

## **Alterações na Atividade das Enzimas Fosfatases Ácidas e Alcalinas, em Solo Cultivado com Milheto Adubado com Fosfatos e Inoculado com Microrganismos Solubilizadores**

Eveline Anielly Cristelli Soares<sup>1</sup>, Jaqueline de Moura Araújo<sup>2</sup>, Eliane Aparecida Gomes<sup>2</sup>, Patrícia Gomes Silva<sup>3</sup>, Bianca Braz Mattos<sup>2</sup>, Vera Maria Carvalho Alves<sup>2</sup>, Ivanildo Evódio Marriel<sup>2</sup> e Christiane Abreu de Oliveira<sup>2</sup>

<sup>(1)</sup>Centro Universitário de Sete Lagoas, MG, <sup>(2)</sup>Embrapa Milho e Sorgo; Sete Lagoas, MG, <sup>(3)</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. Email: [evcristelli@yahoo.com.br](mailto:evcristelli@yahoo.com.br), [jamoat2006@yahoo.com.br](mailto:jamoat2006@yahoo.com.br), [eliane@cnpms.embrapa.br](mailto:eliane@cnpms.embrapa.br), [patriciabi1@yahoo.com.br](mailto:patriciabi1@yahoo.com.br), [bianca@cnpms.embrapa.br](mailto:bianca@cnpms.embrapa.br), [vera@cnpms.cembrapa.br](mailto:vera@cnpms.cembrapa.br), [imarriel@cnpms.embrapa.br](mailto:imarriel@cnpms.embrapa.br), [christiane.paiva@cnpms.embrapa.br](mailto:christiane.paiva@cnpms.embrapa.br)

**RESUMO** – O setor agrícola no país vem ganhando espaço devido à sua contribuição no desenvolvimento econômico nacional. Grande parte dos solos brasileiros possui baixa disponibilidade de nutrientes essenciais para o crescimento de plantas, principalmente de fósforo (P). Microrganismos solubilizadores de fontes naturais tais como, as rochas, são essenciais para uma maior disponibilidade de fósforo (P) inorgânico para a planta. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade das enzimas fosfatases ácidas e alcalinas, em Latossolo Vermelho distrófico, fase cerrado, cultivado com milheto, adubado com fosfatos de rochas e inoculado com cinco bactérias solubilizadoras de P. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação, com 29 tratamentos diferenciados, utilizando-se três fontes de fósforo (super triplo, rochas Araxá e Itafós) e cinco estirpes de bactérias, formuladas com os veículos carboximetilcelulose (CMC) e carvão ativado (CA). Após cinquenta dias foram realizadas análises em laboratório. A atividade da fosfatase ácida foi mais elevada que a da alcalina. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos indicam que a inoculação de bactérias nas rochas Itafós e Araxá pode aumentar a produção de enzimas fosfatase, disponibilizando fósforo no solo.

**Palavras-Chave:** fosfatases ácidas e alcalinas, fosfatos de rochas, bactérias, solubilização.

### **Introdução**

Atualmente o cenário do agronegócio brasileiro é o de crescimento de demanda de grãos, devido ao aumento do crescimento populacional (MAPA, 2010). O milheto (*Pennisetum glaucum*) é a espécie mais difundida no Brasil, por suas características agronômicas de alta resistência à seca, adaptação a solos de baixa fertilidade, crescimento rápido e boa produção de massa e grãos. Tem-se apresentado como uma das melhores opções de cobertura de solos em áreas de plantio direto no Brasil. (NETTO, 2004).

Na maioria dos solos, o P é considerado um dos nutrientes mais limitantes à produtividade dos agroecossistemas (AE et al., 1990). O ciclo do P, diferentemente dos ciclos do C, N e S (Carbono, Nitrogênio e Enxofre), envolve reações de equilíbrio entre os

compostos orgânicos e inorgânicos do solo (DUXBURY et al., 1999). O P que é absorvido pelas plantas, varia em decorrência dos mecanismos físico-químicos que ocorrem no solo, tais como a depleção de P pelas raízes das plantas, imobilização e mineralização das frações orgânicas e adsorção e dessorção das frações inorgânicas (SAYAL; DE DATTA, 1991).

As enzimas possuem propriedades catalíticas utilizadas, direta ou indiretamente, pelo homem há milhares de anos, sendo reconhecida apenas em meados do século XIX. Desta forma, a ciclagem de nutrientes de origem microbiana é mediada por enzimas da microbiota, no qual é importante para a quantidade que é disponibilizada às plantas (SAID; PIETRO, 2002).

