

Isolamento e caracterização macromorfológica de microrganismos solubilizadores de fósforo presentes na rizosfera de milho

Michele da Silva Campos², Christiane Abreu de Oliveira Paiva³ e Ivanildo Evódio Marriel³

1 Trabalho financiado pelo CNP e Fapemig;

2 Estudante do Curso de Técnico em Meio Ambiente, Escola Técnica de Sete Lagoas, Bolsista BIC JR) do Convênio Fapemig/CNPq/Embrapa/ FAPED;

3 Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro tem parcela relevante de participação no cenário da economia nacional. Neste aspecto, a cultura do milho se destaca. Considerando que a agroindústria de rações de aves, suínos e bovinos é composta basicamente por farelo de soja e de milho, tornando o milho uma *commodity* estratégica para a expansão do agronegócio brasileiro.

A cultura do milho exige alta demanda por nutrientes. Dentre os macronutrientes essenciais às plantas de milho, o fósforo (P) constitui um dos fatores limitantes da produção agrícola devida a sua importância no metabolismo vegetal, atuação nas funções fisiológicas básicas das células e em vários processos biológicos, como fotossíntese e respiração celular.

A fertilidade do solo de regiões tropicais, mais especificamente em regiões de Cerrado, fica substancialmente limitada pela baixa disponibilidade natural de P, uma vez que a deficiência desse elemento no solo acarreta alterações no metabolismo das plantas e pode prejudicar o fluxo de energia e a produção de carboidratos, gerando perdas de produtividade e até mesmo inviabilidade da safra (Abreu, 2014).

Os microrganismos são reconhecidos por suas habilidades em promover transformações bioquímicas dos nutrientes e por sua importância em prover vários elementos nutritivos de interesse das plantas. Microrganismos solubilizadores de fósforo (MSP) estão sendo utilizados como alternativa para aperfeiçoar a eficiência na utilização de P no solo disponibilizando-o para as plantas, através do fluxo de P pela biomassa microbiana, pela solubilização do P inorgânico, pela mineralização do P orgânico, pela atividade enzimática de fosfatases, entre outros mecanismos.

Uma maior compreensão da capacidade da comunidade microbiana da cultura de milho em solubilizar fosfatos poderá favorecer a seleção de microrganismos potencialmente úteis para aumentar a disponibilidade de P para a agricultura. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi selecionar e caracterizar macromorfológicamente MSP presentes na rizosfera de

milho. Posteriormente os MSP selecionados serão utilizados em ensaios para avaliar a dinâmica da atividade metabólica desses microrganismos como indicadores da ciclagem de fósforo no solo.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

As amostras de solo rizosférico foram coletadas em experimento de campo contendo milho no estágio de floração, plantado em latossolo vermelho distrófico na Embrapa Milho e Sorgo (19°28'S 44°15'W), município de Sete Lagoas-MG, na safra 2015.

Isolamento de microrganismos

As amostras de solo foram coletadas de acordo com Oliveira et al. (2009), considerando-se como solo rizosférico o solo mais fortemente aderido à raiz após agitação.

Para o isolamento de MSP, 5 g de solo rizosférico foram peneirados, acrescentados a 45 mL de solução salina 0,85% e homogeneizados por 30 minutos. Após homogeneização, uma alíquota de 1 mL foi retirada para se proceder às diluições seriadas decimais (10^{-3} a 10^{-5}). Posteriormente, uma alíquota de 100 μ L de cada diluição seriada foi plaqueada em meio de cultura NBRIP (*National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium*) (Nautiyal, 1999) e Fitato (Richardson & Hadobas 1997). As placas inoculadas foram incubadas a 25-28°C por até 10 dias, sendo o crescimento dos microrganismos acompanhado diariamente. Foram realizadas duas repetições para cada plaqueamento. No tratamento controle, as placas foram inoculadas com solução salina (0,85%) esterilizada.

Caracterização macromorfológica

A caracterização macromorfológica dos isolados bacterianos foi realizada segundo Hungria e Silva (2011), para os parâmetros forma, elevação, borda, tamanho e superfície. Para a caracterização dos isolados fúngicos, foram adotados os mesmos parâmetros de Hungria e Silva (2011), com modificações para os parâmetros tipo e consistência do micélio (Marriel 2015, comunicação pessoal).

Após o isolamento e caracterização macromorfológica, todos os microrganismos foram purificados e armazenados sob distintas formas: preservação em glicerol a -20 °C e -80 °C, preservação em óleo mineral, preservação segundo método de Castellani (1939) e preservação de micélios fúngicos a 8 °C.

Todos os morfotipos selecionados foram incorporados à Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo e posteriormente serão utilizados em ensaios do projeto de tese de doutorado de estudante vinculado à Universidade Federal de Minas Gerais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento de MSP

A partir das amostras de solo rizosférico, obtiveram-se 205 morfotipos bacterianos e 99 morfotipos fúngicos selecionados pelo crescimento e/ou formação de halo transparente indicador de solubilização (**Figura 1**) no meio de cultura. Esses resultados indicam o potencial solubilizador e mineralizador dos microrganismos isolados.

