

## CAPÍTULO IX

### MICRO-ORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO

*Ida Chapaval Pimentel  
Jair Alves Dionísio  
Diana Signor*

Entre os elementos essenciais, o fósforo (P) ocupa, após o nitrogênio (N), posição de destaque em relação à composição dos seres vivos, tendo em vista sua atuação estrutural, funcional e na transferência de energia. O fósforo ocorre no solo em quantidade total normalmente elevada, porém em baixas quantidades disponíveis para as culturas, principalmente nos solos tropicais. Diante dessas circunstâncias, a solubilização biológica causada pelos micro-organismos do solo surge como uma alternativa para elevar a disponibilidade de fósforo nessas regiões. Este fato tem despertado a atenção para a utilização desses micro-organismos como inoculante comercial ou no manejo de suas populações a fim de promover uma melhor utilização do P existente no solo ou daquele adicionado como fertilizante (SILVA FILHO; VIDOR, 2001).

Os micro-organismos solubilizadores de fosfato, que constituem um grupo funcional, estão presentes na maioria dos solos investigados e o processo de solubilização que realizam pode ser influenciado pelo tipo de solo, espécie e idade da planta. Com relação às plantas, há maior quantidade de bactérias solubilizadoras na rizosfera de leguminosas do que em gramíneas (NAHAS et al., 1994). Segundo Barroti e Nahas (2000), a população de micro-organismos solubilizadores varia de  $10^5$  a  $10^6$  células  $g^{-1}$  de solo seco em leguminosas forrageiras e de  $10^3$  a  $10^6$  células  $g^{-1}$  em gramíneas forrageiras.

Dentre os principais grupos microbianos que apresentam capacidade de solubilizar fosfato no solo destacam-se vários gêneros de bactérias, como *Bacillus*, *Thiobacillus*, *Mycobacterium*, *Micrococcus* entre outros; quanto aos fungos, os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Sclerotium* e *Rhizopus* apresentam atividade solubilizadora; para actinobactérias merece destaque o gênero *Streptomyces*. De acordo com Kucey (1983), os fungos são mais eficientes na solubilização do que as bactérias, mas estas são mais numerosas podendo atingir densidades populacionais de  $10^5$  a  $10^7$  por grama de solo.

Nahas et al. (1994), estudando micro-organismos solubilizadores de fosfato em diversos solos, avaliaram que o número de fungos solubilizadores em termos relativos (30,2 %) foi superior ao de bactérias (16,4 %). No mesmo estudo, afirmam ainda que os fatores que favorecem o aumento da população microbiana do solo também estimulam a população de solubilizadores.

De acordo com Eira (1992), o mecanismo básico de solubilização do fosfato se dá por três maneiras distintas: a) ácidos minerais fracos ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), formados a partir das excreções radiculares e do metabolismo respiratório dos micro-organismos; b) ácidos minerais fortes ( $\text{HNO}_2$ ,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), formados pela oxidação do nitrogênio e do enxofre, respectivamente; c) ácidos orgânicos (cítrico, oxálico, glucônico entre outros), formados no metabolismo microbiano ou excretados pelas plantas superiores.

A mineralização do fosfato ocorre por ação das enzimas fosfatases, oriundas da atividade de plantas e de micro-organismos, sobre o fósforo orgânico, também liberando fosfato disponível às plantas. Fungos apresentam atividade principalmente da fosfatase ácida, enquanto que, em bactérias, predomina a ação da fosfatase alcalina (EIRA, 1992). Segundo Dionísio (1996), a taxa de solubilização é maior em solos com mais material energético, como restos de cultura, disponíveis aos micro-organismos, resultando numa maior produção de ácidos orgânicos.

Os elementos C, N, Fe, Ca e K apresentam funções que sugerem as suas participações no processo de solubilização de fosfatos. O efeito da fonte de N tem sido relacionado ao balanço de íons absorvidos (FERNANDES; SOUZA, 1990; DARRAH, 1993). De modo geral, a solubilização aumenta com a absorção de fontes amoniacais e diminui com as nítricas. Reduções nos níveis de Fe, Ca e K interferem na síntese de várias enzimas e a diminuição destas, provoca acúmulo de ácidos orgânicos que vão contribuir para a solubilização do fosfato no solo (SILVA FILHO, 2001).

O manejo agrícola do solo também contribui para o tamanho e a atividade da população microbiana. Todavia, os fatores que regulam a composição da população microbiana não são, ainda, plenamente conhecidos, sendo esta uma importante área a ser explorada pela pesquisa. Mais importante do que o número de solubilizadores é a determinação da atividade da população existente no solo (SILVA FILHO; VIDOR, 2001).

Silva Filho e Vidor (1984) avaliaram a população microbiana do solo, na camada de 0 a 20 cm de profundidade, submetido a diferentes sistemas de manejo, no município de Santo Ângelo-RS, e observaram que a densidade populacional,

UFC g<sup>-1</sup> de solo, de solubilizadores de fosfato foi:  $13 \times 10^4$ ;  $48 \times 10^4$  e  $53 \times 10^4$ , respectivamente, solo erodido, plantio convencional e solo em recuperação.

Os micro-organismos solubilizadores de fosfatos inorgânicos representam um grande potencial para a agricultura em clima tropical, porém atualmente não é possível contar com essa tecnologia.

