P no fue importante para alterar las poblaciones de bacterias totales y solubilizadoras, y hongos del suelo a corto plazo.

El superfosfato triple promovió los niveles mayores de P en el suelo, independientemente de la presencia del compuesto orgánico enriquecido con microorganismos solubilizadores de P.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al programa CAPES/MES por la oportunidad de tener acceso a la bolsa de intercambio.

LITERATURA CITADA

- Alexander, M. 1977. Introduction to Soil Microbiology. New York: J. Wiley. 467p.
- Barroti, G., e E. Nahas. 2000. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. *Pesq. Agropec. Bras.* 35(10): 2043-2050.
- Bataglia, O. C., A. M. C. Furlani, J. P. F. Teixeira, P. R. Furlani, e J. R. Gallo. 1983. Métodos de análise química de plantas. Campinas: Instituto Agronômico, 49 p.
- Bray, R. H., and L. T. Kurtz. 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci.* 59: 39-45.
- Broggi, F., F. J. Freire, M. B. G. S. Freire, C. W. A. Nascimento, e A. C. Oliveira. 2010. Avaliação da disponibilidade, adsorção e níveis críticos de fósforo em diferentes solos. *Rev. Ceres.* 57(2): 247-252.
- Bunt, J. S., and A. D. Rovira. 1955. Microbiological studies of some subantarctic soils. *J. Soil Sci.* 6: 119-128.
- Cardoso, E. J. B. N., M. C. Jahnel, e R. Melloni. 1995. Avaliação da maturação do composto de lixo urbano. In: *Anais do Congresso Brasileiro de Ciência do Solo*. 1995. Viçosa, Brasil: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo (Ed). 2297p.
- Cardoso, E. L., M. L. N. Silva, F. M. S. Moreira, e N. Curi. 2009. Atributos biológicos indicadores da qualidade do solo em pastagem cultivada e nativa no Pantanal. *Pesq. Agropec. Bras.* 44: 631-637.
- Deubel, A., and W. Merbach. 2005. Influence of microorganisms on phosphorus bioavailability in soils. In: F. Buscot, and A. Varma (eds). *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany. 62 p.
- Erich, M. S., C. B. Fitzgerald, and G. A. Porter. 2002. The effect of organic amendments on phosphorus chemistry in a potato cropping system. *Agric. Ecosyst. Environ.* 88: 79-88.
- Ernani, P. R., C. Steckling, e C. Bayer. 2001. Características químicas de solo e rendimento de massa seca de milho em função do método de aplicação de fosfatos, em dois níveis de acidez. *Rev. Bras. Ciênc. Solo.* 25: 939-946.
- Fankem, H., D. Nwaga, A. Deubel, L. Dieng, W. Merbach, and F. X. Etoa. 2006. Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. *Afr. J. Biotech.* 5: 2450-2460.
- Franceloso, J. F., M. C. Lana, S. Fontaniva, e R. V. Czcza. 2010. Eficiência de adubos fosfatados associados ao enxofre elementar na cultura do milho. *Rev. Ceres.* 57: 686-694.
- Guppy, C. N., N. W. Menzies, P. W. Moody, and F. P. C. Blamey. 2005. Competitive sorption reactions between phosphorus and organic matter in soil: a review. *Austr. J. Soil Res.* 43: 189-202.
- He, Z. L., V. C. Baligar, D. C. Martens, K. D. Ritchey, and W. D. Kemper. 1996. Factors affecting phosphate rock dissolution in acid soil amended with liming materials and cellulose. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 60: 1596-1601.
- Hernández, A., J. M. Pérez, y D. Bosh. 1999. Nueva versión de la clasificación genética de los suelos de Cuba, "Reglas de clasificación". Instituto de Suelos. MINAG. Ciudad de la Habana, Cuba. 25 p.
- Iyamuremye, F., and R. P. Dick. 1996. Organic amendments and phosphorus sorption by soils. *Adv. Agr. J.* 75: 457-461.
- Kim, K. Y., D. Jordan, and G. A. McDonald. 1998. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biol. Fert. Soils* 26: 79-87.
- Korndörfer, G. H., and S. P. Melo. 2009. Fontes de fósforo (fluida ou sólida) na produtividade agrícola e industrial da cana-de-açúcar. *Ciênc. Agrotec.* 33(1): 92-97.
- Korndörfer, G. H., and D. L. Anderson. 1997. Use and impact of sugar-alcohol residues vinasse and filter cake on sugarcane production in Brazil. *Sugar Azucar* 92: 26-35.
- Kucey, R. M. N., H. H. Janzen, and M. E. Leggett. 1989. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Adv. Agr.* 41: 199-228.
- Lima, R. C. M., N. P. Stamford, C. E. R. S. Santos, e S. H. L. Dias. 2007. Rendimento da alface e atributos químicos de um Latossolo em função da aplicação de biofertilizantes de rochas com fósforo e potássio. *Hortic. Bras.* 25: 224-229.
- Malavolta, E. 1981. Manual de Química Agrícola: Adubos e Adubação. São Paulo, Agronômica Ceres. 594 p.
- Martin, J. P. 1950. Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Sci.* 69: 215-232.
- Martínez, V. R., M. Lopez, F. M. Brossard, G. G. Tejada, A. H. Pereira, Z. C. Parra, S. J. Rodríguez, e A. Alba. 2006. Procedimientos para el Estudio y Fabricación de Biofertilizantes Bacterianos. Maracay, Venezuela. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. 88 p. (Serie B n° 11).
- Mendes, I. C., e F. B. Reis Junior. 2003. Microorganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos: uma análise crítica. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 26 p.
- Murphy, J., and J. P. Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27: 31-36.
- Nahas, E., e L. C. Assis. 1991. Efeito da adição ao solo de fosfato solúvel obtido por via microbiológica a partir de fluorapatita. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 33: 225-229.

