



## Potencial de microrganismos rizosféricos e endofíticos quanto à produção de fitases, fitormônios e biossolubilização de fósforo orgânico e inorgânico. <sup>(1)</sup>

**Vitória Palhares Ribeiro <sup>(2)</sup>; Christiane Abreu de Oliveira <sup>(3)</sup>; Eliane Aparecida Gomes <sup>(3)</sup> Ivanildo Evódio Marriel <sup>(3)</sup>; Maycon Campos de Oliveira <sup>(4)</sup>; Ralf Greiner <sup>(5)</sup>**

- (1) Trabalho executado com recursos da FAPEMIG, CNPq e Embrapa Milho e Sorgo,  
(2) Estudante; Centro Universitário de Sete Lagoas, Sete Lagoas, MG; vitypalhares18@hotmail.com;  
(3) Pesquisador (a) Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 285, 35701-970, Sete Lagoas, MG;  
(4) Analista B; Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 285, 35701-970, Sete Lagoas, MG Estudante;  
(5) Pesquisador, Max Rubner Instituto, Alemanha.

**RESUMO:** Os microrganismos da rizosfera contribuem significativamente para a solubilização e mineralização de fósforo (P) nas formas inorgânicas e orgânicas no solo, respectivamente. Como a quantidade de P orgânico no solo agrícola é aumentada com o plantio direto, microrganismos eficientes na mineralização desta forma de P podem ser promissores como inoculantes para plantas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial dos microrganismos da rizosfera e endofíticos de milho na solubilização e mineralização de P, além de selecionar estirpes produtoras de fitase e fitormônios (AIA) para uso como inoculantes de plantas. Nove rizobactérias e seis bactérias endofíticas de milho foram avaliadas quanto à solubilização de P em meio de cultura contendo fosfato de cálcio e fitato. O P solúvel produzido foi quantificado pelo método do molibdato de amônio modificado. A produção de AIA foi avaliada em meio de cultura líquido suplementado com triptofano. A estirpe B70, identificada como *Bacillus* sp., apresentou a maior solubilização de P em meio de cultura contendo fosfato de cálcio (167,8 mg P.mL<sup>-1</sup>) e a segunda maior produção de fitase intracelular (64mU.mL<sup>-1</sup>). A estirpe 1931 endofítica *Pantoea* sp. apresentou a maior produção de fitase intracelular (85 mU. mL<sup>-1</sup>), e AIA (140,31 µg.mL<sup>-1</sup>). Concluiu-se que as bactérias isoladas da rizosfera ou endofíticas de milho apresentam características de biossolubilização de P e de promoção do crescimento de plantas, sendo candidatas promissoras para futuros estudos de inoculação em plantas.

**Termos de indexação:** microrganismos biossolubilizadores de fosfato, fitase, auxina (AIA), inoculantes.

### INTRODUÇÃO

Em solos de Cerrado, a precipitação e a fixação de P são os principais responsáveis pela baixa eficiência dos fertilizantes fosfatados solúveis. Além do alto custo associado à aplicação de fertilizantes

fosfatados, o seu uso indiscriminado pode causar impactos negativos a ecossistemas, como eutrofização e hipoxia em ambientes aquáticos (Vance et al., 2003).

A procura por fontes alternativas à adubação solúvel tem direcionado as pesquisas por novas formas de aumento da aquisição de nutrientes, como o uso de microrganismos como agentes de promoção do crescimento e biossolubilização de nutrientes. Esses microrganismos são capazes de disponibilizar o fósforo complexado a Ca, Fe e Al no solo (Goldstein et al., 2003). Podem também desfosforilar o P de fontes orgânicas, pela liberação de enzimas fosfatases ou fitases, sendo, neste caso, denominados microrganismos mineralizadores de P (MMP) (Greiner, 2002).

