



XXIX Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas
XIII Reunião Brasileira sobre Micorrizas
XI Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo
VIII Reunião Brasileira de Biologia do Solo
Guarapari – ES, Brasil, 13 a 17 de setembro de 2010
Centro de Convenções do SESC

Prospecção de Comunidades Bacterianas do Solo para o Aproveitamento Agrícola de Fosfatos de Rocha

Ubiana Cássia Silva⁽¹⁾; Eliane Aparecida Gomes⁽²⁾; Ubiraci Gomes de Paula Lana⁽³⁾ & Ivanildo Evódio Marriel⁽²⁾

(1) Estudante Engenharia Agrônômica, Universidade Federal de São João Del-Rey, Campus de Sete Lagoas, Sete Lagoas, MG, CEP: 35701-970, ubiana@yahoo.com.br (apresentador do trabalho); (2) Pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo, Rodovia MG 424, Km 65, Sete Lagoas, MG, CEP: 35701-970, eliane@cnpms.embrapa.br, imarriel@cnpms.embrapa.br; (3) Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Rodovia MG 424, Km 65, Sete Lagoas, MG, CEP: 35701-970, ubiraci@cnpms.embrapa.br

RESUMO – O objetivo deste trabalho é selecionar e avaliar 39 bactérias isoladas de solo rizosférico de milho quanto ao potencial de solubilização de fosfatos naturais, além da caracterização molecular dessas bactérias pela amplificação e sequenciamento da região 16S do rDNA. Foram avaliados dois fosfatos de rocha (fosfato de Araxá e fosfato de Itafós). O fosfato de Itafós apresentou maiores valores de solubilização comparado ao fosfato de Araxá, sendo que a cepa mais eficiente no fosfato de Itafós (B58) foi também a que se destacou no fosfato de Araxá, solubilizando respectivamente 29,20% e 19,74% do fósforo adicionado ao meio de cultura. Observou-se também a redução do pH nos tratamentos inoculados com as estirpes mais eficientes. Os gêneros *Burkholderia*, *Bacillus* e *Arthrobacter* foram os que mais se destacaram na solubilização de fósforo dentre as bactérias avaliadas. Este resultado indica o potencial de utilização dessas estirpes como biofertilizantes para agregar valor aos fosfatos de rocha na agricultura.

Palavras-chave: bactérias, solubilização, fosfato natural

INTRODUÇÃO - Os solos do Cerrado brasileiro, constituem as novas fronteiras agrícolas do país. Entretanto, nesta região predominam os latossolos (cerca de 50%), que apresentam alto grau de intemperismo e, conseqüentemente, elevada acidez e baixa disponibilidade de nutrientes essenciais, como o fósforo (Novais & Smyth, 1999).

O fósforo (P) constitui um dos fatores limitantes da produção agrícola, dada sua importância no metabolismo vegetal, atuando nas funções básicas das células, como formação dos ácidos nucléicos e

de fosfolipídeos, além da produção, fluxo e estoque da energia por meio das moléculas de ATP e NADPH em vários processos biológicos, como fotossíntese e respiração. Dessa forma, o fósforo influencia todo o ciclo do desenvolvimento vegetal, podendo favorecer o amadurecimento precoce das culturas (Stauffer & Sulewski, 2004).

Com intuito de elevar a produtividade agrícola são adicionadas aos solos grandes quantidades de adubos fosfatados. Desses, apenas de 10 a 20% são, efetivamente, utilizados pelos vegetais (Vance et al., 2003). Portanto, verifica-se que, apesar de grande parte dos solos brasileiros apresentarem teores elevados de fósforo total, a maior concentração de fósforo é encontrada em formas pouco solúveis sendo assim, indisponíveis para as plantas (Raij, 1991).

Devido a esses fatores e por causa da dependência nacional do mercado externo para o suprimento dos fertilizantes fosfatados, pesquisas têm sido desenvolvidas nas últimas décadas visando à utilização de fosfatos naturais como fontes alternativas para a adubação fosfática (Braga et al., 1980, Defilippe, 1990; Steiner, 2009). Contudo, o emprego direto dessas fontes naturais de fósforo no solo não é economicamente recomendável devido à baixa disponibilidade desse nutriente, sobretudo nos solos tropicais, onde este mineral é adsorvido com facilidade (Simpson et al., 1997).