- Nahas, E., D. J. Fornasieri, e L. C. Assis. 1994. Resposta à inoculação de fungo solubilizador de fósforo em milho. *Sci. Agric.* 51:463-469.
- Nuernberg, N. J., C. Vidor, e J. G. Stammel. 1984. Efeito de sucessões de culturas e tipos de adubação na densidade populacional e atividade microbiana do solo. *Rev. Bras. Ciênc. Solo.* 8 :197-203.
- Pérez, V. M. P., J. M. C. Naranjo, M. C. Valdés, Y. B. Benítez, T. C. H. García, y M. C. Contreras. 2010. Manual de Técnicas Analíticas para Análisis de Suelo, Foliar, Abonos Orgánicos y Fertilizantes Químicos. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). 157 p.
- Raij, B. van, H. Cantarella, J. A. Quaggio, e A. M. C. Furlani. 2001. Análise Química para Avaliação da Fertilidade do Solo. Campinas: Instituto Agronômico. 285 p.
- Raij, B. van. 2011. Fertilidade do Solo e Manejo de Nutrientes. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute. 420 p.
- Resende, A. V., A. E. Furtini Neto, V. M. C. Alves, J. A. Muniz, N. Curi, V. Faquin, D. I. Kimpara, J. Z. L. Santos, e L. F. Carneiro. 2006a. Fontes e modos de aplicação de fósforo para o milho em solo cultivado da região do Cerrado. *Rev. Bras. Ciênc. Solo.* 30: 453-466.
- Resende, A. V., A. E. Furtini Neto, V. M. C. Alves, J. A. Muniz, N. Curi, e F. J. Lago. 2006b. Resposta do milho a fontes e modos de aplicação de fósforo durante três cultivos sucessivos em solo da região do Cerrado. *Ciênc. Agrotec.* 30: 458-466.
- Richardson, A. E. 1994. Soil Microorganisms and phosphorus availability. *In: Pankhurst, C. E., B. M. Doube, V. V. S. R. Gupta, and P. R. Grace (eds). Soil Biota Management in Sustainable Farming Systems.* Melbourne: CSIRO. pp: 50-62.
- Richardson, A. E. 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aus. J. Plant Phys.* 28: 897-906.
- Rodríguez, H., and R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and heir role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17: 319-339.
- Sagardoy, M. A., and C. M. Salerno. 1983. Number, distribution, and characterization of heterotrophic bacteria in some Argentine soils. *Anales Edaf. Agrobi.* 42: 2069-2081.
- Santos, D. R., L. C. Gatiboni, e J. Kaminski. 2008. Fatores que afetam a disponibilidade do fósforo e o manejo da adubação fosfatada em solos sob sistema plantio direto. *Ciência Rural* 38: 576-586.
- Silva, F. A. S., and C. A. V. Azevedo. 2009. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. *In: World Congress on Computers in Agriculture, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers.* pp: 393-396.
- Soil Survey Staff. 2010. Keys to Soil Taxonomy. 11th ed. USDA-Natural Resources Conservation Service. Washington, DC. 338 p.
- Stamford, N. P., A. M. M. F. Moura, K. S. Santos, e P. R. Santos. 2004. Atuação de *Acidithiobacillus* na solubilização de fosfato natural em solo de tabuleiro cultivado com jacatupé (*Pachyrhizuserosus*). *Rev. Bras. Ciência Solo.* 28: 75-83.
- Stephen, J., and M. S. Jisha. 2009. Buffering reduces phosphate solubilizing ability of selected strains of bacteria. *World J. Agric. Sci.* 5: 135-137.
- Van Veen, J. A., L. S. Overbeek, and J. D. Van Elsas. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microb. Molecular Biol. Rev.* 61: 121-135.
- Wollum, A. G. 1982. Cultural methods for soil microorganisms. *In: Page, A. L., R. H. Miller, and D. R. Keeney (eds). Methods of Soil Analysis.* Madison: Soil Science Society of America, pp: 781-802.
- Young, C. C. 1990. Effects of phosphorus-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of tree species in subtropical-tropical soils. *Soil Sci. Plant Nutrition* 36: 225-231.