

## Biossolubilização de fósforo por bactérias endofíticas de milho

**Crísia Santos de Abreu<sup>1</sup>; Ivanildo Evódio Marriel<sup>2</sup>; Christiane Abreu de Oliveira<sup>3</sup>; Vitória Palhares Ribeiro<sup>4</sup>; Beatriz de Almeida Barros<sup>5</sup>; Vera Lúcia dos Santos<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Mestranda em Ciências Agrárias Universidade Federal de São João Del Rei - UFSJ, Sete Lagoas, MG, [crisiaabreu@gmail.com](mailto:crisiaabreu@gmail.com); <sup>2</sup>Pesquisador Embrapa Milho e Sorgo e professor Universidade Federal de São João Del Rei – UFSJ, [ivanildo.marriel@embrapa.br](mailto:ivanildo.marriel@embrapa.br); <sup>3</sup>Pesquisadora Embrapa Milho e Sorgo, [christiane.paiva@embrapa.br](mailto:christiane.paiva@embrapa.br); <sup>4</sup>Graduanda Centro Universitário de Sete Lagoas – UNIFEMM, [vitypalhares18@hotmail.com](mailto:vitypalhares18@hotmail.com); <sup>5</sup>Analista Embrapa Milho e Sorgo, [beatriz.barros@embrapa.br](mailto:beatriz.barros@embrapa.br); <sup>6</sup>Professora Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, [verabio@gmail.com](mailto:verabio@gmail.com).

**RESUMO:** Microrganismos solubilizadores de fósforo (MSP) podem ser utilizados como alternativa para otimizar a eficiência na utilização de fósforo (P), principalmente por meio da biossolubilização de rochas fosfáticas. O presente trabalho objetivou selecionar microrganismos endofíticos de milho eficientes na solubilização de fosfato *in vitro*. O material vegetal de milho foi coletado em experimento de campo durante o estágio de floração desta cultura. O isolamento de microrganismos endofíticos foi realizado a partir de extratos da folha, raiz e seiva extraída dos colmos. Obtiveram-se 73 morfotipos de bactérias endofíticas, sendo 25 de seiva, 22 da folha e 26 da raiz de milho. Os ensaios de solubilização de P foram realizados em meio de cultura sólido e líquido contendo fosfato tricálcio como fonte exclusiva de P, onde os microrganismos foram inoculados e crescidos por 7 e 9 dias, respectivamente. O P solúvel total liberado foi mensurado por colorimetria com leitura em espectrofotômetro. A solubilização de P em meio sólido foi determinada pela formação de halo translúcido e a identificação molecular das estirpes foi realizada com base na identidade de sequências 16S rDNA. Todas as estirpes apresentaram eficiência relativa de solubilização em relação ao controle (sem microrganismos), variando de 80mg.L<sup>-1</sup> a 193mg.L<sup>-1</sup>, o valor total de P liberado em 9 dias de crescimento. Do total de 73 isolados utilizados, 25 não foram capazes de formar halo. Entre as estirpes sequenciadas, houve predomínio dos gêneros *Bacillus* e *Pantoea*. Concluiu-se que há variabilidade genética e quanto ao potencial de solubilização de P entre MSP endofíticos avaliados. **Termos de indexação:** microrganismos endofíticos, solubilização de fósforo, *Zea mays* L.

### INTRODUÇÃO

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

Como forma de correção dessa deficiência e para viabilizar a exploração agrícola do Cerrado, agricultores adotam práticas de adubação fosfatada em quantidades elevadas para manutenção e/ou melhoria da capacidade produtiva das plantas devido à perda de parte do P que é fornecido via adubação pelo fenômeno de fixação em reações com componentes do solo.

A inoculação de plantas com microrganismos solubilizadores de P (MSP) selecionados (biofertilizantes) e em concentração superior à naturalmente presente no solo tem sido utilizada para promover benefício substancial na disponibilização de P para as plantas (Oliveira, 2009; Chaves et al., 2013). Assim, o estudo de microrganismos de um microbioma distinto, como o interior das plantas, denominados endofíticos e sendo este ecossistema considerado como de alta diversidade, tem sido uma estratégia eficiente para a seleção de cepas promissoras para produção de bioinoculantes (Figueiredo et al., 2010).