Em geral, a eficiência solubilizadora em meio sólido foi maior que a mineralizadora quando comparamos o número de isolados crescidos no meio NBRIP que obteve 135 isolados, em relação ao meio Fitato de sódio que obteve 169 isolados. O meio de cultura NBRIP contém fonte insolúvel de P na forma de fosfato tricálcio que na presença de cloreto de cálcio e substâncias liberadas pelos microrganismos, como ácidos orgânicos e enzimas no meio circundante, sofre processo de solubilização que é evidenciado pela formação de um halo translúcido ao redor das colônias que apresentam capacidade solubilizadora (Nautiyal, 1999; Souchie et al., 2005; Abreu, 2014).

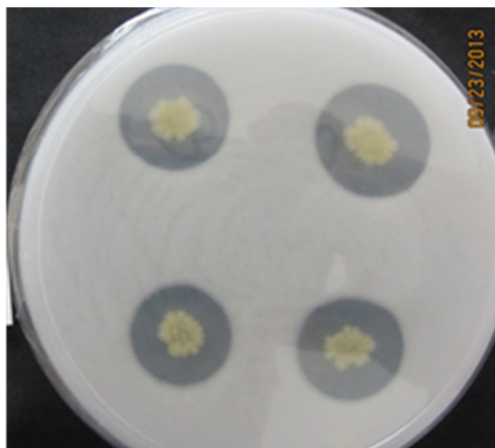


Figura 1 - Halo de solubilização em meio sólido NBRIP formado por microrganismos capazes de solubilizarem fosfato tricálcio, fonte exclusiva de fósforo adicionado ao meio de cultura. Halo translúcido ao redor da colônia indica processo de solubilização de fósforo.

Para a realização deste trabalho foram selecionados todos os morfotipos distintos que cresceram e formaram ou não halo de solubilização nos meios de cultura. Este critério de

seleção foi adotado visto que alguns autores como Whitelaw et al. (2000), relatam que o potencial de solubilização de fosfato é proporcional ao tamanho do halo e a sua relação com o tamanho da colônia. Porém, a confiabilidade desta técnica é questionável uma vez que isolados que não produzem qualquer halo visível indicativo de solubilização podem solubilizar formas insolúveis de fosfatos inorgânicos em meio líquido (Oliveira et al., 2009, Sousa, 2010).

Caracterização macromorfológica

Dentre todos os isolados caracterizados, houve variabilidade entre todos os parâmetros empregados para a caracterização macromorfológica. Estes resultados indicam uma possível diversidade entre os isolados, que será verificada posteriormente pela realização da caracterização molecular deles por meio do sequenciamento do DNA.

As bactérias obtiveram características distintas, mas em sua maioria obteve uma predominância frequente onde na cor obteve preponderância do branco e creme, na superfície entre lisa e gomosa, na forma circular, na borda inteira, na elevação convexa, e os tamanhos foram variados. Os fungos obtiveram variações em todos os parâmetros.

CONCLUSÃO

Neste trabalho foram isolados, a partir de amostras de solos rizosféricos de milho, 304 microrganismos solubilizadores de fósforo. A caracterização morfológica realizada permitiu identificar o fenótipo de cada cepa na coleção de microrganismos, facilitando o processo de purificação e reisolamento em novos cultivos e testes. Os resultados obtidos pela caracterização macromorfológica sustentam a importância da coleção de microrganismos, pois um dos focos da mesma é prospecção da biodiversidade, mediante manutenção, conservação e organização do acervo disponível, visando sua aplicação em pesquisas.

Os microrganismos desempenham papel fundamental na sustentabilidade da agricultura. No entanto, isolar, purificar e caracterizar esses microrganismos deve ser um processo base para trabalhos que visem à sustentabilidade de sistemas agrícolas.

REFERÊNCIAS

ABREU, C. S. de **Seleção e caracterização de bactérias endofíticas isoladas de plantas de milho com potencial para a biossolubilização de rochas fosfáticas**. 2014. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de São João Del Rei, Sete Lagoas.

CASTELLANI, A. **Viability of some pathogenic fungi in distilled water**. J. Trop.Med.Hyg., 42: 225-226, 1939.

HUNGRIA, M & SILVA, K. **Manual de curadores de germoplasma – Micro-organismos: rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Documentos 332 e 333, 20 p. Embrapa Soja e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 2011.

NAUTIYAL, C.S. **An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms**. FEMS Microbiol Lett, v.170, p. 265-270, 1999.

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

RICHARDSON, A. E.; HADOBAS, P. A. **Soil isolantes of Pseudomonas spp. That utilize inositol phosphates**. Canadian Journal Microbiology, Ottawa , v. 43, p. 509- 516, 1997.

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

SOUSA, C.B. **Solubilização de fósforo por bactérias endofíticas**. 2010. 38p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

WHITELAW, M. A. **Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi**. Advances in Agronomy, New York, v. 69, p. 99-151, 2000.