## PROTOCOLO VII

### CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO PELO MÉTODO DE SEMEADURA EM SUPERFÍCIE

#### 1. Material

- a) Solo úmido coletado da camada superficial, obtido conforme o Capítulo II (p. 14);
- b) Vidrarias: Erlenmeyer de 250 mL, tubos de ensaio de 15 mL com rosca, placas de Petri, alça de Drigalsky;
- c) Equipamentos: agitador mecânico, estufa de esterilização, estufa de incubação, capela de fluxo laminar, autoclave, peagâmetro, esterilizador infravermelho ou bico de Bunsen ou lamparina, agitador de tubos;
- d) Soluções: salina esterilizada (NaCl 0,85 %), Meio de cultura dextrose-extrato de levedura (Tabela 10);
- e) Outros: funil de plástico ( $\varnothing$  10 cm), micropipetas com ponteiros de 0,1 mL, peneira número 10 (abertura de 2,00 mm), parafilm, lixeira para resíduos biológicos, luvas de proteção (nitrílica descartável); gás butano; e,
- f) Alternativos: pipetas de 1,0 mL, algodão hidrofóbico e pera insufladora.

#### 2. Metodologia

- a) Pesar 10,00 g de solo úmido, obtido conforme o Capítulo II (p. 14), previamente tamizado, em peneira número 10 em duplicata, sendo uma parte destinada à contagem de micro-organismos solubilizadores de fosfato e a outra para a determinação da massa de solo seco (item 3);
- b) Transferir o solo, com um funil, para um Erlenmeyer de 250,0 mL contendo cinco esferas de vidro e 90,0 mL de solução salina esterilizada (Anexo 1) (diluição 1:10);
- c) Dispersar as unidades formadoras de colônias (UFC) em agitador mecânico (usar  $\cong$  3,4 G) durante 15 minutos e aguardar a precipitação das partículas maiores;
- d) Com uma micropipeta, contendo ponteira esterilizada, transferir 1,0 mL da suspensão para um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina esterilizada e agitar, no agitador de tubos ou manualmente, cinco vezes (diluição 1:100);

**Tabela 10.** Meio de cultura dextrose-extrato de levedura.

| Reagente  | Quantidade (g L <sup>-1</sup> ou mL L <sup>-1</sup> ) |
|---|---|
| Glicose   | 10,0 g  |
| Extrato de levedura                                 | 0,5 g   |
| Solução MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (10 %) | 2,0 mL  |
| Solução CaCl <sub>2</sub> (1 %)                     | 2,0 mL  |
| Solução NaCl (10 %)                                 | 1,0 mL  |
| Solução de micronutrientes <sup>1</sup>             | 2,0 mL  |
| Fe-EDTA <sup>2</sup>                                | 10,0 mL   |
| KNO <sub>3</sub>                                    | 0,1 g   |
| Ágar  | 15,0 g  |
| Água destilada q.s.p.                               | 1.000,0 mL  |

Fonte: Sylvester-Bradley et al. (1982).

<sup>1</sup>Solução contendo 0,2 g de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0,235 g de MnSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0,28 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,008 g de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O e 0,024 g de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O em 200 mL de água destilada; <sup>2</sup>Solução obtida pela dissolução de 3,72 g de Na-EDTA e 3,78 g de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O em 900 mL de água destilada aquecida a 80 °C até a dissolução completa, seguida de ajustamento do volume para 1.000 mL; Obs. Após a dissolução dos reagentes e antes da adição do ágar, corrigir o pH para 7,0, com solução diluída de NaOH (0,1 %). Antes de verter o meio, com temperatura de 45 a 50 °C, adicionar 50 mL da solução K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 10 % e 100 mL da solução de CaCl<sub>2</sub> a 10 %, esterilizadas separadamente.

- e) Transferir com uma micropipeta, contendo outra ponteira esterilizada, 1,0 mL da solução anterior para outro tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina esterilizada e agitar manualmente cinco vezes (diluição 1:1.000);
- f) Repetir o item “e” novamente para atingir a diluição 1:10.000;
- g) Descartar a ponteira utilizada em um béquer contendo água e detergente, após cada transferência;
- h) Pipetar, com ponteiras diferentes, 0,1 mL das etapas “d”, “e” e “f” e transferir para placas de Petri contendo o Meio de cultura dextrose-extrato de levedura. Para cada diluição usar três repetições. Logo, serão utilizadas nove placas de Petri para análise posterior;
- i) Espalhar o inóculo na superfície do meio específico com o auxílio da alça de Drigalsky, tomando o cuidado de esterilizá-la por flambagem, inse-

rindo-a em álcool etílico (95 ou 96° GL) e passando-a imediatamente na chama da lamparina. Repetir o processo, após o uso em cada placa de Petri;

- j) Identificar corretamente as placas de Petri, selar com parafilm e incubá-las em estufa a 25 °C, invertidas, durante uma semana;
- k) Após 10 a 12 dias, considerar somente as colônias que formarem, ao seu redor, um halo transparente, que corresponde à solubilização do fosfato;
- l) Selecionar as placas de Petri com as diluições que contenham entre 20 e 200 (UFC) isoladas; e,
- m) Contar as UFC com contador de colônias ou a olho nu.

### **3. Cálculo**

Realizar o cálculo conforme descrito no Capítulo III (p. 22).

### **4. Resultados**

Preencher os dados conforme Tabela 4 (p. 22).