Diante disto, o objetivo deste trabalho foi selecionar e caracterizar microrganismos endofíticos solubilizadores de fosfato *in vitro* com potencial para produção de inoculantes.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Coleta das amostras vegetais

O material vegetal de milho foi coletado em experimentos de campo no estágio de floração, durante a safra 2013.

#### Desinfestação das amostras vegetais

Os procedimentos de desinfestação do material vegetal da interferência de microrganismos epifíticos foram realizados conforme descrito por Araújo et al. (2000) e Marriel et al. (2001) e realizados no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica do Solo da Embrapa Milho e Sorgo.

#### Isolamento de microrganismos endofíticos

Cerca de 10 g de amostras desinfestadas de raízes e folhas foram macerados com areia esterilizada conforme Marriel et al. (2001). Para isolamento de microrganismos da seiva, o colmo previamente desinfestado foi cortado sobre os entrenós para extração da seiva sob pressão positiva de sucção (Marriel et al. 2001). Os extratos

de cada parte da planta foram submetidos a agitação constante em solução salina por 1h para extração dos endófitos.

### Solubilização de fosfato em meio sólido

Os 73 isolados foram inoculados em placas contendo o meio NBRIP sólido (Nautiyal, 1999) e incubados a 28 °C durante 7 dias para visualização do halo indicador de solubilização. O halo foi medido pelo seguinte critério: diâmetro total ( $\phi$  halo +  $\phi$  colônia) diminuído do diâmetro da colônia, considerando-se a média de quatro repetições para cada amostra. O resultado obtido foi expresso pelo Índice de Solubilização por meio da fórmula proposta por Berraquero et al. (1976):  $IS = \phi \text{ Halo (mm)} / \phi \text{ Colônia (mm)}$ .

### Solubilização de fosfato em meio líquido

Os isolados foram inoculados em meio líquido NBRIP (Nautiyal, 1999) modificado, durante 9 dias a 30°C e agitação constante. Em seguida, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante filtrado para a determinação do P solúvel pelo método de Murphy & Riley (1962). O pH foi mensurado no sobrenadante antes de se proceder a centrifugação.

### Sequenciamento de DNA

A identificação molecular de 42 isolados bacterianos endófitos de raiz, seiva e folha de milho foi realizada com base na identidade de sequências 16S rDNA, utilizando os *primers* universais F968 e R1401 (Nubel et al., 1996). Após o sequenciamento foi feita a comparação com sequências de DNA depositadas no banco de dados GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) por meio da ferramenta Blast (Altschul et al., 1997).

### Delineamento e análise estatística

Os resultados de cada ensaio foram submetidos individualmente à análise de variância e, quando ocorreram diferenças significativas pelo teste F ( $p < 0,05$ ), as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando-se o programa Sisvar 5.3 (Ferreira, 2010). As análises de correlação de Pearson foram realizadas utilizando o programa R (R Development Core Team 2011).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O índice de solubilização variou significativamente ( $p < 0,05$ ) entre os isolados avaliados (**Tabela 1**). De acordo com estes dados, os isolados foram classificados como estirpes de baixa ( $IS < 2$ ) e média solubilização ( $2 \leq IS \leq 4$ ) (Berraquero et al., 1976).

Do total de 73 isolados, 25 não foram capazes de formar halo e a presença do halo de solubilização sugere a eficiência dos microrganismos em solubilizar P de fontes insolúveis. O meio de cultura utilizado contém fonte

insolúvel de P na forma de fosfato tricálcio que, na presença de substâncias liberadas pelos microrganismos, como ácidos orgânicos é solubilizado, o que é evidenciado pela formação de um halo translúcido ao redor das colônias que apresentam capacidade solubilizadora (Nautiyal, 1999; Souchie et al., 2005).