Diante disso, tem-se buscado o uso de microrganismos do solo com capacidade de solubilização do fósforo a partir dessas fontes pouco solúveis (Moreira & Siqueira, 2006). A maioria destes estudos tem procurado avaliar as características genéticas associadas a estes microrganismos, visando uma maior compreensão

da eficiência e da capacidade da comunidade microbiana em solubilizar diversos tipos de fosfato para a seleção de espécies potencialmente úteis para a inoculação em plantas (Souchie et al., 2005).

Este trabalho tem como objetivo selecionar e avaliar estirpes de bactérias do solo com potencial de solubilização de fosfatos

MATERIAL E MÉTODOS - Foram avaliadas 39 cepas de bactérias, pertencentes à Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo, quanto à capacidade de solubilização do fosfato de Araxá. A partir desta avaliação selecionaram-se as 12 estirpes mais eficientes para avaliar o potencial de disponibilização de fósforo em fosfato de Itafós. Os tratamentos foram constituídos de dois controles (meio de cultura e o meio de cultura contendo fosfato de rocha na ausência de bactéria). Foram utilizados erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura líquido (NIBRIP) (Nautiyal, 1999), com 0,5 % (m/v) do fosfato de rocha, como única fonte de fósforo e 0,5 mL de suspensão bacteriana (10^8 células mL⁻¹) para os tratamentos inoculados. Os inóculos e os controles foram incubados a 28 °C com agitação por 10 dias.

As amostras foram filtradas e o fósforo solúvel determinado pelo método colorimétrico de Murphy & Riley (1962), subtraindo-se a amostra controle (meio de cultura com fosfato de rocha sem inoculação). Além disso, determinou-se o pH final para todos os tratamentos.

Todos os ensaios foram analisados segundo delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o programa Sisvar (FERREIRA, 1998).

Efetou-se ainda a caracterização e identificação molecular das estirpes, com base na sequência de nucleotídeos da região 16S rDNA utilizando-se os primers universais F968 e R1401 (Nubel et al., 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO - De acordo com os resultados da biossolubilização do fosfato de Araxá foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) no potencial dos isolados testados, sendo que, dentre as 39 bactérias avaliadas, 12 cepas disponibilizaram de 15 a 20% do fósforo (Tabela 1). Em comparação, o superfosfato simples, fonte utilizada convencionalmente na adubação fosfatada, apresenta 18% de P₂O₅, sendo que deste total apenas 16% é solúvel em água (Korndorfer, 1978).

As estirpes B58 e B32 foram as mais eficientes na solubilização do fosfato de Araxá, solubilizando 19,74% e 18,62% de fósforo, respectivamente, em relação ao controle. A estirpe B78 foi a menos

eficiente, com liberação de apenas 0,03% do fósforo presente nesse fosfato de rocha. Pérez et al. (2007), também encontraram diferentes níveis de solubilização de fosfato de cálcio entre 130 isolados de bactérias.

Os resultados da solubilização do fosfato de Itafós (Tabela 1) também demonstraram variação significativa ($p < 0,05$) entre as 12 bactérias avaliadas, sendo a estirpe B58 novamente a mais eficiente, com disponibilização de 29,20% de fósforo comparado ao tratamento controle. Em seguida, destacaram-se as estirpes B48 e B82 com elevada capacidade de solubilização do fosfato de Itafós, liberando 25,85% e 25,34% de fósforo, respectivamente. Entretanto, as estirpes B124 e B86 não solubilizaram este fosfato de rocha quando comparadas à amostra controle. Este resultado pode indicar que houve maior consumo de fósforo solúvel pelos isolados do que a liberação no meio, como ocorrido com alguns resultados de solubilização negativa encontrados por Massenssini (2007).

Os dados do pH final (Tabela 1), tanto para o fosfato de Itafós quanto para o fosfato de Araxá, apresentaram alta correlação negativa com a capacidade de solubilização de fósforo ($R^2 = -0,82$ e $-0,89$, respectivamente) e diferença significativa ($p < 0,05$) entre as estirpes. Nahas (1996), em estudo do potencial de liberação de fósforo por 42 microrganismos em meio de cultura líquido, também observou uma redução dos valores do pH para os tratamentos inoculados com a bactéria *Pseudomonas cepacia* que foi a cepa mais eficiente em todos os fosfatos testados.