Como a quantidade de fósforo orgânico tem aumentado nos solos sob plantio direto (Novais et al., 2007) e adubados com fertilizantes orgânicos, microrganismos que sejam eficientes na mineralização de P são ainda mais promissores como inoculantes.

Neste contexto, bactérias com ambas as atividades, produção de ácidos orgânicos para solubilizar P inorgânico e produtores de fitases, apresentam grande potencial de promoção de crescimento de plantas (Jorguera et al., 2008)

O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial de solubilização e mineralização de fosfato por microrganismos da rizosfera e endofíticos de milho, além de avaliar a produção de fitormônios e enzimas fitase a fim de selecionar novas estirpes para inoculantes.

### MATERIAL E MÉTODOS

As atividades foram realizadas utilizando as seis estirpes endofíticas e nove rizobactérias da Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo. A caracterização genética das estirpes foi realizada anteriormente por Abreu, 2014; Gomes et al., 2014.

**Análise do potencial das estirpes na**



### **solubilização P.**

As quinze estirpes foram avaliadas em meio líquido NBRIP (Nautiyal, 1999), contendo fosfato tricálcio fitato, como fonte de P. Colônias puras de cada uma foram crescidas em meio de cultura líquido TSB (*Trypticase Soy Broth*), durante cinco dias, à temperatura de 30°C. Alíquotas de 100 µL de cada suspensão de células padronizada foram transferidas para tubos de 50 mL contendo 15 mL de meio líquido NBRIP, com modificações na concentração de glicose para 40 g.L<sup>-1</sup>. Após períodos de incubação de 0, 3, 6 e 9 dias, determinaram-se os valores de pH e os teores de P liberado no sobrenadante. Para a determinação do fósforo solúvel, utilizou-se o método colorimétrico preconizado por Murphy e Riley (1962), modificado.

### **Produção da enzima fitase intra e extracelular**

Os microrganismos foram cultivados em meio mínimo M9 (Sambrook, 1989) modificado, onde o fosfato inorgânico foi substituído por 1% (p / v) de fitato de sódio e o pH 7,0 e cultivados aerobicamente a 30° C. Após 72 horas de incubação, as células foram colhidas por centrifugação a 7, 000g e 4° C durante 15 min e ressuspensas em tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 contendo CaCl<sub>2</sub> 2 mM.

Para determinação da fitase intracelular, as células dos microrganismos foram rompidas e os detritos celulares foram removidos por centrifugação a 10.000 g e 4 ° C durante 30 min. As medições da atividade de fitase foram realizadas a 37 ° C em pH 5,0 e 7,5, com cerca de 50 ul de cada amostra.

Após um período de incubação de 30 minutos, o fosfato liberado foi quantificado por uma modificação do método de molibdato de amônio (Heinonen e Lahti, 1981). A atividade enzimática (U) foi expressa em nmol de fosfato liberado por minuto, a partir de uma curva de calibração com 5-600nmol de fosfato.

### **Produção de ácido indol acético (AIA)**

Com a finalidade de avaliar a produção de AIA, auxina os microrganismos foram crescidos em meio de cultura TSB líquido, suplementado com diferentes concentrações de triptofano (0, 10, 20, 40, 80 µg mL<sup>-1</sup>), conforme descrito por Patten & Glick (1996).

O inóculo de cada bactéria foi padronizado pela leitura da densidade ótica = 1 a 540 nm e o ajuste da concentração de células em cada amostra foi realizado com a adição de solução salina. Após a inoculação, os microrganismos foram incubados a 30°C, sob agitação e na ausência de luz, por 48h.

Posteriormente, as células foram removidas por centrifugação (6000 RPM por 10 minutos) e a produção de AIA foi determinada colorimetricamente utilizando reagente de Salkowski (Tang & Bonner, 1947) e curva padrão de ácido indol acético.