Observou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a eficiência de biossolubilização de P e pH entre os isolados (**Tabela 1**). Foi observada uma correlação de -0,58 ( $p < 0,05$ ) entre a eficiência solubilizadora dos isolados e a acidificação do meio. Esse resultado era esperado, uma vez que um dos mecanismos desenvolvidos por MSP é liberar metabólitos capazes de acidificarem o meio de cultivo (Sousa, 2010). A acidificação do meio pode ser a etapa inicial do processo de solubilização o que, no decorrer do tempo, pode ser maximizado ou até mesmo permanecer estável de acordo com as características de cada microrganismo.

Todas as estirpes deste estudo apresentaram eficiência solubilizadora em meio líquido superior ao controle (fosfato sem inoculação de microrganismos) (**Tabela 1**). A taxa de solubilização variou entre 80mg.L<sup>-1</sup> a 193mg.L<sup>-1</sup> de P liberado. Comparando os resultados para eficiência de solubilização em meio sólido e em meio líquido (**Tabela 1**), observou-se que a maioria dos microrganismos em estudo possuem baixo ou médio potencial solubilizador. Contudo, as estirpes que não solubilizaram em meio sólido apresentaram eficiência solubilizadora relativa superior ao controle em meio líquido. Resultados semelhantes foram encontrados por Nautiyal, (1999) e Alikhany et al., (2006) e podem ser explicados pela difusão de ácidos orgânicos e metabólitos produzidos pelos microrganismos de acordo com o tipo de ácido e o meio de cultura utilizado (Delvasto et al., 2006).

Segundo Whitelaw et al., (2000), o potencial de solubilização de fosfato é proporcional ao tamanho do halo e a sua relação com o tamanho da colônia. No entanto, 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. Desta forma, a utilização de meio sólido como ferramenta para *screening* de microrganismos solubilizadores de fosfato não deve ser o único método a ser empregado para seleção desses microrganismos, visto que em trabalhos como o de Sousa (2010) alguns isolados selecionados como não solubilizadores em meio sólido pela avaliação do IS, apresentaram eficiência de solubilização em meio líquido.

Dos 42 isolados sequenciados, 57,14% são do gênero *Bacillus* e 33,33% do gênero *Pantoea*, isto é, dados consonantes com os encontrados na literatura sobre MSP, mas ainda não relatados para microrganismos endófitos solubilizadores de P.

## CONCLUSÕES

Há variabilidade genética e quanto ao potencial de solubilização de P entre as estirpes bacterianas endofíticas avaliadas.

Todos os microrganismos utilizados neste estudo apresentam potencial solubilizador de fosfato *in vitro* na presença de fosfato tricálcio como fonte exclusiva de fósforo.

As cepas de bactérias endofíticas avaliadas neste estudo podem ser selecionadas para testes futuros de inoculação em milho, visando a biossolubilização de rochas fosfáticas e aumento da disponibilidade de P para esta cultura.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao conselho nacional de pesquisa (CNPq) e à Embrapa Milho e Sorgo.

## REFERÊNCIAS

ALIKHANI, H.A.; SALEN-RASTIN, N.; ANTOUN, H. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. **Plant and Soil**, v.287, p.35-41, 2006.

ARAÚJO, J.M.; SILVA, A.C.; AZEVEDO, J.L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Archives of Biology Technology**, v. 43, p. 447-451, 2000.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

BERRAQUERO, F.R.; BAYA, A.M.; CORMENZANA, A.R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, v.17, p.399-406, 1976.

CHAVES, D.P.; ZUCARELI, C.; JUNIOR, A.O. Fontes de fósforo associadas à inoculação com *Pseudomonas fluorescens* no desenvolvimento e produtividade do milho. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 1, p. 57-72, jan./fev. 2013.