A caracterização molecular dos isolados pode ser visualizada na Tabela 2. Observou-se que os gêneros *Burkholderia*, *Bacillus* e *Arthrobacter* foram os que sobressaíram na biossolubilização dos fosfatos testados, sendo a estirpe B58 (*Burkholderia cepacia*) a espécie mais eficiente na solubilização do fósforo tanto no fosfato de Araxá quanto de Itafós. A estirpe B32 (*Bacillus pumilus*) foi também eficiente para solubilização do fosfato de Araxá. Já as cepas B48 e B82 identificadas como *Burkholderia* sp. foram eficientes para as duas fontes. Cheng & Yong-Song (1993) analisaram 21 colônias de bactérias solubilizadoras de fosfato isoladas do solo e verificaram que o gênero *Bacillus* foi o mais predominante, além dos gêneros *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Dexia*, *Xanthozomonas* e *Aplanobacter*. Perez et al. (2007) observaram que os gêneros *Burkholderia*, *Serratia*, *Ralstonia* e *Pantoea* foram os mais frequentes dentre bactérias solubilizadoras de fósforo que colonizam naturalmente solos ácidos ricos em ferro do Sudeste da Venezuela.

CONCLUSÕES - Algumas estirpes bacterianas apresentaram eficiência múltipla para solubilização dos fosfatos de Araxá e Itafós, podendo se tornar úteis em estudos futuros para uso como biofertilizante na agricultura.

- A caracterização molecular permitiu identificar gêneros e espécies importantes para o processo de solubilização das fontes de fósforo e também permitiu concluir que há variabilidade genética entre os isolados eficientes na solubilização de fósforo.

- As espécies de bactérias mais eficientes na solubilização de ambos os fosfatos foram *Burkholderia cepacia* e *Bacillus pumilus*.

- Foi observada uma alta correlação negativa entre solubilização de fosfato e pH final do meio de cultura.

REFERÊNCIAS

BRAGA, J.M.; MASCARENHAS, H.A.A.; FEITOSA, C.T.; HIROCE, R. & RAIJ, B. van. Efeitos de fosfatos sobre o crescimento e produção de soja. R. Bras. Ci. Solo, Campinas, 4:36-39, 1980.

CHENG, A.L.XI. S. & SONG, Z.Y. Species of inorganic phosphate bacteria in red soil and the mechanism of solubilization. Pedosphere, 3: 285-288, 1993.

DEFILIPPE, G. Panorama da rocha fosfática e ácido fosfórico. In: ENCONTRO NACIONAL DE ROCHA FOSFÁTICA, 5 ed., São Paulo, IBRAFOS, 1990. p.5-9.

FERREIRA D.N. Sistema de análise estatística para dados balanceados. Lavras: Ufla/Dex/Sisvar; 1998.

KORNDORFER, G.H. Capacidade de fosfatos naturais e artificiais fornecerem fósforo para plantas de trigo: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. (Dissertação de mestrado), 61p. 1978.

MASSESSINI, A. M. Solubilização de fosfatos mediada por microrganismos do solo de plantio de eucalipto: Universidade Federal de Viçosa. (Dissertação de mestrado), 95f, 2007.

MOREIRA, F.M. de S. & SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2 ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p.

MURPHY J., RILEY J.P. A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. Anal. Chem. Acta. 27:31-36, 1962.

NAHAS, E. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. World J. Microbiol. Biotech.12:567-572, 1996.

NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microb. Letters.170: 265-270, 1999.

NOVAIS. R.F. & SMYTH. T.J. Fósforo em solo e planta em condições tropicais. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999. 399p.

NUBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. J. Bacteriol., 178: 5636-5643, 1996.

PÉREZ, E.; SULBARA, M.; BALL, M.M. & YARZÁBAL, L.A.Y. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. Soil Biol. & Biochem. 39:2905-2914, 2007.

RAIJ, B. van. Fertilidade do solo e adubação. Piracicaba: Ceres/Potatos, 1991. 343 p.

SIMPSON, P.G.; SALE, P.W.G.; TENNAKON, S.B. An economic analysis of the field performance of North Carolina reactive phosphate rock compared with single superphosphate for selected sites from the national reactive phosphate rock project. Aust. J. Exp. Agri. 37: 1061-1076, 1997.

SOUCHIE, E. L.; AZCON, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN JÚNIOR, O. J. & SILVA, E. M. R. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. Pesq. Agropec. Bras. 40: 1147-1152, 2005.

STAUFFER, M.D. & SULEWSKI, G. Fósforo essencial para a vida. In: YAMADA, T.; BADALLA, S.R.S., Ed. Anais do simpósio sobre o fósforo na agricultura brasileira: Fósforo na agricultura brasileira. Piracicaba: Potatos, 2004. p.1-11.

STEINER, F. Fosfato de Gafsa e fungos solubilizadores de fosfato e seus efeitos na cultura de milho. Cultivando o saber. 2:156-164, 2009.