### **Análise estatística**

Todos os ensaios foram realizados segundo o delineamento inteiramente casualizado com três repetições por amostra. A análise de variância foi realizada utilizando-se o programa Sisvar 5.3 (Ferreira, 2010) e, quando ocorreram diferenças significativas pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As análises de correlação de Pearson foram realizadas utilizando o programa EXCEL a 5% de probabilidade.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As estirpes bacterianas testadas na produção de AIA, solubilização de fósforo e produção de fitase extra e intracelular podem ser visualizadas na **Tabela 1**.

Dentre as nove rizobactérias e seis endofíticas avaliadas, a rizobactéria B70 (*Bacillus subtilus*) e a endobactéria 1932 (*Pantoea* sp.) apresentaram a maior solubilização de P em meio de cultura contendo fosfato de cálcio (167,8 mg P.mL<sup>-1</sup> e 138,21 mg P.mL<sup>-1</sup>, respectivamente) (**Tabela 1**).

As estirpes B70 (*B. subtilus*), B32 e B116 ambas *B. pumilus* apresentaram os maiores valores de liberação de P orgânico (93,79 mg P.mL<sup>-1</sup>; 55,49 mg P.mL<sup>-1</sup> e 52,69 mg P.mL<sup>-1</sup>, respectivamente) (**Tabela 1**).

A maior produção de fitase intracelular foi da estirpe 1931 (*Pantoea* sp.) liberando 85 mU. mL<sup>-1</sup>, seguida da cepa B70, que liberou 64 um. mL<sup>-1</sup> desta enzima. Isso demonstra o potencial destas estirpes em mineralizar o fósforo proveniente do fitato. O fitato está presente no solo como a forma orgânica do fósforo mais abundante na matéria orgânica do solo e é degradado por enzimas fosfomonoesterases, denominadas como fitases (Greiner, 2002).

Recentemente, pesquisas sobre o uso de microrganismos para aumentar a aquisição de P para as plantas eram dedicadas somente a microrganismos solubilizadores de fosfato inorgânico. No entanto, para utilizar o fósforo orgânico abundante nos solos e presente em sua maioria na forma de fitato (40%–50%), microrganismos que produzem fitases possuem um



importante papel na ciclagem do P no solo (Jorquera et al. 2008).

Um total de 18,7 % das bactérias endofíticas foram positivas para a síntese de AIA via L-triptofano (Tabela 1). Destas, a estirpe endofítica 1931 foi a que mais produziu o hormônio AIA (140,31  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), seguida da estirpe 1913 (108,12  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) diferindo significativamente das demais. (Figura 1).

Estes resultados de produção de AIA mostram o potencial desse endofítico 1931 e 1913, ambas *Pantoea* para a aplicação biotecnológica e ou uso como bioinoculantes na agricultura, por apresentarem mais de uma característica desejável para o incremento da produção vegetal. Além disso, produzir estes hormônios, ou seja, em ambiente protegido como o interior da planta, pode ser uma vantagem visto que estas substâncias podem ser exsudadas via raiz em condição de estresse mineral ou para aumentar seu potencial de nutrição e absorção de água.

## CONCLUSÕES

Os microrganismos da rizosfera e endofíticos de milho possuem características promissoras de biossolubilização e promoção de crescimento de planta. Além disso, o gênero *Bacillus* foi identificado como candidato para estudos futuros de inoculação em plantas.

## AGRADECIMENTOS

A Fapemig, CNPq, Embrapa Milho e Sorgo pela infraestrutura e recursos financeiros para a execução do trabalho.

## REFERÊNCIAS

ABREU, C.S. Seleção e caracterização de bactérias endofíticas isoladas de plantas de milho com potencial para biossolubilização de rochas fosfáticas. 2014. 47f. ; il. Dissertação de mestrado- **Universidade de São João Del Rei**. Sete Lagoas. 2014.

FERREIRA, D.F. **Sisvar** versão 5.3. DEX-UFLA, 2010.