Pesquisas apontam uma ocorrência natural de determinadas enzimas que hidrolisam ésteres e anidridos do ácido fosfórico, estando, entre elas, a fosfatase alcalina e a fosfatase ácida (ALFENAS, 1998).

Nos vegetais, vários trabalhos mostram que a deficiência de P, leva ao aumento da atividade da fosfatase ácida. Desse modo, tal atividade no tecido vegetal tem sido investigada como resposta da planta à deficiência de P, em que a atividade da fosfatase ácida está correlacionada negativamente com o conteúdo de fosfatos nos solos. Fosfatases alcalinas são altamente estáveis a diferentes pHs e temperaturas, e muito similares estruturalmente nos diferentes tipos de microrganismos (LI et al., 2006). Além das fosfatases alcalinas, o trabalho de Vicent et al. (1992) sugere que as fosfatases ácidas sejam importantes em processos regulatórios, e que elas constituem um grupo diverso de enzimas que utilizam uma variedade de mecanismos químicos para acelerar a hidrólise de ésteres-fosfato.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência de microrganismos solubilizadores de P em solos cultivados com milhetos e adubados com fosfato de rochas, a fim de verificar as alterações das atividades das fosfatases ácidas e alcalinas.

## **Material e Métodos**

O efeito da adubação à base de fosfatos naturais (rochas) e inoculação de bactérias na cultura do milho foram avaliados na casa de vegetação da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os tratamentos constituíram-se do solo adicionado de dois fosfatos de rochas naturais Araxá e Itafós e em alguns tratamentos foram adicionados fosfato super triplo e inoculantes de cinco estirpes de bactérias solubilizadoras de fosfato: CNPMS B30K, CNPMS B32, CNPMS B116, CNPMS B119 e CNPMS B70, utilizou-se como veículo para aplicação dos inoculantes

carvão ativado (CA) e carboximetilcelulose (CMC), totalizando 29 tratamentos, conforme descrito na Tabela 1. Para aplicação em solo e semente utilizou-se inoculante líquido a base de culturas puras. As amostras de solo foram coletadas no início do florescimento e foram realizadas análises das fosfatases ácidas e alcalinas.

A determinação da atividade das fosfatases ácidas e alcalinas foi efetuada de acordo com o método preconizado por Alef et al. (1995). O método fundamenta-se na análise da concentração de *p*-nitrofenol resultante da hidrólise enzimática de *p*-nitrofenil fosfato. A 0,15g de solo foram adicionados tampão pH 6,5 para análise da fosfatase ácida e tampão pH 11,0 para análise da fosfatase alcalina. Para ambas as enzimas, foram adicionados 0,12mL *p*-nitrofenil fosfato 0,05M com vigorosa homogenização e posterior incubação durante 1 hora, com temperatura de 37°C. Adicionou-se, posteriormente, 0,5 mL da solução de reagentes para colorimétrica. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 8.000g por 5 minutos, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 400nm. A concentração de *p*-nitrofenol presente em cada amostra foi determinada com base na curva padrão (0;2;5;7,5;10 •g de *p*-nitrofenol/ml). Os resultados obtidos da atividade das enzimas foram expressos em •g *p*-nitrofenol h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> de solo. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas utilizando-se o teste Tukey a 5% de probabilidade, por meio do programa SISVAR.

### **Resultados e Discussão**

A atividade da fosfatase ácida apresentou maiores valores que a fosfatase alcalina. NAHAS et al. (1994) observaram que o número de fungos que produziram a fosfatase ácida no solo, superou em 150% o de produtores da fosfatase alcalina. Identificaram ainda, que os fungos e as bactérias possuem maior atividade da fosfatase ácida. Os resultados das análises estatísticas para atividade das fosfatases ácidas e alcalinas mostraram que houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em função das bactérias inoculadas nas rochas.

Para a atividade da fosfatase ácida o tratamento 6 quando comparado ao tratamento 8 apresentou maiores valores, observando-se que o inoculante CNPMS 30K foi o que ocasionou maior produção de fosfatase no solo com fosfato de Araxá, utilizando-se como veículo o CMC. Para a atividade da fosfatase alcalina verificou-se que o tratamento 13 apresentou maior variação quando comparado ao 2, mostrando que a atividade da fosfatase alcalina foi eficiente na presença do inoculante CNPMS B70, utilizando-se rocha Itafós e veículo CMC. Rojo et al. (1990) verificaram que a fosfatase ácida predomina em solos ácidos e a fosfatase alcalina em solos alcalinos.