DELVASTO, P.; VALVERDE, A.; BALLESTER, A., IGUAL, J.M.; MUÑOZA, J.A.; GONZÁLEZ, F.; BLÁZQUEZ, M.L.; GARCÍA, C. Characterization of brushite as a re-crystallization product formed during bacterial solubilization of hydroxyapatite in batch cultures. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38, p.2645-2654, 2006.

FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; OLIVEIRA, J.P.; SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P. Bactérias promotoras do crescimento de plantas: estratégia para uma agricultura sustentável. In: FIGUEIREDO, M.V.B.;

SOBRAL, J.K.; STAMFORD, T.L.M.; ARAÚJO, J.M. **Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p. 387-414.

FERREIRA, D.F. SISVAR - **Sistema de análise de variância**. Versão 5.3. DEX.Lavras-MG: UFLA, 2010.

MARRIEL, I.E.; VALICENTE, F.; SANTOS, C.G.; PAIVA, E.; SELDIN, L. Ocorrência de endófitos do gênero *Bacillus* em seiva de plantas de milho. **Comunicado técnico 35**, 6p. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, 2001.

MURPHY, J., AND J.P. RILEY. 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 Microbiol Lett**,v.170, p. 265-270, 1999.

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. **Journal of Bacteriology**, v.178, p.5636-5643, 1996.

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 an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, v.41,p.1782-1787, 2009.

R Development Core Team. R: (2011) A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <http://www.R-project.org>.

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.

**Tabela 1-** Potencial de solubilização de fosfato, aos 7 dias de inoculação em meio de cultura sólido contendo fosfato de cálcio (NBRIP), de 73 estirpes endofíticas isoladas de folha, raiz e seiva de milho, valores de pH e taxa de solubilização de P em meio líquido.