GOLDSTEIN, A.; LESTER, T.; BROWN, J; Research on the metabolic engineering of the direct oxidation pathway for extraction of phosphate from ore has generated preliminary evidence for PQQ biosynthesis in *Escherichia coli* as well as a possible role for the highly conserved region of quinoprotein dehydrogenases. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 1647, p. 266-271, 2003.

GOMES, E; SILVA, U; MARRIEL, I; OLIVEIRA, C., LANA, U. Rock Phosphate Solubilizing Microorganisms Isolated

From Maize Rhizosphere Soil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, América do Norte, 13, jul. 2014.

GREINER, R.; LARSSON ALMINGER, M.; CARLSSON, N.-G.; MUZQUIZ, M.; BURBANO, C.; CUADRADO, C.; PEDROSA, M.M.; GOYOAGA, C. Pathway of dephosphorylation of *myo*-inositol hexakisphosphate by phytases of legume seeds. **J. Agric. Food Chem.**, 50: 6865-6870, 2002.

HEINONEN, J.K.; LAHTI, R.J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. **Analytical Biochemistry**, v.113, p.313-317, 1981.

JORQUERA M., HERNÁNDEZ M., RENGEL Z., MARSCHNER P. AND MORA M. Isolation of culturable phosphobacteria with both phytatemineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. **Biol. Fertil. Soils** 44: 1025– 1034, 2008.

MURPHY, J.; RILEY, J.P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Anal Chim Acta** , v. 27, p. 31–36, 1962.

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

PATTEN, C. L., and B. R. Glick. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Can. J. Microbiol.** 42:207-220. regulated by tyrr in *Enterobacter cloacae* UW5. **Journal of Bacteriology**. Washington, v. 190, n. 21 p. 7200–7208, 1996.

RODRÍGUEZ, H., FRAGA, R., GONZALEZ, T., BASHAN, Y. Genetics of Phosphate Solubilization and its Potential Applications for Improving Plant Growth-Promoting Bacteria. **Plant and Soil**, 287:15–21, 2006.

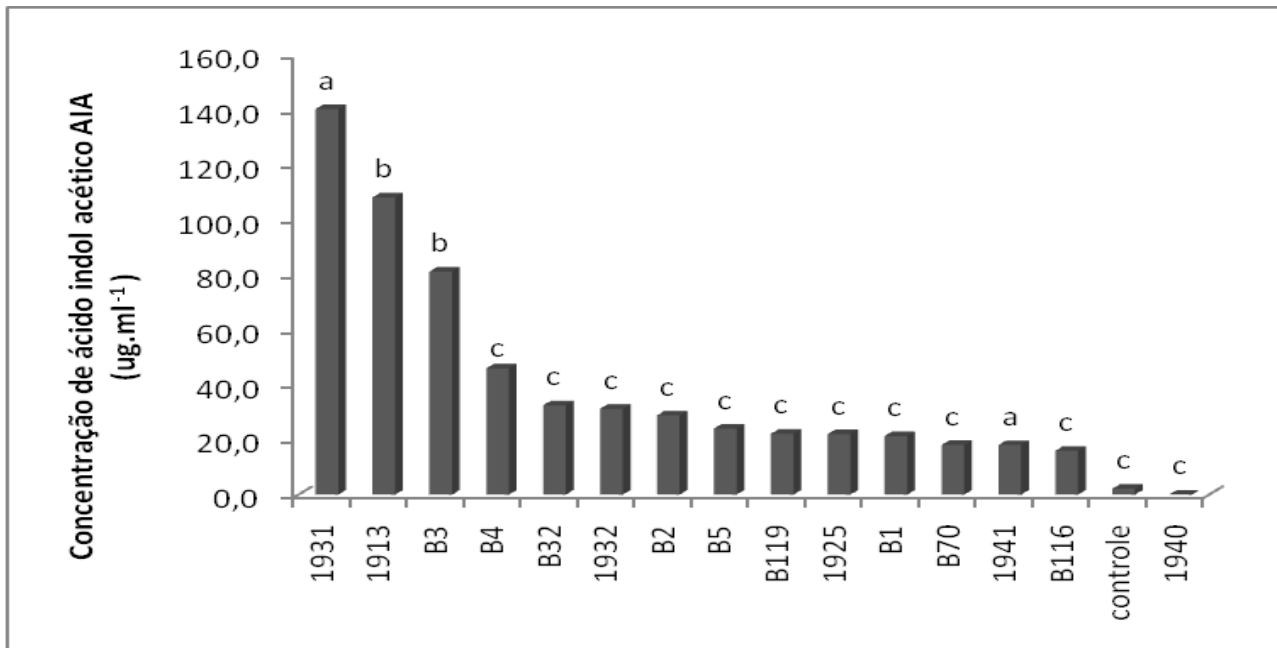
SAMBROOK, J; FRITSCH, E. F; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. New York; **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