A atividade da fosfatase ácida foi maior no tratamento 19 quando comparado ao tratamento 2, evidenciando que o inoculante CNPMS B116 foi eficiente na produção de fosfatase ácida, utilizando-se como veículo o CA, observando-se que no tratamento 2 quando havia super triplo, com a mesma rocha (Araxá) e sem inoculante os valores foram significativamente menores. Isso indica que ocorreu diferença entre o tratamento com inoculação de B116 e o não inoculado com bactérias. A atividade da fosfatase alcalina foi maior no tratamento 7 quando comparado ao 27, utilizando-se o mesmo inoculante CNPMS B32, mostrando que quando o solo foi adubado com fosfato de Itafós e super triplo, utilizando o veículo CA, o inoculante não apresentou boa capacidade de produção de fosfatase. A diminuição da atividade das fosfatases ácidas e alcalinas foram evidenciadas nos tratamentos adubados com super triplo, com maior teor provável de P solúvel no solo. Williams e David (1976) observaram que o número de microrganismos nos solos adubados com super triplo foi reduzido devido à presença de cádmio neste adubo.

Para análise da atividade da fosfatase ácida o tratamento 12 apresentou valores maiores em relação ao tratamento 24, isto se deve ao fato de que o inoculante CNPMS B32 foi eficiente na produção de fosfatase na presença de fosfato de Itafós, utilizando-se como veículo o CMC, mostrando que no tratamento 24 o inoculante CNPMS B116 apresentou baixos valores de produção desta enzima. Nahas et al. (1994) verificaram que o número de fungos produtores de fosfatase ácida no solo, superou em 150% o de produtores de fosfatase alcalina, constataram ainda que os fungos e as bactérias possuem maior atividade da fosfatase ácida e alcalina, respectivamente.

Os tratamentos 19, 16, 12, 17 e 15 apresentaram maiores valores da atividade da fosfatase alcalina quando comparado aos tratamentos 29, 18, 24, 1 e 9, observando-se que os inoculantes CNPMS B116, B30K, B32, e B119 apresentaram alta produção de fosfatase em fosfato de rocha Araxá e Itafós, utilizando veículos CA e CMC, respectivamente. A diminuição da atividade da fosfatase alcalina verificada nos tratamentos ocorreu devido às combinações dos inoculantes juntamente com os veículos, adição de super triplo e rochas fosfáticas. Tais resultados, provavelmente, se devem ao fato de que a solubilização por inóculos depende da granulometria do fosfato ou de sua origem, sendo os fosfatos de rocha de origem sedimentar mais solúveis do que os fosfatos de origem ígnea ou metamórfica (HAMMOND et.al., 1986).

A atividade da fosfatase ácida apresentou maiores valores nos tratamentos 10, 9, 5 e 17 quando comparado aos tratamentos 27, 16 e 28, indicando que os inoculantes CNPMS B119 e B116 foram mais eficientes na produção de fosfatase, utilizando-se como veículo o

CMC, mostrando que a análise de variância nos tratamentos com valores inferiores se deram devido a adubação com super triplo, utilizando como veículo CA e diferentes inoculantes. Para atividade da fosfatase alcalina os tratamentos 5, 6, 20, 4, 26, 23, 11, 3, 25, 14, 28, 8, 21 e 10 e para atividade da fosfatase ácida os tratamentos 3, 13, 1, 18, 15, 20, 7, 26, 4, 11, 25 e 21 não apresentaram variações significativas entre si.

Constatou-se que, a inoculação de bactérias nas rochas Itafós e Araxá pode aumentar a produção de enzimas fosfatase, devido às atividades das fosfatases ácidas e alcalinas terem se diferido dos controles não inoculados. Portanto, novos estudos deverão ser realizados, objetivando verificar se estas bactérias na cultura do milheto são realmente viáveis economicamente, quando usadas como inoculantes. Tais estudos visam contribuir para a eliminação do uso de fertilizantes solúveis na cultura desta forrageira.

### **Agradecimento**

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro.

### **Literatura Citada**

AE, N.; ARIHARA, J.; OKADA, K.; YOSHIHARA, T.; JOHANSEN, C. Phosphorus uptake by pigeon pea and its role in cropping systems of the Indian subcontinent. **Science**, Washington, v.248, p.477-480, 1990.

ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Enzyme activities**. In ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.) *Methods in applied microbiology and biochemistry*. London: academic press, p. 311-374, 1995.

ALFENAS, A.C. (1998) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa. UFV.

DUXBURY, J.; SMITH, S.; DORAN, J.; JORDAN, C.; SZOTT, L.; VANCE, E. Soil organic matter as a source and a sink of plant nutrients. In: COLEMAN, D.; OADES, J.; UEHARA, G. (Eds.). **Dynamics of soil organic matter in tropical ecosystems**. Honolulu, Hawaii: NIFTAL Project, 1999. p.33-68.

LI, J.; MARIONNEAU, C.; ZHANG, R.; SHAH, V.; HELL, J.W.; NERBONNE, J.M.; ANDERSON, M.E. Calmodulin Kinase II Inhibition Shortens Action Potential Duration by Upregulation of K<sup>+</sup> Currents. **Circ. Res.** 99(10), p.1092-9, 2006.

HAMMOND, L. L.; CHIEN, S. H.; MOKWUNYE, A. U. Agronomic value of unacidulated and partially acidulated phosphate rocks indigenous to the tropics. **Advances Agronomy**, v.40, p. 89-140, 1986.

NAHAS, E. Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. **Revista de Ciências agrônômicas**, Campinas, v. 61, n. 3, p. 267-275, 2002.

NAHAS, E.; CENTURION, J.F.; ASSIS, L.C. Efeito das características químicas dos solos sob os microrganismos solubilizadores de fosfatos e produtores de fosfatases. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.18, n.1, p.43-48, jan./abr. 1994.

NETTO, D. A. M.; A cultura do milheto; Comunicado Técnico 11 Embrapa Milho e Sorgo, p.6, agosto 1998.

ROJO, M.J. et al. Distribution and characterization of phosphatase and organic phosphorus in soil fractions. **Soil Biology na Biochemistry**, Oxford, v. 22, p.169-174, 1990.

SAID, S.; PIETRO, R.L.R. Enzimas de interesse industrial e biotecnológico. **Liv. Ed. Eventos**. p. 80-90, 2002.

SAYAL, S.; De DATTA, S. Chemistry of phosphorus transformation in soil. **Advances in Soil Science**, v.16, p.2-120, 1991.

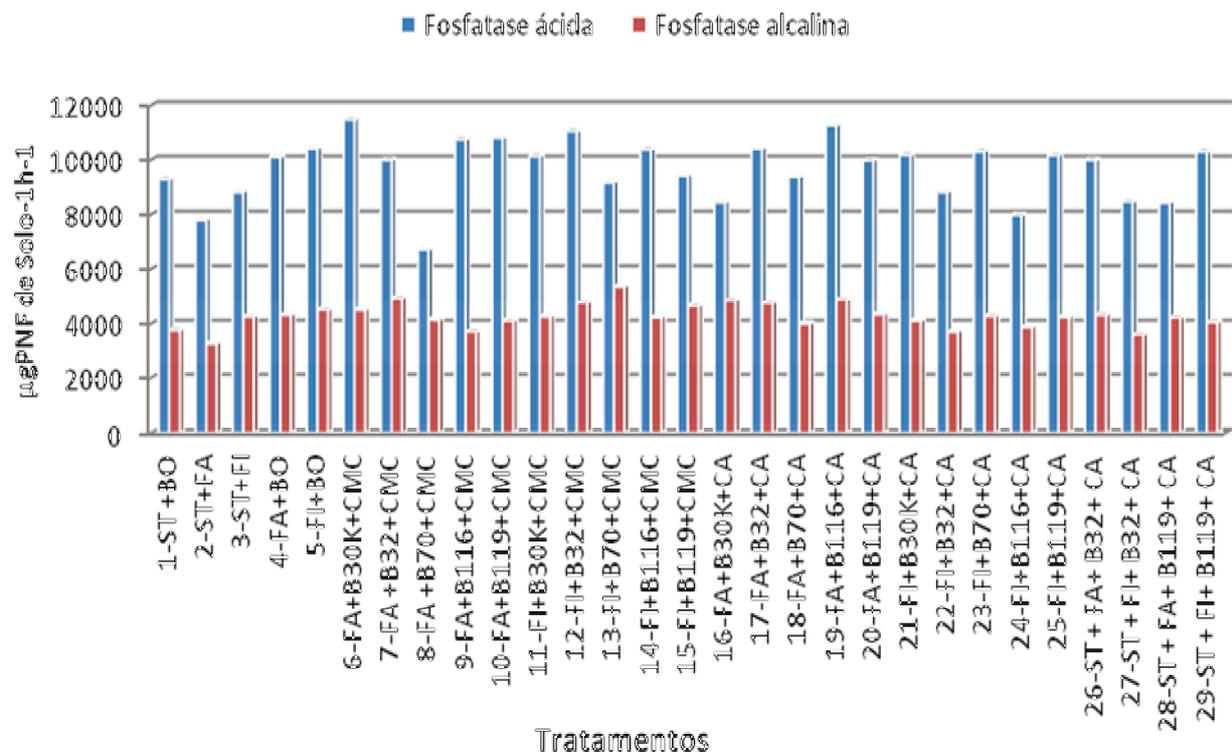
VELJANOVSKI, V.; VANDERBELD, B.; KNOWLES, V.L.; SNEDDEN, W.A.; PLAXTON, W.C. Biochemical and molecular characterization of AtPAP26, a vacuolar purple acid phosphatase upregulated in phosphate-deprived Arabidopsis suspension cells and seedlings. **Plant Physiol.** 142(3), p. 1282-93, 2006.