VANCE, C.P.; UHDE, S.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. Porcentagem de solubilização e pH final do meio de cultura após 10 dias de incubação das bactérias na presença de fosfato de Araxá e de Itafós. Médias de três repetições

Isolado	P (%) Araxá	pH Araxá	P (%) Itafós	pH Itafós	Isolado	P (%) Araxá	pH Araxá	Isolado	P (%) Araxá	pH Araxá
B5	17,40	3,19	20,21	3,20	B7	6,87	3,93	B34	16,19	3,10
B2	13,95	3,19	18,74	3,24	B17	14,00	3,19	B104	2,02	5,46
B58	19,74	3,05	29,20	3,04	B46	18,18	3,18	B11	15,04	3,09
B62	16,72	3,11	4,30	1,37	B52	1,31	7,33	B37	15,63	3,08
B32	18,62	3,15	2,10	4,33	B78	0,03	6,21	B44	14,70	3,08
B124	13,97	3,17	0,00	4,46	B118	1,90	4,47	B6	4,65	3,89
B70	16,91	3,12	3,21	4,08	B121	3,47	4,24	B3	5,05	3,91
B91	17,76	3,19	24,07	3,14	B18	1,45	4,66	B4	8,97	3,44
B82	17,93	3,19	25,34	3,16	B16	1,42	4,70	B76	5,91	3,55
B86	13,99	3,16	0,00	4,25	B31	0,69	4,74	B116	13,72	3,22
B119	12,15	3,20	20,48	3,17	B19	1,19	4,81	B65	8,25	3,38
B48	17,45	3,22	25,85	3,15	B15	6,35	4,65	B45	12,21	3,43
B20	18,32	3,15	-	-	B43	15,55	3,07	B1	3,47	4,24

Tabela 2. Caracterização molecular dos isolados de bactérias

Isolado	Espécie	Acesso GenBank	Similaridade	Isolado	Espécie	Acesso GenBank	Similaridade de
B5	<i>Burkholderia cepacia</i>	EF602558	98%	B18	<i>Bacillus</i> sp.	EU864320	92%
B2	<i>Pantoea ananatis</i>	FJ611812	94%	B16	<i>Bacillus pumilus</i>	EU586783	97%
B58	<i>Burkholderia cepacia</i>	AY509957	89%	B31	<i>Bacillus pumilus</i>	EU147190	97%
B62	<i>Arthrobacter</i> sp.	AF408967	98%	B19	Uncult. <i>Paenibacillus</i>	EU647536	90%
B32	<i>Bacillus pumilus</i>	FJ641028	99%	B15	<i>Sinomonas flava</i>	EU370704	97%
B124	<i>Arthrobacter</i> sp.	FJ685644	97%	B43	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	AF068009	96%
B70	<i>Bacillus subtilis</i>	FJ483514	89%	B34	<i>Burkholderia</i> sp.	FJ434111	89%
B91	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	EF602557	98%	B104	<i>Bacillus cereus</i>	DQ884352	90%
B82	<i>Burkholderia</i> sp.	AB480713	98%	B11	<i>Burkholderia</i> sp.	FJ930075	97%
B86	<i>Arthrobacter</i> sp.	DQ985470	89%	B37	<i>Burkholderia</i> sp.	AB480713	96%
B119	<i>Bacillus subtilis</i>	FJ483514	89%	B44	<i>Burkholderia cepacia</i>	GQ359110	98%
B48	<i>Burkholderia</i> sp.	FJ4334111	90%	B6	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	FJ976598	98%
B20	Uncult. <i>Paenibacillus</i>	EU647536	99%	B3	<i>Bacillus</i> sp.	EU864320	89%
B7	<i>Citrobacter</i> sp.	GU056358	99%	B4	<i>S. maltophilia</i>	FJ481929	89%
B17	<i>Serratia</i> sp.	HM045833	96%	B76	<i>Pantoea</i> sp.	GU271945	96%
B46	<i>Burkholderia</i> sp.	FJ644952	96%	B116	<i>Bacillus pumilus</i>	FJ641028	99%
B52	<i>Burkholderia</i> sp.	AM992063	90%	B65	Uncult. <i>Pseudomonas</i>	FJ542901	95%
B78	-	-	-	B45	<i>Burkholderia</i> sp.	FJ930075	98%
B118	<i>Bacillus pumilus</i>	FJ641028	96%	B1	<i>Bacillus megaterium</i>	FJ393316	92%
B121	Uncult. <i>Pseudomonas</i>	HM011904	98%				