Estirpe	IS <sup>1</sup>	CS <sup>3</sup>	Taxa de solubilização P (mg.L <sup>-1</sup> ) <sup>4</sup>	pH <sup>5</sup>	Estirpe	IS	CS	Taxa de solubilização P (mg.L <sup>-1</sup> )	pH
<b>Controle<sup>2</sup></b>	-	-	36,20 i	6,51 a	<b>2007</b>	-	-	151,62 d	4,26 g
<b>1912</b>	1,00 g	Baixa	122,98 f	5,17 c	<b>2008</b>	-	-	160,38 c	4,69 e
<b>1915</b>	1,30 f	Baixa	114,19 f	5,25 c	<b>2009</b>	1,71 e	Baixa	164,23 c	5,12 c
<b>1916</b>	1,76 e	Baixa	174,52 b	3,97 i	<b>2010</b>	1,49 f	Baixa	175,38 b	4,37 g
<b>1917</b>	1,69 e	Baixa	150,47 d	4,41 f	<b>2011</b>	2,35 c	Média	181,32 a	4,13 h
<b>1918</b>	1,39 f	Baixa	111,35 g	4,68 e	<b>2012</b>	1,69 e	Baixa	167,89 b	4,16 h
<b>1919</b>	3,71 a	Média	172,08 b	4,09 h	<b>2013</b>	1,69 e	Baixa	155,11 d	4,51 f
<b>1920</b>	1,71 e	Baixa	193,71 a	4,25 g	<b>2014</b>	1,67 e	Baixa	153,38 d	4,53 f
<b>1921</b>	1,64 e	Baixa	174,47 b	4,21 g	<b>2079</b>	-	-	185,55 a	3,90 i
<b>1922</b>	2,05 d	Média	176,30 b	3,97 i	<b>2080</b>	-	-	174,53 b	4,26 g
<b>1923</b>	1,33 f	Baixa	111,93 g	5,50 b	<b>2081</b>	-	-	148,47 d	4,42 f
<b>1924</b>	1,94 d	Baixa	166,27 c	3,99 i	<b>2082</b>	-	-	167,97 b	4,94 d
<b>1925</b>	3,61 a	Média	132,88 e	4,73 e	<b>2083</b>	-	-	154,11 d	5,34 c
<b>1926</b>	1,40 f	Baixa	123,89 f	4,31 g	<b>2084</b>	1,13 g	Baixa	120,42 f	4,80 e
<b>1928</b>	1,50 f	Baixa	169,23 b	4,03 i	<b>2085</b>	-	-	149,75 d	4,96 d
<b>1929</b>	2,88 b	Média	165,01 c	3,99 i	<b>2086</b>	-	-	104,07 g	5,17 c
<b>1930</b>	2,06 d	Média	129,06 e	4,26 g	<b>2087</b>	1,79 e	Baixa	137,75 e	4,74 e
<b>1931</b>	1,42 f	Baixa	134,21 e	4,23 g	<b>2088</b>	-	-	179,39 a	4,73 e
<b>1932</b>	1,58 e	Baixa	138,29 e	4,32 g	<b>2089</b>	1,00 g	Baixa	107,47 g	5,02 d
<b>1934</b>	1,55 e	Baixa	80,32 h	4,23 g	<b>2091</b>	2,21 d	Média	185,15 a	4,14 h
<b>1935</b>	1,90 d	Baixa	137,54 e	4,28 g	<b>2093</b>	1,42 f	Baixa	186,13 a	4,04 i
<b>1936</b>	1,94 d	Baixa	136,88 e	4,30 g	<b>2094</b>	1,00 g	Baixa	116,81 f	4,92 e
<b>1937</b>	-	-	135,90 e	4,24 g	<b>2095</b>	1,53 e	Baixa	155,25 d	4,45 f
<b>1939</b>	1,90 d	Baixa	135,92 e	4,28 g	<b>2096</b>	-	-	149,01 d	4,98 d
<b>1942</b>	-	-	108,27 g	4,86 e	<b>2097</b>	-	-	100,82 g	4,69 e
<b>1944</b>	-	-	129,71 e	4,77 e	<b>2099</b>	1,64 e	Baixa	139,57 e	4,25 g
<b>1961</b>	2,00 d	Média	124,33 f	4,54 f	<b>2100</b>	1,80 e	Baixa	158,63 c	4,03 i
<b>1962</b>	2,42 c	Média	141,18 e	4,38 g	<b>2102</b>	2,11 d	Média	121,81 f	4,58 f
<b>1964</b>	-	-	117,14 f	4,82 e	<b>2103</b>	1,21 f	Baixa	134,14 e	4,41 f
<b>1972</b>	-	-	146,28 d	4,15 h	<b>2105</b>	2,06 d	Média	155,19 d	4,31 g
<b>1974</b>	1,00 g	Baixa	140,55 e	5,10 c	<b>2106</b>	1,24 f	Baixa	191,46 a	4,19 h
<b>1976</b>	1,62 e	Baixa	169,50 b	4,14 h	<b>2107</b>	-	-	191,46 a	4,26 g
<b>1979</b>	-	-	159,09 c	5,14 c	<b>2108</b>	-	-	118,24 f	5,00 d
<b>1981</b>	-	-	127,83 e	4,68 e	<b>2109</b>	1,00 g	Baixa	133,57 e	4,76 e
<b>1982</b>	1,00 g	Baixa	167,85 b	4,61 f	<b>2110</b>	-	-	181,98 a	3,90 i
<b>1984</b>	-	-	119,77 f	4,71 e	<b>2111</b>	-	-	176,33 b	4,83 e
<b>2006</b>	-	-	158,18 c	5,67 b	<b>2112</b>	1,66 e	Baixa	140,01 e	4,38 g

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup> Índice de solubilização (Berraquero et al., 1976). IS < 2: baixa solubilização; 2 ≤ IS ≤ 4: média solubilização.

<sup>2</sup> Meio de cultura sem microrganismo.

<sup>3</sup> Capacidade solubilizadora.

<sup>4</sup> Somatório do valor absoluto de P solubilizado pelos microrganismos durante 9 dias de incubação.

<sup>5</sup> pH em água mensurado aos 9 dias de incubação.

- Indica que não houve formação de halo de solubilização.