VICENT, J.B.; CROWDER, M.W.; AVERILL, B.A. Hydrolysis of phosphate monoester: a biological problem with multiple chemical solutions. **TIBS** 17: p.105-110, 1992.

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

WILLIAMS, C.H.; DAVID, D.J. The accumulation in soil of cadmium residues from phosphate fertilizers and their effect on the cadmium content of plants. **Soil Science**, Baltimore, v.121, p.86-93, 1976.

Figura 1- Variação fosfatase ácida e alcalina.



**Tabela 1** - Diferentes tratamentos utilizados para avaliação da atividade da fosfatase ácida e alcalina.

Identificação	Tratamentos
1-ST+BO	Super Triplo+sem bacteria
2-ST+FA	Super Triplo+Fosfato de Araxá
3-ST+FI	Super Triplo+Fosfato de Itafós
4-FA+BO	Fosfato de Araxá+sem bactéria
5-FI+BO	Fosfato de Itafós+sem bactéria
6-FA+B30K+CMC	Fosfato de Araxá+B30K+carboximetilcelulose
7-FA+B32+CMC	Fosfato de Araxá+B32+carboximetilcelulose
8-FA+B70+CMC	Fosfato de Araxá+B70+carboximetilcelulose
9-FA+B116+CMC	Fosfato de Araxá+B116+carboximetilcelulose
10-FA+B119+CMC	Fosfato de Araxá+B119+carboximetilcelulose
11-FI+B30K+CMC	Fosfato de Itafós+B30K+carboximetilcelulose
12-FI+B32+CMC	Fosfato de Itafós+B32+carboximetilcelulose
13-FI+B70+CMC	Fosfato de Itafós+B70+carboximetilcelulose
14-FI+B116+CMC	Fosfato de Itafós+B116+carboximetilcelulose
15-FI+B119+CMC	Fosfato de Itafós+B119+arboximetilcelulose
16-FA+B30K+CA	Fosfato de Araxá+B30K+Carvão Ativado
17-FA+B32+CA	Fosfato de Araxá+B32+Carvão Ativado
18-FA+B70+CA	Fosfato de Araxá+B70+Carvão Ativado
19-FA+B116+CA	Fosfato de Araxá+B116+Carvão Ativado
20-FA+B119+CA	Fosfato de Araxá+B119+Carvão Ativado
21-FI+B30K+CA	Fosfato de Itafós+B30K+Carvão Ativado
22-FI+B32+CA	Fosfato de Itafós+B32+Carvão Ativado
23-FI+B70+CA	Fosfato de Itafós+B70+Carvão Ativado
24-FI+B116+CA	Fosfato de Itafós+B116+Carvão Ativado
25-FI+B119+CA	Fosfato de Itafós+B119+Carvão Ativado
26-ST+FA+B32+CA	Super Triplo+Fosfato de Araxá+B32+Carvão Ativado
27-ST+FI+B32+CA	Super Triplo+Fosfato de Itafós+B32+Carvão Ativado
28-ST+FA+B119+CA	Super Triplo+Fosfato de Araxá+B119+Carvão Ativado
29-ST+FI+B119+CA	Super Triplo+Fosfato de Itafós+B119+Carvão Ativado

\*Atividade das fosfatases ácidas e alcalinas em 29 tratamentos diferentes. As médias diferiram pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.