TANG, Y.W. & BONNER, J. **The enzymatic inactivation of indoleacetic acid. I. some characteristics of the enzyme contained in pea seedlings.** **Arch. Biochem.** 13, 11-25, 1947.

VANCE, C.P; UHDE-STONE C; ALLAN, D.L. **Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource.** **New Phytol**157: 423–447. (2003).

**Tabela 1.** Produção de fitase, fósforo liberado em meio de cultura contendo fosfato de cálcio (P-Ca) ou fitato de cálcio (P-fitato) como única fonte de P e produção de AIA, por microrganismos rizosféricos e endofíticos.

Estirpe	Procedência	Identificação Genética	pH 5		pH 7,5		P-Ca(mg.L <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	P-Fitato(mg.L <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	AIA ul.gml <sup>-1</sup>
			Fitase Extracelular mU.mL <sup>-1</sup>	Fitase Intracelular mU.mL <sup>-1</sup>	Fitase Extracelular mU.mL <sup>-1</sup>	Fitase Intracelular mU.mL <sup>-1</sup>			
B2	Rizosfera gramínea Embrapa Milho e Sorgo	-	3	21	0	2	19,33	3,67	28,84
B3	Rizosfera gramínea Embrapa Milho e Sorgo	-	2	26	0	1	19,20	3,45	81,15
B1	Rizosfera gramínea Embrapa Milho e Sorgo	-	2	31	0	1	31,90	4,60	21,34
B4	Rizosfera gramínea Embrapa Milho e Sorgo	-	1	37	0	1	27,68	4,66	45,96
B5	Rizosfera gramínea Embrapa Milho e Sorgo	-	3	32	0	1	27,39	3,00	24,04
B32	Rizosfera milho Embrapa Milho e Sorgo	<i>Bacillus pumilus</i>	2	25	0	2	117,43	56,49	32,49
B70	Rizosfera milho Embrapa Milho e Sorgo	<i>Bacillus subtilis</i>	2	64	0	2	167,80	93,79	18,07
B116	Rizosfera milho Embrapa Milho e Sorgo	<i>Bacillus pumilus</i>	2	28	0	1	70,02	52,69	15,96
B119	Rizosfera milho Embrapa Milho e Sorgo	<i>Bacillus megaterium</i>	3	42	0	2	61,97	19,48	22,11
1913	Endofítica milho	<i>Pantoea dispersa</i>	0	26	0	1	-	-	108,12
1925	Endofítica milho	<i>Pantoea ananatis</i>	2	36	0	1	132,88	-	22,03
1931	Endofítica milho	<i>Pantoea sp</i>	0	85	0	5	134,21	-	140,31
1932	Endofítica milho	<i>Pantoea sp</i>	0	48	0	3	138,21	-	31,25
1940	Endofítica milho	<i>Bacillus aryabhatai</i>	1	31	0	3	-	-	0
1941	Endofítica milho	-	3	49	0	4	-	-	18,04



**Figura 1-** Produção de ácido indol acético (AIA) por bactérias endofíticas de milho. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).